

Fotooxidación de proteínas de leche

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

por

Bioq. Dana Scheidegger

Prof. Dra. Silvia Clara Kivatinitz

Directora

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas

Córdoba – Argentina

Marzo 2013



Directora de Tesis: Prof. Dra. Silvia Clara Kivatinitz

Comisión de Tesis: Prof. Dr. Carlos E. Argaraña
Prof. Dr. Gustavo A. Argüello
Prof. Dra. Elba I. Buján

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a todas las personas y organismos que hicieron posible la realización de mi tesis de Doctorado:

- A la Facultad de Ciencias Químicas, UNC., al CONICET, al Ministerio de Ciencia y Tecnología de Córdoba, y la Universidad Nacional de Villa María, por el apoyo recibido.
- A Silvia Kivatinitz, mi directora de tesis, que me ha tenido tanta paciencia, por ser como una madre sustituta con sus consejos, su apoyo y ayuda durante este proceso, por sus enseñanzas, y por tantas cosas compartidas.
- A los miembros de mi comisión de tesis, Carlos Argaraña, Elba Buján y Gustavo Argüello, por sus correcciones y sugerencias para mejorar la tesis, haciéndose tiempo entre sus innumerables tareas y obligaciones.
- A mis compañeros de grupo: Rolando Pécora, Cristina Acosta, Cesar Dalla Costa, Jimena Juárez, Noelia Bossio, Leopoldo Speroni, Diego Forcatto, Cecilia Sampetro, David Hantis, Sofía Cugino, Ariel Vergara Roig, Paola Radici, y Verónica Mary, con los cuales he compartido innumerables momentos buenos y charlas enriquecedoras, gracias por toda la ayuda que me han brindado durante estos años.
- A mis mejores amigas Adriana Altamira, Pao Radici, y Vero Mary, por compartir conmigo tantos momentos de mi vida importantes, por escucharme siempre, por estar en los momentos en donde tuve ganas de renunciar y dejarlo todo, por acompañarme y darme fuerzas.
- Al Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas, por darme la posibilidad de hacer esta tesis de Doctorado y a todos sus miembros. Y especialmente a aquellas personas que se detuvieron a charlar conmigo en los pasillos compartiendo parte de sus vidas.

Deseo agradecer especialmente a mi familia y a tres personas que han sido el apoyo y sostén incondicional en estos años de tesis, sin los cuales no sé si hubiese podido lograr esto. Gracias a Rubén Olmedo, por toda la ayuda que me ha dado, por siempre creer en mí y alentarme para crecer en lo profesional. Gracias Alejo Ramírez, por ser mi sostén emocional en los últimos años de la tesis, acompañándome y dándome mucha fuerza y felicidad, y por ser mi fuente de equilibrio, junto con la navegación a vela. Gracias a Estefanía, mi hija, que es lo más hermoso que me paso en la vida y que siempre me dio un abrazo y un beso cuando más lo necesité.

Por último, quiero agradecer a Dios, que ha sido mi motor y mi energía extra para seguir adelante en los momentos más duros, para no rendirme ante lo difícil, y para creer que todo es posible con perseverancia y dedicación.

RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
CAPÍTULO 1: LA LECHE.....	6
La leche en Argentina.....	6
Composición de la leche.....	7
CAPÍTULO 2: LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE	10
Clasificación.....	10
La micela de caseína.....	13
Estructura de las proteínas de la leche.....	16
CAPÍTULO 3: PROCESAMIENTO TECNOLÓGICO DE LA LECHE.....	23
Coagulación de la leche por quimosina.....	23
Fabricación de leche en polvo.....	23
Tratamientos para reducir la carga microbiana en alimentos.....	25
Almacenaje de la leche en góndolas iluminadas con luz fluorescente.....	26
CAPÍTULO 4: OXIDACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA LECHE.....	27
Oxidación de lípidos.....	27
Oxidación de azúcares.....	29
Oxidación de proteínas.....	30
REFERENCIAS.....	40
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
CAPÍTULO 1: OXIDACIÓN PROTEICA EN LECHE ENTERA Y DESCREMADA, Y LACTOSUERO SOMETIDOS A LUZ UV Y FL.....	48
Oxidación lipídica.....	48
Formación de dienos y trienos conjugados en leche expuesta a luz UV y fluorescente.....	48
Oxidación proteica.....	50

Cambios en la estructura primaria de las proteínas.....	50
Proteólisis, oligomerización y agregados en leche expuesta a la luz UV o fluorescente.....	53
Aspectos funcionales de las proteínas de leche oxidada.....	57
Proteólisis enzimática de la leche expuesta a diferentes tipos de luz.....	57
Actividad secuestradora de radicales de leche expuesta a UV.....	60
Capacidad de la leche como sustrato de crecimiento de un hongo: efecto de la irradiación UV.....	61
Oxidación de proteínas del suero de leche expuestas a distintos tratamientos.....	62
Conclusión Capítulo 1.....	65
CAPÍTULO 2: ESTUDIO DE LA OXIDACIÓN DE LAS PROTEÍNAS AISLADAS DE LECHE POR AGENTES DE RELEVANCIA INDUSTRIAL.....	66
Oxidación de β -lactoglobulina, β -caseína y α -lactoalbúmina.....	66
Cambios en la estructura primaria de las proteínas por radiación UV.....	66
Oxidación de β -lactoglobulina y β -caseína por irradiación UV en presencia de peróxido de hidrógeno y metales divalentes.....	69
Formación de geles estables de β -lactoglobulina.....	73
Conclusión Capítulo 2.....	75
CAPÍTULO 3: ESTADO OXIDATIVO DE LAS PROTEÍNAS DE LECHE EN POLVO COMERCIALES (ENTERAS, DESCREMADAS Y FÓRMULAS). RELACIÓN CON LOS PARÁMETROS DE CALIDAD.....	77
Leches en polvo comerciales del mercado local.....	77
Leches en polvo comerciales locales: composición química y parámetros de calidad.....	77
Leches en polvo comerciales locales: estado oxidativo de las proteínas y capacidad antioxidante.....	79
Relaciones entre la oxidación proteica y la capacidad antioxidante con otros parámetros de calidad y la composición.....	81
Efectos del almacenamiento en el estado oxidativo de las proteínas, dispersabilidad y color.....	82
Conclusión Capítulo 3.....	85

REFERENCIAS.....	86
CONCLUSIÓN.....	89
MATERIALES Y MÉTODOS.....	93
ANEXO 1:	102
REFERENCIAS.....	103
TRABAJOS PUBLICADOS.....	104

RESUMEN

Se estudió la fotooxidación de las proteínas de la leche en la matriz natural, del lactosuero y de las proteínas aisladas. Se evaluaron los cambios en la estructura primaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas, y se los relacionó con la funcionalidad y con los parámetros de calidad láctea.

El capítulo 1 aborda estos fenómenos en dos matrices complejas: la leche y el lactosuero. La irradiación UV produjo cambios oxidativos rápidamente (inferiores a una hora) mientras que la luz fluorescente produjo alteraciones a tiempos mayores. La composición de la matriz láctea afectó la cinética de formación de productos de oxidación de aminoácidos. La irradiación UV produjo formación de oligómeros y agregados con formación de enlaces ditirosina y fragmentación proteica. Se encontraron cambios en la inmunoreactividad frente a anticuerpos contra proteínas del suero nativas sometidas a irradiación UV, lo que se interpretó como un cambio de la estructura tridimensional de éstas. La luz UV y fluorescente produjeron cambios en la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas de acuerdo a lo observado por SDS-PAGE. Estos cambios estructurales coincidieron con cambios en la funcionalidad: actividad secuestradora de radicales, la capacidad de servir como sustrato de crecimiento de un microorganismo, la digestibilidad por pepsina y la coagulación por quimosina.

En el capítulo 2 se muestran los resultados obtenidos con las proteínas aisladas de la leche. Se estudiaron los cambios en la estructura primaria, terciaria y cuaternaria de β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, (proteínas del suero mayoritarias) y β -caseína (proteína importante del grupo de las caseínas), en condiciones de oxidación por luz UV, y en presencia o ausencia de peróxido de hidrógeno y metales bivalentes (cobre y hierro). Los cambios en la estructura primaria generados por irradiación UV fueron diferentes para cada una de las proteínas analizadas. La proteína cuya estructura es más desplegada sufrió mayor formación de grupos carbonilos mientras que en la más estructurada se produjo la degradación de triptofano y la formación de su metabolito *N*-formilquinurenina. Los tratamientos con peróxido en presencia de metales produjo a tiempos muy cortos proteólisis y a tiempos largos (más de 6 horas) la aparición de nuevas estructuras: geles (β -lactoglobulina) ó agregados y oligómeros (β -caseína). Estas estructuras podrían tener importancia en la industria alimentaria.

El capítulo 3 se relacionó el estado oxidativo de las proteínas de distinto tipo de leche (entera, descremada y fórmulas infantiles) con los parámetros de calidad láctea. Se evaluó la formación de grupos carbonilos proteicos, de enlaces ditirosina, de oligómeros y agregados y la capacidad antioxidante (polifenoles totales y capacidad secuestradora de radicales libres) y se relacionó con parámetros de calidad láctea (dispersabilidad, el color, la proporción de proteínas del suero, la humedad y la composición química). Se encontró una fuerte relación de la cantidad relativa de proteína de suero con los niveles de carbonilos proteicos, la formación de agregados y la dispersabilidad. El almacenamiento durante 9 meses a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ produjo aumento de la oxidación de las proteínas (niveles de carbonilos, ditirosina, oligómeros y agregados) y disminución de la dispersabilidad. La determinación de carbonilos proteicos es el único parámetro de oxidación proteica que se relacionó con el nivel inicial de oxidación. Nuestros resultados señalan la necesidad preservar la leche de la luz durante el procesamiento industrial

hasta ser consumida. Se propone que la evaluación del estado oxidativo de las proteínas, especialmente la determinación de carbonilos proteicos, sea uno de los parámetros de calidad que deberían analizarse rutinariamente.

Se concluye que los procesos fotooxidativos de las proteínas de la leche dependen de la matriz en que éstas se encuentran (Capítulo 1) y de la estructura de las proteínas nativas (Capítulo 2). Las proteínas cuya estructura terciaria globular compacta y está en una matriz más compleja son más resistentes a la fotooxidación. Estas observaciones explican porque la oxidación de las proteínas de la leche está fuertemente relacionada con la calidad de los distintos tipos de leches comerciales (Capítulo 3).

ABSTRACT

Photooxidation of milk proteins was studied in whole milk, whey and in isolated proteins. Changes in primary, tertiary and quaternary structure were determined and related to their function and milk quality parameters.

In the first Chapter these phenomena were evaluated in whole milk and whey. The speed of changes caused was faster (less than 1 hour) under UV irradiation than fluorescent irradiation. The kinetics of appearance of oxidated aminoacids was affected by matrix composition. UV light produced proteolysis and oligomerization due to dityrosine bond formation. Whey protein immunoreactivity to specific antibodies (raised against the native forms) was affected by UV irradiation, suggesting that changes in tertiary structure occurred. Changes in tertiary and quaternary structure were observed by sodium dodecyl sulfate-PAGE after both types of irradiation. Structural changes were concurrent with changes in functionality: radical scavenging activity, capability to act as substrate for microorganism in culture, hydrolysis by pepsin and enzyme induced coagulation.

Chapter 2 contains the findings with isolated proteins. Changes in primary, tertiary and quaternary structure were determined of β -lactoglobulin and α -lactalbumin (major whey proteins) and β -casein, produced by UV irradiation alone or with hydrogen peroxide and copper or iron were determined. Changes differed for each tested protein after UV irradiation. β -casein (that has a flexible structure) was the protein that had the highest PC formation, whey globular protein had the highest tryptophan degradation with the concomitant appearance of *N*-formylkynurenine. Proteolysis occurred after short times of treatment with hydrogen peroxide in presence of copper or iron, after 6 hours of treatment new structures appeared; gels for β -lactoglobulin or aggregates and oligomers for β -casein. These structures are of technological importance.

In Chapter 3, the protein oxidative modifications and antioxidant capacity of commercially available milk powders was evaluated and related to physical quality parameters such as dispersibility or stability during storage. Fifteen commercially processed spray-dried milk powders were evaluated: 6 whole milk powders (WMP), 4 skim milk powders (SMP), and 5

infant formula powders (IFP). Protein oxidative status was measured as protein carbonyl (PC) content, dityrosine content, and extent of protein polymerization. The level of PC was slightly lower in SMP than in WMP, whereas IFP had more than twice as much PC as WMP (2.8 ± 0.4 , 2.1 ± 0.2 , and 6.5 ± 1.3 nmol/ mg of protein for WMP, SMP, and IFP, respectively). No differences were detected in dityrosine accumulation. Although all the possible pairs of parameters were tested for correlations, we found that 4 parameters were closely linked: PC, whey content, protein aggregate level, and dispersibility. After storage at -20°C or room temperature during 9 month, all milk samples were analyzed to evaluate changes in protein oxidative status (PC, dityrosine, and protein integrity) and related parameters. Compared with the initial condition, PC increased in all tested samples after 9 mo of storage at -20°C or at room temperature. Stored milk powders had increased PC and decreased dispersibility compared with initial levels. Our results highlight the importance of protein oxidative status in milk powder and its relationship to other related quality parameters, such as protein integrity and dispersibility. Our findings suggest that the understanding of such relationships could contribute to develop quality differentiation between different types of milk powders and that the level of PC could be determined routinely as a quality parameter.

It is concluded that milk protein photooxidative mechanisms are dependent of the matrix in which they are (Chapter 1) and of the native structure of the protein (Chapter 2). Resistance to photooxidation increases with the grade of compactness of the protein structure and with the complexity matrix. These observations explain the relationship between protein oxidative status and quality for different milk types (Chapter 3).

ABREVIATURAS

α -LA: α -lactoalbúmina

β -CN: β -caseína

β -LG: β -lactoglobulina

κ -CN: κ -caseína

BSA: albúmina sérica bovina

CCP: fosfato de calcio coloidal

CN: caseínas

DNA: ácido desoxirribonucleico

DOPA: 3,4-dihidroxifenilalanina

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

FL: fluorescente

HNE: 4-hidroxi-2-nonenal

IFP: fórmulas infantiles

LD: leche descremada

LE: leche entera

LF: leche fórmula infantil

MDA: malondialdehído

NNP: nitrógeno no proteico

NFK: *N*-formilquinurenina

P: Proteínas

PC: carbonilos proteicos

PUFA: ácido graso poliinsaturado

ROS: especies reactivas de oxígeno

SDS: dodecilsulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio

SEM: error estándar del promedio

UV: ultravioleta

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1: LA LECHE

La leche es un fluido secretado por la glándula mamaria de todas las especies de mamíferos, principalmente para cumplir con los requerimientos nutricionales completos del neonato. Los principales requerimientos son energía, aminoácidos esenciales, ácidos grasos esenciales, vitaminas, agua y elementos inorgánico [1].

Además de servir para la nutrición y otros requerimientos del neonato, como la inmunidad en los primeros meses de vida mediada por inmunoglobulinas IgA maternas que son secretadas a la leche, la leche y los productos lácteos son los principales componentes de la dieta humana en muchas partes del mundo [1].

LA LECHE EN ARGENTINA

La Argentina es el cuarto productor de leche en polvo mundial, con 270 mil toneladas. Participa en la exportación mundial con el 10% del total. La producción mundial de leche de vaca se encuentra en el orden de los 500.000 millones de litros. Argentina participa con una producción de alrededor de 10.000 millones de litros, con cerca del 2% de la producción total. La exportación argentina de 200 mil toneladas de leche en polvo entera surge del procesamiento de 1.500 millones de leche fluida. Por lo tanto el 15% de la leche fluida argentina está destinada a procesarse en polvo con destino al mercado exterior, según datos de mayo del 2010 [2] Las ventas argentinas al exterior de leche entera en polvo en 2012 ascenderían a 250 mil toneladas, registrando un alza de 12,6% respecto del 2011. El consumo doméstico llega a 1,8 kg/habitante/año. La leche entera en polvo representa el 79% del volumen de leches en polvo enviadas al exterior. Las ventas de quesos crecieron 30% en volumen y 49% en valor. Se estima que las exportaciones de todos los productos lácteos en general, aumentarán en forma significativa en respuesta al incremento en la producción de leche del último año [3]. El sector lácteo muestra un crecimiento real en sus ventas al exterior: las cantidades colocadas de leche crecieron 60% en los primeros siete meses del año 2011 y también otros productos del sector mostraron importantes alzas. El aporte de Córdoba es clave en este crecimiento, pues se trata de la principal provincia productora en el país y se estima que aporta alrededor de 35% del total vendido al exterior [4].

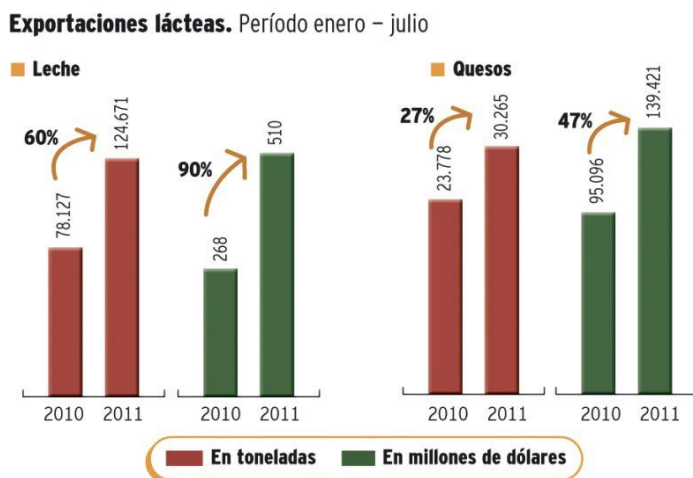


Figura 1. Exportaciones lácteas en la provincia de Córdoba durante el año 2010 y 2011.

COMPOSICIÓN DE LA LECHE

La leche está compuesta principalmente por proteínas, lípidos, lactosa, agua y minerales, y por componentes minoritarios (vitaminas, enzimas y elementos trazas). La leche argentina presenta valores de composición diferentes de los indicados por la bibliografía internacional para la leche de otros países. Esto hecho no es sorprendente ya que la composición de la leche es afectada por muchos factores: tipo de alimentación del ganado, agua que beben, clima, y la estación del año [5-7].

En la Tabla 1 se muestra la composición de la leche de distintas especies de mamíferos [8].

Especie	Sólidos totales	Lípidos	Proteínas	Lactosa	Cenizas
Humano	12,2	3,8	1,0	7,0	0,2
Vaca	12,7	4,5	2,9	4,1	0,8
Oveja	19,3	7,4	4,5	4,8	1,0
Cerdo	18,8	6,8	4,8	5,5	-
Caballo	11,2	1,9	2,5	6,2	0,5
Conejo doméstico	32,8	18,3	11,9	2,1	1,8

Tabla 1. Composición de la leche en distintas especies de mamíferos. Los valores son expresados en % [8].

En la Figura 2 se muestra la composición química promedio de la leche de la cuenca lechera de Villa María [7].

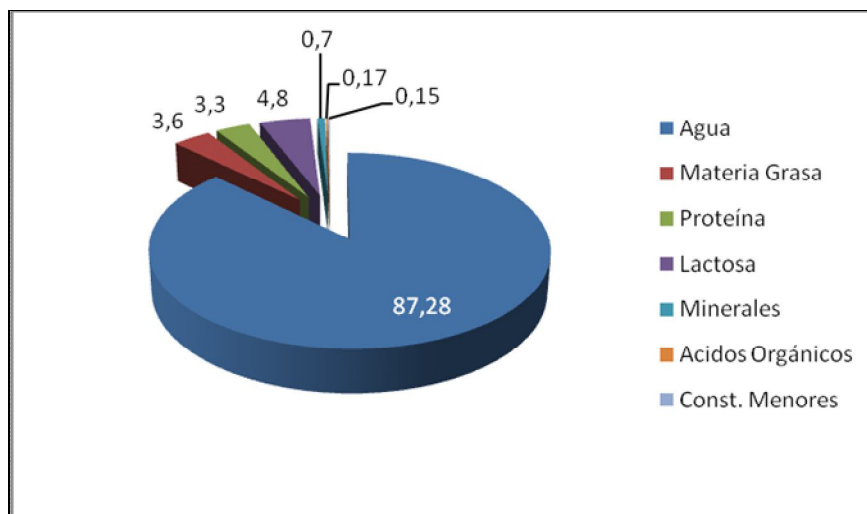


Figura 2: Composición de la leche de la cuenca lechera de Villa María [7]

La leche es un coloide acuoso complejo cuyos componentes se encuentran en tres fases. La mayor parte de éste es una solución de lactosa, sales orgánicas e inorgánicas, vitaminas y otras pequeñas moléculas. En esta solución acuosa hay proteínas dispersas, algunas en forma molecular (proteínas del suero) y otras formando complejos supramoleculares del tamaño de 50

a 600 nm de diámetro (caseínas). Los lípidos forman parte de los glóbulos grasos, cuyo tamaño es de 0.1 a 20 μm de diámetro [8]. En la Figura 3 se muestra un esquema de los componentes de la leche y luego, en los párrafos posteriores, se procede a describirlos individualmente.

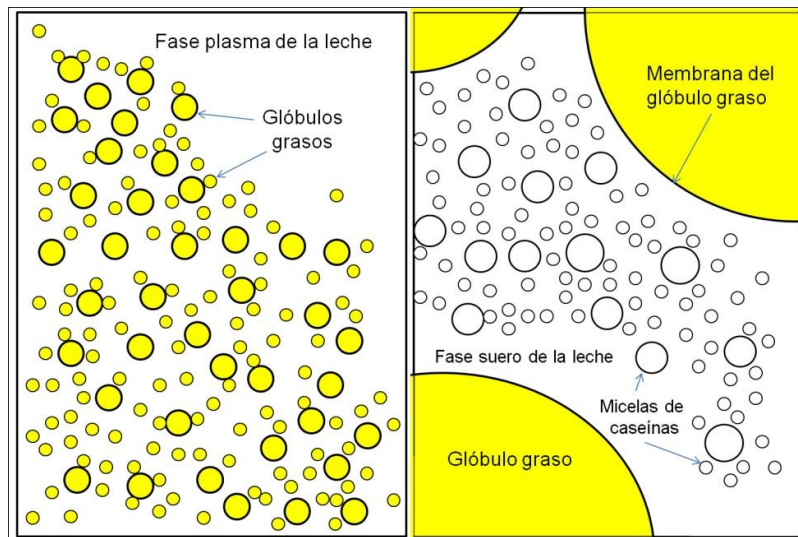


Figura 3. Esquema de la composición y distribución de los componentes de la leche.

Sólidos totales: Son todos los sólidos de la leche (lípidos, proteínas, lactosa, minerales y vitaminas, y otros compuestos químicos no volátiles) [8].

Lactosa: es un disacárido reductor compuesto por glucosa y galactosa, unidas por un enlace glicosídico $\beta 1 \rightarrow 4$, que se encuentra exclusivamente en la leche de los mamíferos. Su contenido es muy poco variable. Es sintetizada en la glándula mamaria a partir de la glucosa y galactosa de la sangre por el complejo enzimático lactosa sintetasa que contiene la α -lactoalbúmina, una proteína de la leche [9].

Lípidos: se presentan en forma de glóbulos grasos cuyo diámetro promedio varía entre 2,5 y 5 micrones. Su función es proveer energía al neonato, ácidos grasos esenciales y vitaminas liposolubles (A, D, E, K). La mayor parte de los lípidos son triglicéridos (98%), el resto son fosfolípidos (0,6%), diacilgliceroles y monoacilgliceroles (0,39%), colesterol (0,31%), y ácidos grasos libres (0,03%) [8]. La concentración de materia grasa en leche y su composición están sujetas a importantes variaciones, como se dijo anteriormente, debidas a factores alimenticios, fisiológicos, sanitarios y genéticos [8]. En la Tabla 2 se muestra el perfil de ácidos grasos en leches de la cuenca lechera central argentina.

PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS	CONCENTRACIÓN (% p/p de ácidos grasos totales)
Cadena corta saturados (C4-C12)	9,41
Cadena media y larga saturados (C14-C18)	51,75
Insaturados (un doble enlace)	28,08
Poliinsaturados (más de un doble enlace)	4,17

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos de la leche producida por la Cuenca Lechera Central de la Argentina [5].

Proteínas: Su concentración cambia significativamente durante la lactancia, y principalmente los primeros días posteriores al parto. La principal función de las proteínas de la leche es la de aportar al neonato los aminoácidos esenciales para la producción de sus propias proteínas y el desarrollo de tejidos [8]. En la próxima sección “Proteínas de la leche” se dan más detalles.

Sales y minerales: son principalmente, fosfatos, citratos, cloruros, sulfatos, carbonatos y bicarbonatos de sodio, potasio, calcio y magnesio. Se han encontrado otros elementos en cantidades trazas, como cobre, hierro, silicio, zinc y yodo. Los elementos mayoritarios tienen importancia nutricional, participan en la estructura y estabilidad de proteínas y son cofactores de algunas enzimas de la leche. El 65% del calcio, el 60% del magnesio y el 50% del fósforo se encuentran asociados a las caseínas en forma coloidal. El sodio, el potasio y el cloruro están en solución [8].

CAPÍTULO 2: LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE

CLASIFICACIÓN

Los primeros trabajos sobre proteínas de leche datan del 1814. El primer método para separar proteínas por precipitación ácida fue descrito en 1838 por J.G. Mulder, quien utilizó por primera vez el término “proteína” acuñado especialmente por Berzelius. La proteína precipitada por ácido se llamó **caseína** o caseinógeno y fue tomada universalmente como la proteína que precipita de la leche a pH 4,6. Entre los años 1918 y 1936 se realizaron experimentos basados en la solubilidad en soluciones de etanol, donde se observó que la caseína precipitada por ácido no era una fracción homogénea, sino una mezcla de proteínas lo cual se confirmó por ultracentrifugación analítica y electroforesis. El líquido que quedaba como sobrenadante de la precipitación isoeléctrica de la caseína se llamó “suero”, el cual es una solución de proteínas (las “**proteínas del suero**”, que se encuentran en un 0.7% en la leche bovina), lactosa, sales inorgánicas, vitaminas y componentes en cantidades traza [1].

Las proteínas de la leche se clasifican generalmente utilizando el esquema de fraccionamiento diseñado por Rowland para la partición de las proteínas de leche bovina por métodos de separación fisicoquímicos, Figura 4 [10].

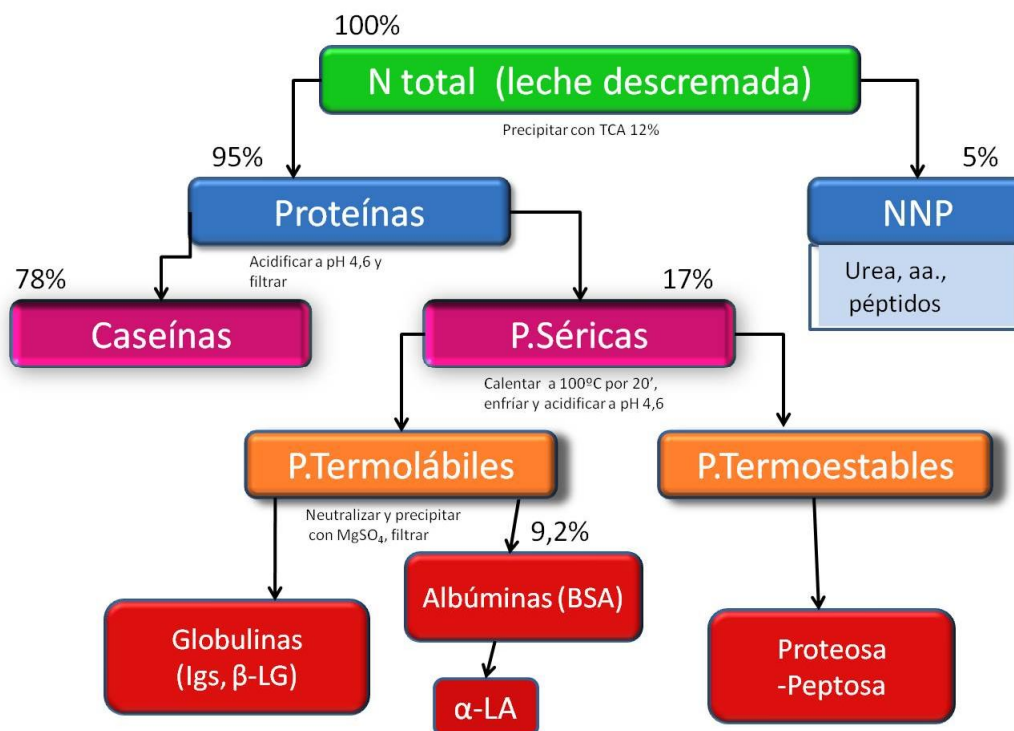


Figura 4. Esquema de Rowland de partición de proteínas de leche de vaca [10-11]. Cada una de las fracciones proteicas fue cuantificada por el método de Kjeldahl para nitrógeno proteico. α -LA: α -lactoalbúmina, β -LG: β -lactoglobulina, BSA: albúmina sérica bovina, Igs: inmunoglobulinas, NNP: fracción de nitrógeno no proteico, y P: proteínas.

La composición de los componentes nitrogenados de la leche y la cuantificación del nitrógeno se muestra en la Tabla 3 [10-11].

PROTEÍNAS DE LA LECHE DE LA VACA			
PROTEÍNAS	Concentración (g/L)	Concentración Porcentual	Peso Molecular (kDa)
Proteínas Totales	33	100%	
CASEÍNAS TOTALES	26	79,5%	
α S1-caseína	10	30,60%	23,5
α S2-caseína	2,6	8%	24
β -caseína	9,3	28,40%	24
κ -caseína	3,3	10,10%	19
PROTEÍNAS SÉRICAS	6,3	19,30%	
α -lactoalbúmina (α -LA)	1,2	3,70%	14
β -lactoglobulina (β -LG)	3,2	9,80%	18,269
Albúmina sérica bovina (BSA)	0,4	1,20%	69
Inmunoglobulinas	0,7	2,10%	150
Proteosa peptona	0,8	2,40%	4-200
Nitrógeno no proteico (NNP)	0,7	6%	

Tabla 3. Proteínas de la leche de vaca y otros componentes con nitrógeno, separados por el método de Rowland y determinados por Kjeldahl.

La concentración total y la composición de las proteínas de la leche varían según la raza, la etapa de lactancia, número de lactancia, temporada, alimentación y la salud de la vaca [1].

Las caseínas de la leche actúan como emulsionantes naturales, lo que les provee de una amplia gama de aplicaciones en el procesamiento de alimentos, incluyendo espumas y emulsiones [12]. Las caseínas forman alrededor de 80% de las proteínas totales de la leche, que comprende cuatro principales proteínas: α s1, α s2-, β - y κ -caseína.

La estructura molecular y las condiciones de procesamiento influyen las propiedades funcionales de estas proteínas [12]. Las caseínas se encuentran formando complejos macromoleculares llamados “micelas de caseína”. Las caseínas poseen la capacidad para asociarse a los lípidos de la leche (Rasmussen, 1994).

En la Tabla 4 se resumen las características de los dos grandes grupos de proteínas de la leche, las caseínas y las proteínas del suero, teniendo en cuenta el esquema de fraccionamiento ácido (Figura 4).

Características y funciones de las proteínas de leche		
	Fracción Caseínica	Fracción Suero
Contenido de fósforo	En forma orgánica, unido por enlace éster a la cadena lateral hidroxilo de las serina y en forma inorgánica está asociado con las caseínas en forma coloidal.	No contienen fosforo
Contenido de azufre	0.8% principalmente unido a metionina. Baja concentración de cisteína y cistina. α 1-caseína y β -caseína, no contienen cistina ni cisteína, no forman enlaces disulfuro (-S-S-) inter o intramoleculares. Las subunidades presentes en menor concentración, α 2-caseína y κ -caseína, contienen un enlace disulfuro (-S-S-) intracatenario y forman enlaces disulfuro (-S-S-) intercatenarios.	1,7%, responsable del aroma a cocinado, el aumento del tiempo de coagulación por renina (dado por la interacción de la β -Lg y la κ -caseína). β -lactoglobulina A: 5 Cys con dos puentes disulfuros intramoleculares. α -lactoalbúmina B: 8 Cys. La α -lactoalbúmina, contiene cuatro puentes disulfuro.
Estabilidad en pH ácido	Precipitan cuando el pH es ajustado a 4.6 (pH isoelectrico).	Son solubles a pH 4.6
Estabilidad con la temperatura	Son estables a altas temperaturas, la leche se puede calentar a 100°C por 24 h, ó a 140°C por 20 min a su pH natural sin que ocurra coagulación.	Son lábiles al calor, y se desnaturalizan completamente por calentamiento a 90°C por 10 min.
Lugar de biosíntesis	Son sintetizadas en la glándula mamaria.	Las inmunoglobulinas y la albúmina sérica bovina derivan de la sangre. La α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina son sintetizadas en la glándula mamaria.
Coagulación enzimática	Coagulan en presencia de Calcio por enzimas reninas como la quimosina.	No coagulan en presencia de quimosina
Estructura cuaternaria y supramolecular	Tienen estructuras cuaternarias complejas, y existen como agregados coloidales, llamados micelas en la leche, de un tamaño de 10^6 a 10^9 Da. Son hidrofóbicas. La κ -caseína, contiene una región N- terminal (residuos de aminoácidos 1 al 105) hidrofóbica, denominada para- κ -caseína, y una región C-terminal (residuos 106 a 169) hidrofílica el glicomacropéptido. Contiene cantidades relativamente altas de prolina, y por lo tanto son proteínas no estructuradas. No han sido cristalizadas aún.	Están dispersas en solución. Estructuras terciarias globulares. β -lactoglobulina es la más hidrofóbica, muy soluble en agua debido a que la mayoría de los componentes no polares están en el interior de la proteína mientras que los componentes polares están en la superficie. La α -lactoalbúmina es una molécula formada por 123 aminoácidos, contiene cuatro puentes disulfuro. Es una glicoproteína que tiene cantidades variables de carbohidratos.

Tabla 4. Propiedades de las proteínas de Leche.

Dentro de los componentes minoritarios se encuentra una pequeña fracción llamada “proteosa-peptona” en la que se encuentran fragmentos de caseínas producidos por la hidrólisis enzimática por plasmina u otras enzimas de la leche [13], y una fracción cuantificada como “nitrogeno no proteico” (NNP), que está compuesta por urea, amoníaco, ácido úrico, aminoácidos, creatinina y péptidos muy cortos. El NNP se encuentra en forma soluble al precipitar la leche descremada con ácido tricloroacético al 12% [14].

LA MICELA DE CASEÍNA

La mayoría de las moléculas de caseínas se encuentran formando grandes estructuras coloidales, conocidas como micelas. Los modelos propuestos para la micela de caseína se clasifican en tres categorías: de núcleo y corteza, de subunidades y de estructura interna [15].

Modelo de núcleo y corteza

Se basa en estudios fisicoquímicos y consideran que la micela de caseína es una partícula esférica y liófila constituida por un centro interno e hidrofóbico de proteínas (núcleo) agregadas rodeadas por una cobertura anfifílica (corteza), cuyas proteínas son diferentes a las que constituyen el centro [16]. En este modelo la estructura interna de la micela no se haya definida con detalle. En el modelo propuesto por Waugh (1958) en el núcleo se encuentran monómeros de α_{s1} -caseína y β -caseína que se agregan entre sí formando un núcleo cuando están en presencia de iones calcio. En la capa externa que recubre al núcleo, se encuentra presente la κ -caseína, formando complejos con la α_{s1} -caseína, y evitando la precipitación del caseinato de calcio [17, 15] (Figura 5a).

Modelo de subunidades

En este modelo, la micela de caseína está compuesta por subunidades individuales rugosas y esféricas denominadas *submicelas*. Estas pueden tener una composición idéntica o variable de caseínas entre sí, y se encuentran unida por uniones con el fosfato de calcio coloidal [15, 18].

Se propusieron varios modelos de submicelas: el de Morr en 1967, el de Slattery y Evard en 1973 (Figura 6), el de Schmidt en 1980 (Figura 5b), el de Walstra y Jenness en 1984 (Figura 5c) y el de Ono y Obata en 1989 [15]. El modelo de Walstra y Jenness, 1984 (Figura 5c) es uno de los modelos más ampliamente aceptado. Éste considera que las micelas de caseína son partículas esféricas imperfectas de superficie rugosa, constituida por pequeñas submicelas con un diámetro entre 12-15 nm. En este modelo las submicelas contienen aproximadamente 20-25 moléculas de caseína con una composición variable [19]. Estas submicelas tienen centros hidrofóbicos y superficies hidrofílicas. Se pueden diferenciar en dos tipos, unas que contienen α_s -CN y β -CN y otras formadas por α_s -CN y κ -CN, estas últimas más hidrofílicas debido a los residuos glucídicos de la κ -CN. Las submicelas distintas se encuentran unidas mediante uniones hidrofóbicas y por uniones con el fosfato de calcio coloidal (CCP) [20]. Las moléculas de κ -CN se encuentran orientadas hacia el exterior de la micela con la parte hidrofílica del grupo carboxilo terminal sobresaliendo de la superficie micelar en forma de vellosidad, constituyendo una “capa pilosa” que previene la agregación de la micela mediante un mecanismo de estabilización estérica y electrostática [20]. La eliminación de calcio en la leche conduce a la desintegración de las micelas en partículas de apariencia submicelar [21, 19].

Horne (2006) señala que el modelo submicelar genera ciertas dudas al no explicar el mecanismo de segregación de la κ -CN [22]. Varios modelos submicelares, como los propuestos por Slattery y Evard en 1973 [23] (Figura 6) y por Walstra y Jenness en 1984 [24] (Figura 5c), contemplan la segregación de la κ -CN para formar áreas ricas en κ -CN que se observan en aquellas subunidades situadas en la zona superficial de la micela de caseína. Estos modelos no explican el motivo por el cual a pesar de la fuerte tendencia de la κ -CN a asociarse entre sí, ésta es capaz de asociarse con otras caseínas para constituir submicelas mixtas que contienen todos los tipos de

caseína. Los resultados de McMahon y McManus (1998) y de Dalgleish et al. (2004), obtenidos mediante microscopía electrónica, descartan la existencia de subunidades en las micelas de caseína [25-26].

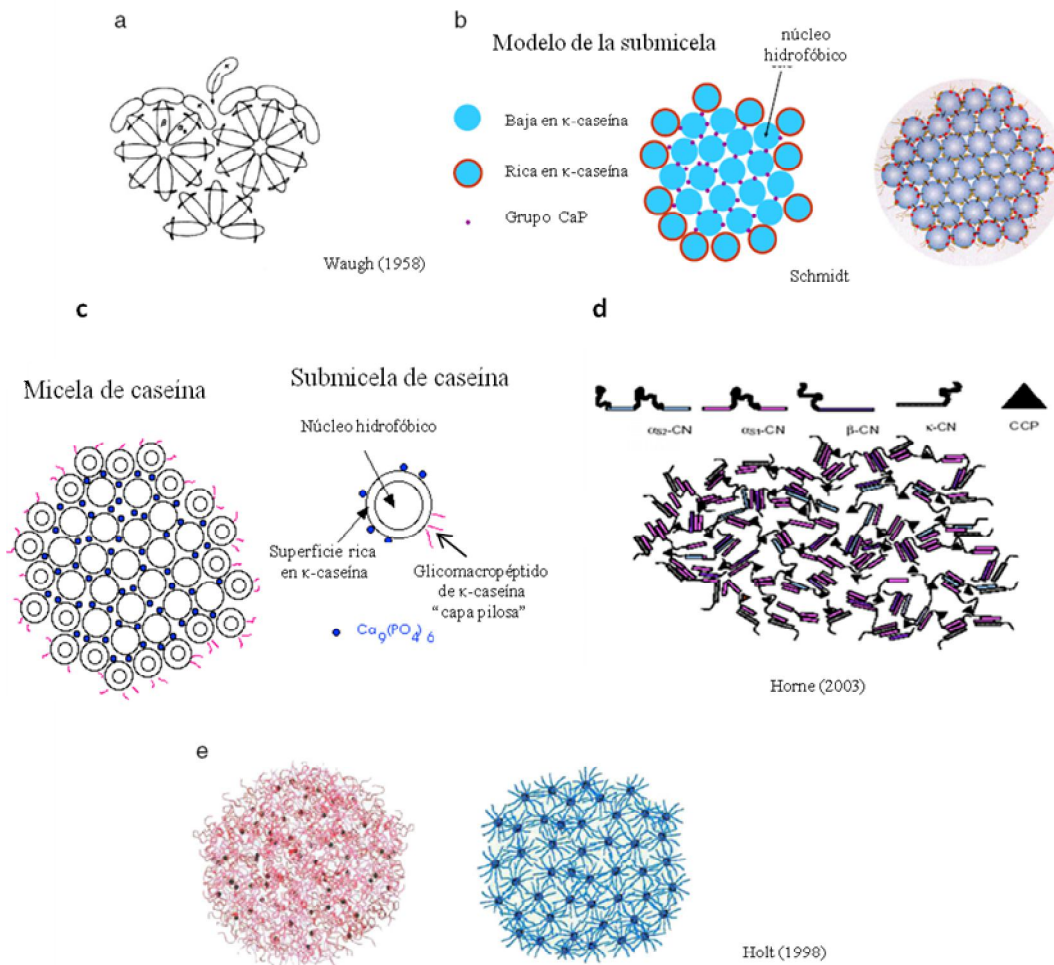


Figura 5. a. Modelo de la micela de caseína propuesta por Waugh 1958 [17]. b. Representaciones de los modelos de micela de caseína propuesta por Schmidt [27]. c. Representación del modelo de la submicela propuesta por Walstra y Jenness (1984) [24]. d. Representación del modelo de la dualidad de enlace por Horne 2003 [28], y la interpretación del modelo de Schmidt's en una revisión 2005 [22], e. Representación del modelo de micela de caseína propuesta por Holt (modelo de la capa pilosa). Colección de impresiones artísticas de la micela de caseína. Tomado y adaptado de [19].



Figura 6. Modelo de estructura de la micela de caseína de Slattery y Evard. Las superficies iluminadas representan polímeros de α_{S1} - y β - caseína (área hidrofóbica). Las zonas oscuras cubren un quinto de la superficie y representan polímeros de κ -caseína (áreas hidrofílicas) [15].

Modelos de estructura interna

En estos modelos se especifica el modo en que se agregan las distintas caseínas. El primer modelo fue propuesto por Holt 1992 y 1996 [29-30] en el cual las caseínas actúan como inhibidores del crecimiento del fosfato de calcio coloidal (Figura 5e), y mejorado por Horne en 1998 (Figura 5d), en el cuál postula que la asociación de las caseínas es dependiente del balance entre las interacciones hidrofóbicas y las hidrostáticas [31, 15]. En estos modelos las caseínas se autoasocian, principalmente a través de interacciones hidrofóbicas, para formar una red homogénea de polímeros de caseínas estabilizados a través de interacciones con fosfato de calcio [30]. En el modelo de Holt el extremo C-terminal de la κ -caseína, proteína altamente glicosilada, se encuentra preferentemente localizada en la periferia de la micela, y forma parte una capa pilosa en la interfase proteína-agua, estabilizando la estructura y previniendo la agregación. Los gránulos de fosfato de calcio coloidal se encuentran dentro de la micela, constituyendo núcleos de crecimiento de la micela. β -CN posee grupos fosfatos, que se unirían al fosfato de calcio coloidal estabilizándolos y regulando su tamaño, para que éste no precipite (Figura 5e) [30].

Se ha podido establecer por microscopía electrónica de barrido que las micelas de caseína poseen un diámetro que varía entre 50 nm a 250 nm. En la Figura 7 se puede observar una micela de caseína fotografiada [26].

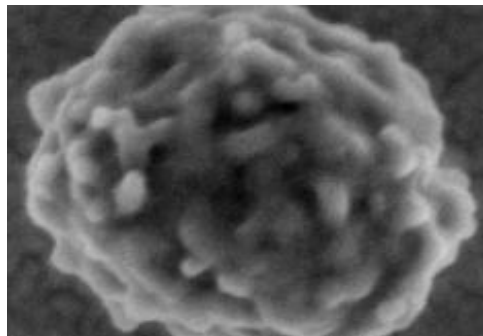


Figura 7. Micela de Caseína. Micrografía por microscopía electrónica de barrido de alta resolución de emisión de campo [26].

ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE

La estructura primaria de una proteína está definida por el orden y la composición de aminoácidos que posee. En la Tabla 5 podemos ver la composición y la cantidad de aminoácidos de las principales proteínas de la leche.

Composición de aminoácidos de las proteínas de la leche

	α 1-Caseína B	α 2-Caseína A	β -Caseína A2	κ -caseína B	β - Lactoglobulina A	α - Lactoalbúmina B
Asp	7	4	4	4	11	9
Asn	8	14	5	7	5	12
Thr	5	15	9	14	8	7
Ser	8	6	11	12	7	7
SerP	8	11	5	1	0	0
Glu	24	25	18	12	16	8
Gln	15	15	21	14	9	5
Pro	17	10	35	20	8	2
Gly	9	2	5	2	3	6
Ala	9	8	5	15	14	3
1/2 Cys	0	2	0	2	5	8
Val	11	14	19	11	10	6
Met	5	4	6	2	4	1
His	11	11	10	13	10	8
Leu	17	13	22	8	22	13
Tyr	10	12	4	9	4	4
Phe	8	6	9	4	4	4
Trp	2	2	1	1	2	4
Lys	14	24	11	9	15	12
His	5	3	5	3	2	3
Arg	6	6	4	5	3	1
PyroGlu	0	0	0	1	0	0
Residuos totales	199	207	209	169	162	123
Peso molecular	23,612	25,228	23,98	19,005	18,362	14,174
H ϕ ave(kJ/residuo)		4,89	5,12	4,64	6,29	5,03

Tabla 5. Composición química de las proteínas de la leche (Swaisgood, 1982).

Se describirá con detalle la estructura química y las características funcionales de las proteínas utilizadas en dicha tesis: β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, y β -caseína.

Estructura y características funcionales de β -lactoglobulina

β -Lactoglobulina sufre algunos cambios de conformación entre pH 2 y pH 9, el más importante es la transición de Tanford N \leftarrow R, que ocurre en el rango de pH fisiológico. La β -lactoglobulina bovina se encuentra como dímero bajo condiciones fisiológicas [1]. La secuencia de aminoácidos de la β -lactoglobulina muestra homología con las proteínas del suero de unión a retinol [32], y también es miembro de la familia de lipocaína ya que posee similaridad en su

estructura terciaria [33]. Se caracteriza por tener una cavidad central hidrofóbica y un sitio de unión para moléculas pequeñas, por lo que se cree que su función sería la de transporte [8]. En la Figura 8 y 9 se puede observar un modelo tridimensional de la estructura terciaria de β -lactoglobulina, y la estructura primaria (secuencia de aminoácidos) y la estructura secundaria, respectivamente.

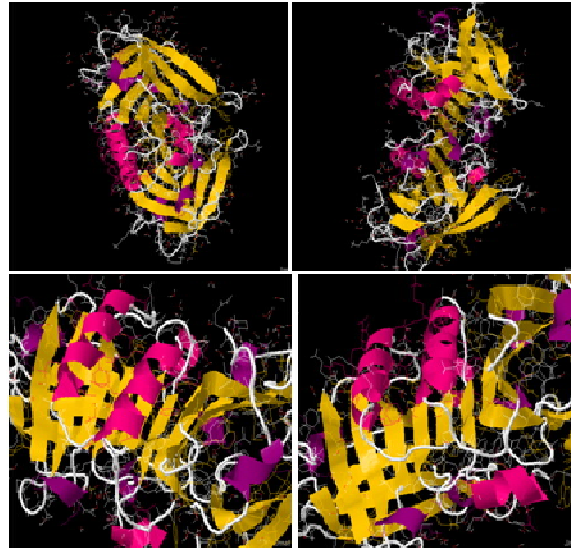


Figura 8. Modelo estructural de β -lactoglobulina. Programa Jmol. Protein Data Bank (UniProtKB P02754)

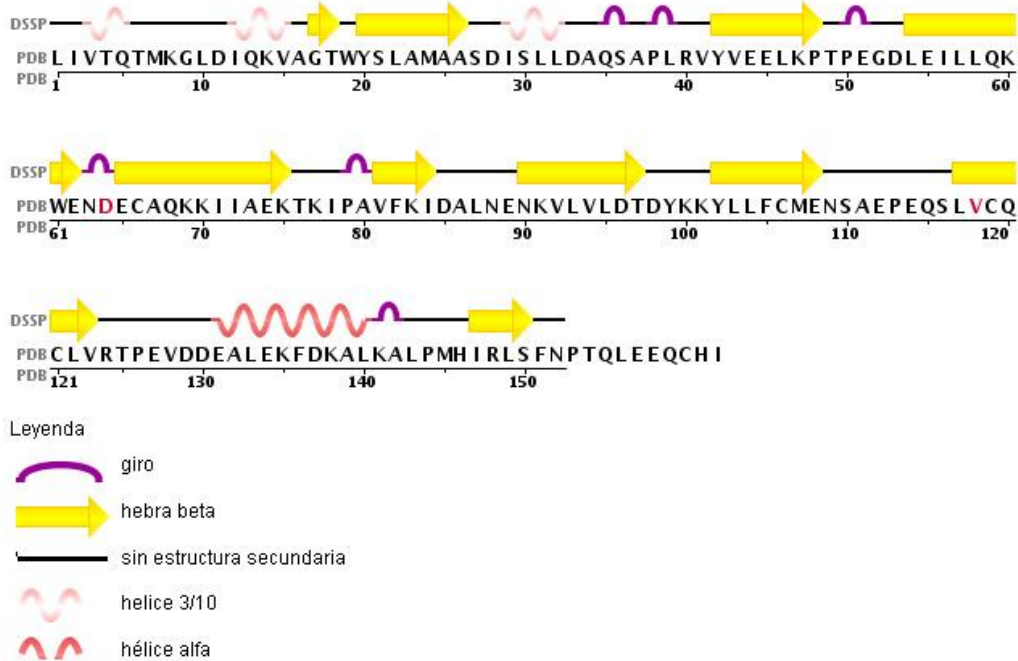


Figura 9. Estructura primaria de β -lactoglobulina B (nativa). Figura tomada del Protein Data Bank (UniProtKB P02754).

β -Lactoglobulina posee 2 variantes genéticas más comunes: A y B. La variante B difiere en 2 aminoácidos respecto de A. En la posición 64 posee ácido aspártico en lugar de glicina y en la 118 valina en lugar de alanina.

La estructura del monómero consiste en 9 hebras antiparalelas de hojas β , 8 de ellas se colocan formando un barril cónico plano, o un cáliz, cerrado en un extremo, entre otras cosas por un Trp₁₉. Posee una alfa hélice y dos hélices 3_{10} [1].

Desnaturalización de la β -lactoglobulina: La β -LG bovina se desnaturaliza a través de una disociación inicial del dímero seguida de un cambio en la conformación de la cadena polipeptídica, y de agregación [1].

Función: Se desconoce la función de la β -lactoglobulina. Se sabe que su composición de aminoácidos le provee resistencia a la digestión por pepsina y ácido, y que es capaz de unir retinol y vitamina D2 [1].

Formación de fibrillas de amiloide: β -LG bovina es capaz de autoensamblarse en estructuras no aleatorias. Cuando el largo es mucho mayor al ancho, las estructuras autoensambladas se denominan “fibrillas”. Cuando las fibrillas están compuestas por estructuras hojas β que están dispuestas de forma perpendicular respecto del eje de la fibrilla, se las llama amiloide, o tipo amiloide [34]. β -lactoglobulina tiene la capacidad de formar fibrillas de amiloide cuando es calentada a bajo pH y baja fuerza iónica, por lo cual, los geles de β -lactoglobulina fabricados a pH menores a pH 4 poseen una microestructura de finas hebras [34]. Las nanofibrillas de proteínas lácteas son de interés para la industria alimenticia por su potencial para aumentar la viscosidad y formar geles a más bajas concentraciones de proteínas que con agregados al azar [35]. También pueden tener aplicaciones en biomedicina y ciencias de los materiales. Evidencia reciente mostró que las fibrillas inducidas por calentamiento de β -lactoglobulina están compuestas por péptidos en vez de monómeros intactos [36] (Figura 10).

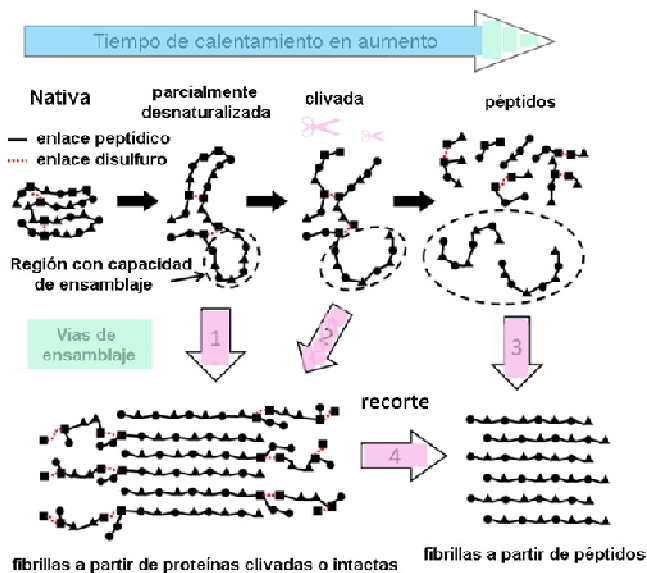


Figura 10. Mecanismo simplificado de autoensamblaje de β -lactoglobulina. [37]

Estructura y características funcionales de α -lactoalbúmina

α -Lactoalbúmina es una proteína del suero de la leche, actúa como proteína reguladora del sistema enzimático lactosa sintetasa que cataliza y regula la síntesis de lactosa en la glándula mamaria lactante [38]. Es una calcio-metaloproteína, el calcio posee un rol importante en el plegamiento y estructura [39].

Se ha informado de que la α -LA y sus productos de hidrólisis tienen funciones fisiológicas: ansiolítica, antimicrobiana, opioide, antihipertensiva, la regulación de las células en crecimiento, antiulcerosa, e inmunomoduladora [40].

Estructura de la α -lactoalbúmina: α -lactoalbúmina consta de 123 residuos de aminoácidos que forman una estructura globular compacta, conocida como “molten globule” o glóbulo fundido, estabilizada por cuatro enlaces disulfuro (Cys 6-Cys120, Cys61-Cys77, Cy73-Cys91, Y Cys28-Cys111). α -LA es una calcio-metaloproteína globular, con un punto isoeléctrico de 4,6, una masa molecular de 14.200 Da y no posee grupos tioles libres [1]. Es genética y estructuralmente homóloga a la lisozima tipo c [41]. La estructura primaria de α -lactoalbúmina se muestra en la Figura 11. La proteína α -LA tiene dos variantes genéticas predominantes (A y B) [42]. La variante A contiene Glu en la posición 10 de la proteína madura, y la variante B tiene una sustitución de Arg en esa posición (Figura 11).

1	Glu	Gln	Leu	Thr	Lys	Cys	Glu	Val	Phe	Arg in Variant B	Gln	Glu	Leu	Lys	Asp	Leu	Lys	Gly	Tyr	Gly	Gly
21	Val	Ser	Leu	Pro	Glu	Trp	Val	Cys	Thr	Thr	31	Phe	His	Thr	Ser	Gly	Tyr	Asp	Thr	Glu	Ala
41	Ile	Val	Glu	Asn	Asn	Gln	Ser	Thr	Asp	Tyr	51	Gly	Leu	Phe	Gln	Ile	Asn	Asn	Lys	Ile	Trp
61	Cys	Lys	Asn	Asp	Gln	Asp	Pro	His	Ser	Ser	71	Ile	Cys	Asn	Ile	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	
81	Leu	Asn	Asn	Asp	Leu	Thr	Asn	Asn	Ile	Met	91	Cys	Val	Lys	Lys	Ile	Leu	Asp	Lys	Val	Gly
101	Ile	Asn	Tyr	Trp	Leu	Ala	His	Lys	Ala	Leu	111	Cys	Ser	Glu	Lys	Leu	Asp	Gln	Trp	Leu	Cys
121	Glu	Lys	123	Leu	OH																

Figura11. Estructura primaria de α -LA. Se indica la posición de la sustitución del aminoácido que ocurre en la variante genética B.

La estructura terciaria de α -LA bajo condiciones nativas, se compone de un dominio grande (α) y un dominio pequeño (β) dividido por una hendidura. El dominio α (1-34 y 86-123) contiene tres α -hélices estables al pH: H1, H2, y H3, una α -hélice pH dependiente H4, y dos hélices cortas 3_{10} : h1 y h3 [43]. El dominio β 35-85 se compone de tres cadenas pequeñas de hojas plegadas β antiparalelas (línea S1, S2, y S3) y de una corta hélice 3_{10} (H1B, h2 y h3c) [44] (Figura 12).

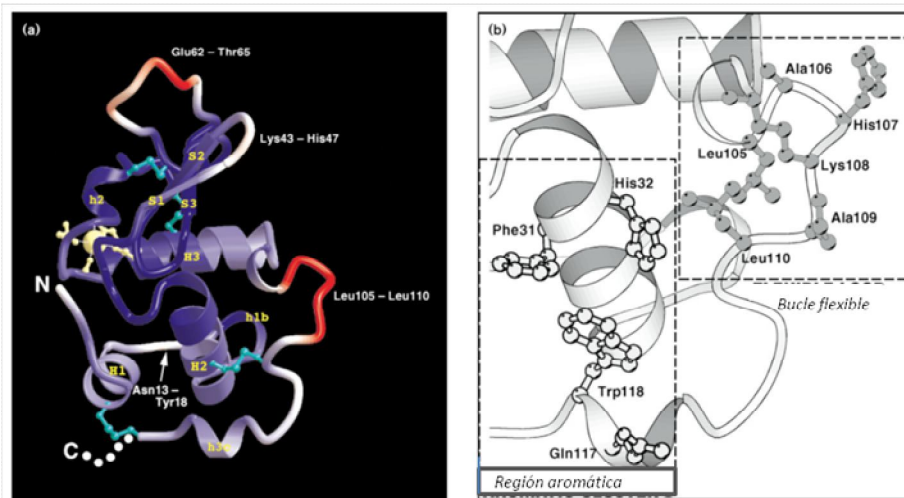


Figura 12. Estructura de α -LA y localización de los sitios funcionales [43]. (a) La estructura de GPLA (α -LA refinada de cobaya) está representada en el esquema. La localización de los principales elementos de estructura secundaria son resaltados (H: α -hélice, S: hebra β , h: hélice 3₁₀). El sitio de unión a calcio (amarillo) y los cuatro puentes disulfuro (verde) también son mostrados. Las partes de la estructura que exhiben el mayor grado de variabilidad conformacional son marcadas en blanco. La terminación N y C son también marcadas. Los residuos en C terminal (luego de Cys120) los cuales no fueron incluidos en la comparación son representados por puntos blancos. La figura fue creada por una versión modificada de (R Esnouf, Oxford) MOLSCRIPT y renderizada usando RASTER3. (b) Se muestra un primer plano de las regiones funcionales de α -LA. La molécula de α -LA es vista en una orientación idéntica a la de (a). Grupo aromático I (Phe31, His32, Gln117 y Trp118) y la región del bucle flexible (Leu105-Leu110) se muestran en cajas. (Figura producida utilizando MOLSCRIPT).

Esta proteína es muy atractiva para los estudios de las propiedades y de estructura de los estados intermedios como el glóbulo fundido (molten globule) ya que a pH ácido y en el estado apo- α -LA, adopta una estructura de glóbulo fundido clásico.

En la Figura 13 se muestra un modelo de cinta de α -LA con Ca^{2+} y sin Ca^{2+} (apo- α -lactoalbúmina). La unión al calcio estabiliza el estado nativo de α -LA, de tal manera que la temperatura induce el despliegue de α -LA desde los 200 °C para la apo-proteína hasta casi 700 °C para la proteína unida a Ca^{2+} . Tanto las formas unida a Ca^{2+} y libre puede adoptar prácticamente la misma conformación plegada a baja temperatura [45]. Además, el replegamiento correcto y la reparación correcta de los puentes disulfuro de la α -LA reducida requiere de la presencia de Ca^{2+} (Farkas et al., 2005).

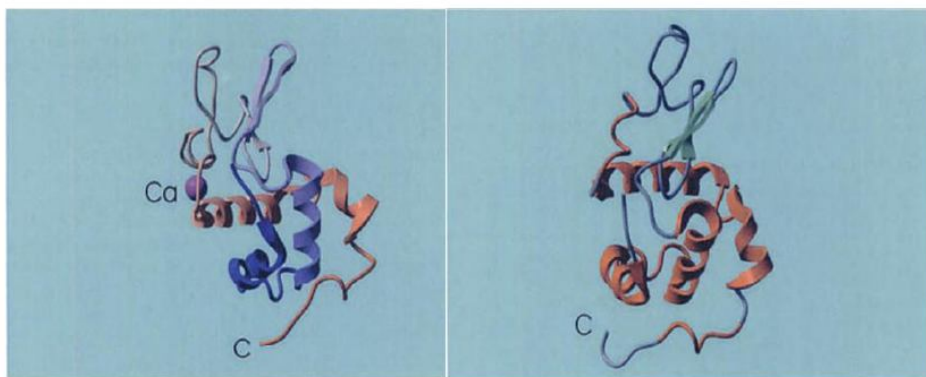


Figure 13. Modelo de cinta de α -LA bovina con Ca^{2+} y libre de Ca^{2+} [45].

Estructura y características de β -caseína

Estructura de β -caseína: La secuencia primaria de β -caseína se puede ver en la Figura 15, con sus distintas variantes genéticas. De todas las caseínas, β -caseína es la más hidrofóbica. El dominio N-terminal contiene un grupo de fosfoserinas aniónicas y es muy distinto del dominio C-terminal muy hidrofóbico. Es una molécula muy anfifílica con una región polar conteniendo en un décimo de la cadena peptídica, un tercio de la carga total. Esta proteína es rica en prolina, por lo que posee una estructura terciaria abierta desestructurada (Figura 14). β -CN es una proteína flexible poco estructurada a las que se las ha denominado reomórficas [29].

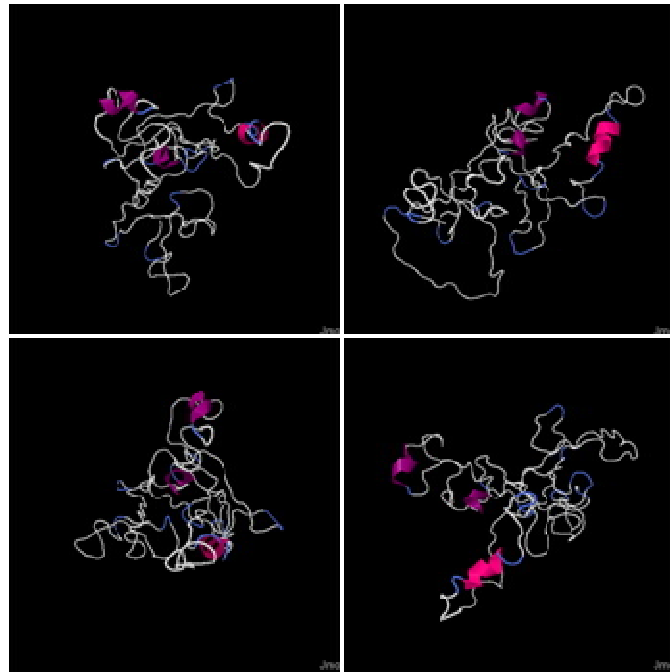


Figura 14. Modelo estructural de β -caseína. Programa Jmol [46].

Funcionalidad de la β -caseína: β -caseína forma alrededor del 30% de las caseínas y es una de las más solubles y más activa en superficie [12], por su naturaleza anfifílica puede formar agregados de tipo surfactante o submicelas [12]. El equilibrio entre la β -caseína libre o molecular y su forma micelar está fuertemente influenciada por la concentración de β -caseína, la temperatura y el calcio contenido [12]. A bajas concentraciones de β -caseína, las repulsiones son predominantes, de manera que los monómeros se dispersan en la solución. Sin embargo, a la concentración micelar crítica (CMC), β -caseína interacciona a través de interacciones hidrofóbicas y forma micelas de β -caseína con un núcleo hidrofóbico y menos densa capa externa hidrofílica. El número de micelas y sus tamaños dependen de la temperatura debido a las interacciones hidrofóbicas aumentan al incrementarse la temperatura. Por lo tanto, a bajas temperatura β -caseína está en un estado molecular. La estabilidad de una solución micelar es la consecuencia de la repulsión electrostática entre micelas debido a su capa externa hidrofílica. La

adición de calcio induce la agregación de micelas a través de la asociación con fosfo-serinas localizadas en la parte hidrofílica de la caseína [12].

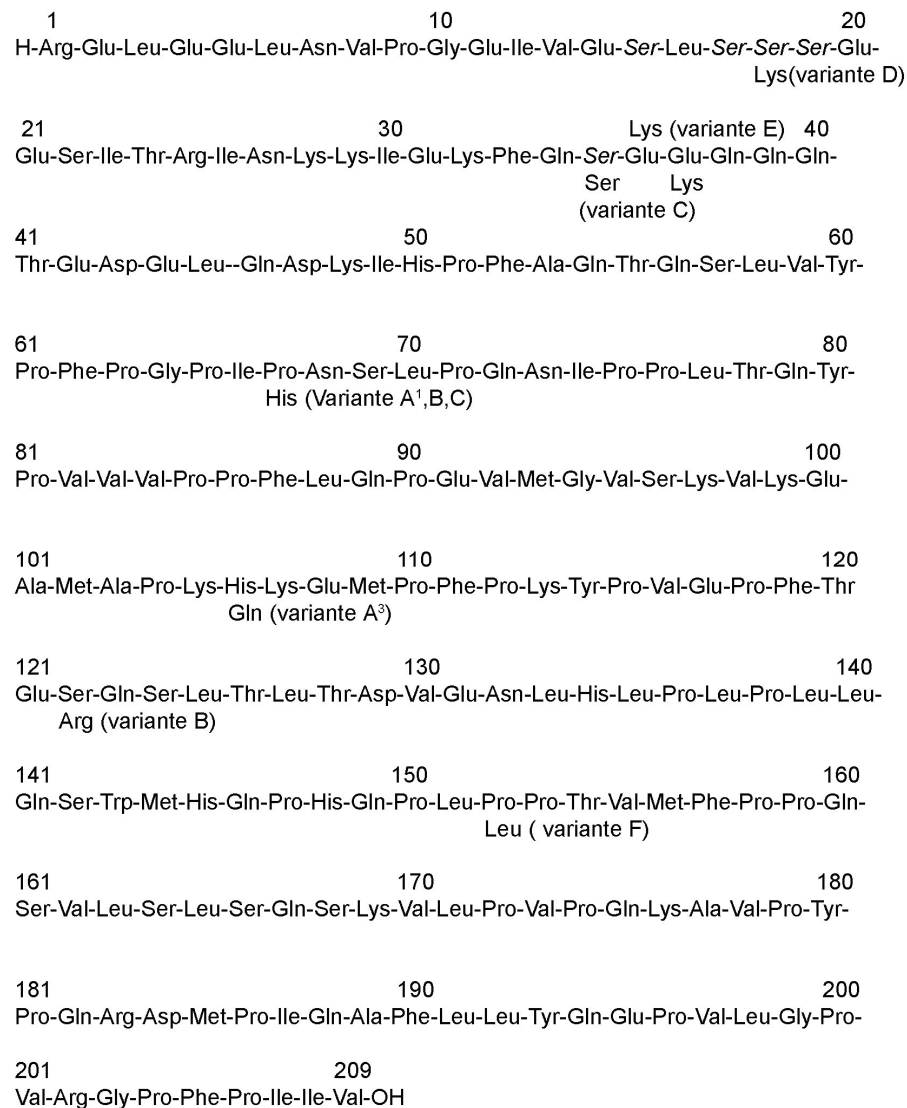


Figura 15. Estructura primaria de β -caseína A²-5P. Se muestra la sustitución de aminoácidos para las variantes genéticas A¹, A³, B, C, D, E y F [1]. Los sitios de fosforilación están indicados en letra itálica.

CAPÍTULO 3: PROCESAMIENTO TECNOLÓGICO DE LA LECHE

COAGULACIÓN DE LA LECHE POR QUIMOSINA

La propiedad más importante de las micelas de caseína a nivel industrial es su capacidad de coagular por acción de enzimas o acidificación, lo cual permite separarlas de las proteínas del suero. La coagulación de las caseínas es una de las formas de evaluar la funcionalidad de las proteínas de la leche, ésta se realiza mediante la determinación del rendimiento de coágulo húmedo y seco [47].

En el proceso de fabricación de quesos, la coagulación de las caseínas de la leche es la primera etapa del proceso. En esta etapa se utilizan diversas enzimas de origen animal (renina, que contiene quimosina y pepsina), recombinante (quimosina pura) o de origen vegetal, que al ser agregadas a la leche, corta en una secuencia específica de las κ -caseínas sobre los residuos Phe y Met (105 y 106), liberando la región hidrofílica rica en glúcidos de la κ -caseína (glicomacropéptido), y dejando la parte hidrofóbica (para- κ -caseína). Esto produce la desestabilización de las micelas y su agregación, comenzando el proceso de coagulación [48].

Las micelas de para- κ -caseína son inestables frente a las concentraciones de calcio iónico normalmente presentes en la leche (1,5- 2 mM) [48].



Para que la actividad de quimosina sea óptima, es preciso que haya suficiente concentración de iones de calcio en el medio y condiciones adecuadas de pH, temperatura y concentración de la enzima. La quimosina tiene una temperatura óptima comprendida entre 40-42°C. A temperaturas superiores o inferiores, el tiempo de coagulación aumenta. A temperaturas de refrigeración, la hidrólisis de la κ -caseína tiene lugar, pero para que ocurra la coagulación se requieren temperaturas superiores a 20°C. El pH óptimo de la quimosina se encuentra en valores en los que la leche se coagula por acidez (pH 4,7) por alcanzar el punto isoeléctrico. Sin embargo, en medio alcalino la enzima llega a inactivarse, primero de forma reversible (pH 7,3) y luego de forma irreversible (pH 8) [8, 48].

FABRICACIÓN DE LECHE EN POLVO

La primera referencia a la manufactura de la leche en polvo como método de preservación de la leche fue aportada por Marco Polo, quien observó el uso de leche en polvo por los soldados Mongoles en el siglo XIII. El secado por esprayado o atomización de un alimento dentro de una corriente de aire caliente, fue desarrollado por la industria química en 1872. Se define como leche en polvo, deshidratada o desecada, al producto obtenido por deshidratación de la leche apta para la alimentación, mediante procesos adecuados. En función del contenido de materia grasa existen distintas clasificaciones: entera ($\geq 26\%$ peso en peso), parcialmente descremada (12 a 17% p/p) y descremada ($< 2\%$ p/p) [1].

Se requiere leche con elevada calidad microbiológica. Puede ser utilizada la bactofugación o microfiltración para remover las células bacterianas y esporas de la leche, y además asegurar una leche de alta calidad microbiológica. La leche generalmente se estandariza, usualmente a una relación de grasa a sólidos no grasos de 1:2,76, para controlar el contenido de grasa del polvo final [9].

Pre calentamiento y concentración:

El pre calentamiento de la leche antes de la evaporación asegura la calidad microbiológica del concentrado y del polvo final, pero es también un paso crítico en el control de las propiedades funcionales del polvo. El pre calentamiento es por lo tanto el paso en el cual se desnaturalizan muchas de las proteínas del suero. Generalmente la leche en polvo descremada se clasifica de acuerdo al tratamiento de pre calentamiento empleado. Hay tres categorías de pre calentamiento principales: calor bajo (75 °C por 15 segundos), calor mediano (75°C por 1-3 min) y calor alto (calentamiento a 80 °C por 30 min ó 120 °C por 1 min). La leche es calentada a 85-95 °C por varios minutos para asegurar la inactivación de las lipasas endógenas y para exponer los grupos sulfhidrilos antioxidantes [1].

Luego del pre calentamiento la leche es concentrada a 45-50% o 42-48% de sólidos totales para leche entera o descremada, respectivamente, en un evaporador de efecto múltiple. Como una alternativa a la evaporación, se puede utilizar una membrana de procesamiento para aplicaciones específicas. Mientras que procesos como la ultrafiltración fraccionan constituyentes, la osmosis inversa o la hiperfiltración o nanofiltración remueve esencialmente solo el agua, y además puede servir como un paso de preconcentración [1].

Luego de la concentración, la leche puede ser homogeneizada. Convencionalmente se utilizan dos etapas de homogeneización a una temperatura en el intervalo de 60 a 70 °C. Las presiones típicas de homogeneización son 15 MPa, seguida de 5 MPa [1].

Secado:

Actualmente, la leche se produce en su mayoría por secado por atomización, que en general, mantiene las propiedades físico-químicas de los productos y que en algunos casos llega a mejorar esas propiedades [1].

El proceso se caracteriza en pulverizar el fluido dentro de una cámara sometida a una corriente controlada de aire caliente. Este fluido es atomizado en millones de microgotas individuales mediante un disco rotativo o boquilla de pulverización. A través de este proceso el área de la superficie de contacto del producto pulverizado se aumenta enormemente y cuando se encuentra dentro de la cámara con la corriente de aire caliente de secado se produce la vaporización rápida del solvente del producto, generalmente agua, provocando que el centro de cada microgota donde se encuentra el sólido, se seque suavemente sin sufrir un gran choque térmico, transformándose en polvo y terminando el proceso con la colecta del mismo [1].

El proceso de fabricación de leche en polvo es capaz de producir alteraciones en los componentes de la leche, como consecuencia de las altas temperaturas empleadas [49]. Estas alteraciones pueden modificar la hidrofobicidad y estructura nativa de las proteínas lácteas, y afectar a la solubilidad y dispersabilidad de la leche [50-52].

TRATAMIENTOS PARA REDUCIR LA CARGA MICROBIANA EN ALIMENTOS

La pasteurización es el tratamiento térmico de la leche que se utiliza comúnmente para destruir a la mayoría de los microorganismos patógenos, como *Micobacterium tuberculosis*. Inicialmente se calentaba la leche a 63 °C por 30 min, porque de esa forma se podía reducir en doce ciclos logarítmicos la cuenta microbiana de *Coxiella burnettii*, el patógeno más termorresistente que crece en la leche. Actualmente la pasteurización se lleva a cabo en sistemas continuos de intercambiadores de calor de placas o tubos, en los que la leche se somete a una temperatura de 71-72 °C durante 15 a 20 s de tratamiento efectivo. Además de la destrucción estos patógenos, se eliminan las bacterias coliformes y se inactiva la fosfatasa alcalina, pero no así las esporas o la peroxidasa, ni las bacterias un poco más termorresistentes, como las lácticas (no patógenas pero si fermentativas), y por lo tanto se requiere de refrigeración para su conservación por varios días. Si se desea producir una leche que dure varios meses se utiliza el calentamiento a 145-160 °C por 1 a 4 s, o la esterilización, en la cual la leche se calienta a 121 °C por varios minutos [53].

Los tratamientos térmicos utilizados para reducir la carga microbiana producen una disminución en la calidad de sus componentes, modificando las características, tanto sensoriales (textura, sabor y color), como nutricionales (pérdidas de vitaminas, principalmente) del alimento [54-55]. La demanda creciente de alimentos sin procesamientos severos ni aditivos sintetizados químicamente ha incentivado la búsqueda de tecnologías alternativas al tratamiento térmico para la conservación y reducción de la carga microbiana en alimentos. Los distintos métodos de conservación de alimentos procuran incrementar la vida útil de los productos durante su almacenamiento, aplicando técnicas que impidan alteraciones microbiológicas y mantengan la calidad del producto. Se encuentran en desarrollo procesos no térmicos de conservación, entre ellos el tratamiento por luz UV y por alta presión [56-60].

El tratamiento UV se emplea para desinfectar aire, agua y superficies de materiales con posible contaminación biológica (virus, bacterias, esporas, mohos, levaduras) [61]. La radiación UV se utiliza en diferentes sectores de la industria de alimentos, debido al efecto nocivo que causa sobre el ADN de muchos microorganismos. La radiación UV se utiliza generalmente para la desinfección de aguas, y para desinfectar y aumentar la vida útil de jugos de frutas y verduras, y se ha probado como método alternativo a la pasteurización de la leche por calor [62-63]. Sin embargo, aún es necesario probar las condiciones óptimas de flujo y tiempo de exposición para lograr una pasteurización por UV adecuada sin producir alteraciones sensoriales de la leche [63].

El uso de la tecnología UV con fines de desinfección involucra a la región ultravioleta del espectro electromagnético, con un rango de longitud de onda entre 100 y 400 nm. Éste puede subdividirse en: a) UV de onda corta UV-C entre 200 y 280 nm (rango germicida), b) UV de onda media UV-B entre 280 y 315 nm, y c) UV de onda larga UV-A entre 315 y 400 nm. La máxima eficiencia para la desinfección se sitúa en 254 nm [61]. La radiación UV produce cambios fotoquímicos, cuyos efectos pueden variar según la especie de microorganismo que se trate. El mecanismo de acción letal depende de su absorción por el ADN, pudiendo detener el crecimiento celular y provocar la muerte. La radiación absorbida por el ADN produce cambios químicos en los nucleótidos timina y citosina. Esto produce distorsiones en la conformación del ADN interfiriendo en el apareamiento normal de las bases, produciendo como resultado el bloqueo de la síntesis del ADN y consecuentemente quedando afectadas las funciones celulares

pudiendo provocar la muerte [61]. Los efectos en los enlaces cruzados son proporcionales al tiempo de exposición e intensidad de la luz UV [64, 61, 63].

El tratamiento UV es elegido en la industria por la creencia de que se trata de un proceso que no altera las propiedades organolépticas de los productos y reduce el uso de sustancias químicas. Esto, no necesariamente es cierto, ya que se ha observado que la irradiación UV, así como por la luz fluorescente producen cambios químicos de los componentes de los alimentos irradiados, produciendo aromas y sabores desagradables [65-66]. El uso de la irradiación ultravioleta para aumentar la vida útil post elaboración, conlleva a un aumento de la oxidación lipídica [67] y a modificaciones proteicas.

ALMACENAJE DE LA LECHE EN GÓNDOLAS ILUMINADAS CON LUZ FLUORESCENTE

La leche es comercializada en contenedores claros, translúcidos y opacos que son exhibidos en refrigeradores iluminados con luz fluorescente y que permiten el paso de la luz favoreciendo la oxidación lipídica [68]. La exposición lumínica de la leche causa la aparición de lípidos y proteínas peroxidadas y disminuye la concentración de vitaminas y aminoácidos esenciales [69]. La oxidación de la leche por luz puede producir una disminución en su calidad nutricional y la generación de aromas y sabores desagradables que la hagan inaceptable para los consumidores [70-72].

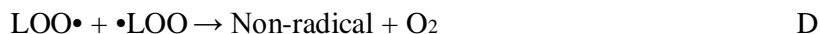
CAPÍTULO 4: OXIDACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA LECHE

Frecuentemente, los aromas desagradables de la leche han sido atribuidos a la oxidación de lípidos [73-74] o a reacciones de Maillard con los consecuentes productos de glicosilación avanzada [75]. Se encuentra abundante literatura sobre la oxidación de los lípidos y azúcares y sus efectos biológicos [76-78]. Sin embargo, las proteínas, péptidos y aminoácidos también son susceptibles a cambios oxidativos [79]. Las características de la oxidación proteica pueden variar de acuerdo al oxidante utilizado y al tipo de leche expuesta, dependiendo de su composición química (cantidad y el tipo de lípidos, los antioxidantes y los prooxidantes, y de las condiciones de almacenamiento) [80]. La oxidación de las proteínas aisladas de leche por luz y por otros agentes oxidantes es un tema que ha sido muy poco estudiado, y en general, el conocimiento sobre las consecuencias de la oxidación de proteínas en los alimentos es escaso [81-83].

OXIDACIÓN DE LÍPIDOS

La oxidación de lípidos es de importancia ya que puede ser la causa de la generación de productos radicalarios que puedan, a su vez, oxidar a las proteínas, así como la formación de productos secundarios que interaccionen con las proteínas produciendo aductos lípido-proteína [84-85].

Los lípidos pueden sufrir oxidación por la exposición a la luz, a la alta temperatura, y a distintos agentes oxidantes capaces de producir radicales libres. El mecanismo por el cual los lípidos sufren peroxidación por el ataque de un radical libre se describe a continuación (Ecuaciones A a D). Se abstrae el hidrógeno de los lípidos insaturados, que resulta en la formación de un radical lipídico ($L\cdot$) carbono central. $L\cdot$ reacciona con O_2 paramagnéticos fácilmente disponibles para formar un radical peroxilo ($LOO\cdot$) de lípido. Estos radicales peroxilo propagan la reacción en cadena por reacción con los lípidos cercanos para formar hidroperóxidos lipídicos ($LOOH$) y otro lípido radical centrado en el carbono. La reacción en cadena es terminada por reacción entre dos radicales peroxilo para formar una especie no radicalaria y O_2 [86]



En presencia de luz, las grasas también pueden formar hidroperóxidos por medio de la reacción con el oxígeno singlete producido por fotooxidación sensibilizada [86]. La ruptura de los

hidroperóxidos por el oxígeno singlete produce que se continúe con la autooxidación de los lípidos por radicales libres, como se observó en las ecuaciones A a C, donde se propaga la oxidación [86].

La peroxidación de lípidos conduce a menudo a la formación de especies tóxicas alquenal reactivas, tales como 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), (2-propano-1-al) acroleína y malonaldehído (Figura 16). Estos alquenales se unen a la proteína mediante adición de Michael para formar aductos covalentes con la cisteína, residuos de lisina o histidina (Figura 17) formando productos de carbonilación de proteínas [84]. Además, la reacción de uno de los dos grupos aldehído del producto de peroxidación lipídica, malonaldehído, con grupos α -amino de la lisina de las proteínas, produce una base de Schiff que posee una función carbonilo (Figura 18) [82]. La oxidación de lípidos puede ser reducida con antioxidantes solubles en lípidos, tales como α -tocoferol [87].

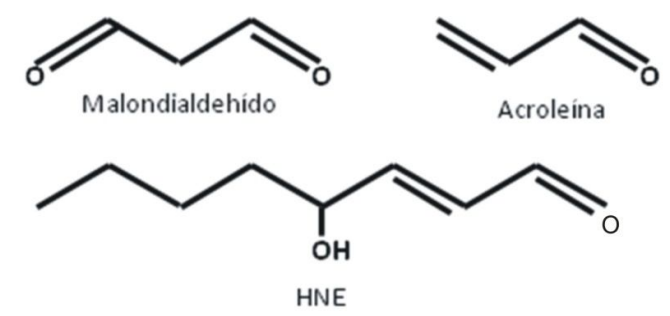


Figura 16. Estructuras químicas del malondialdehído (MDA), acroleína, y 4-hidroxi 2-nonenal (4-HNE). No se expresa la estereoquímica.

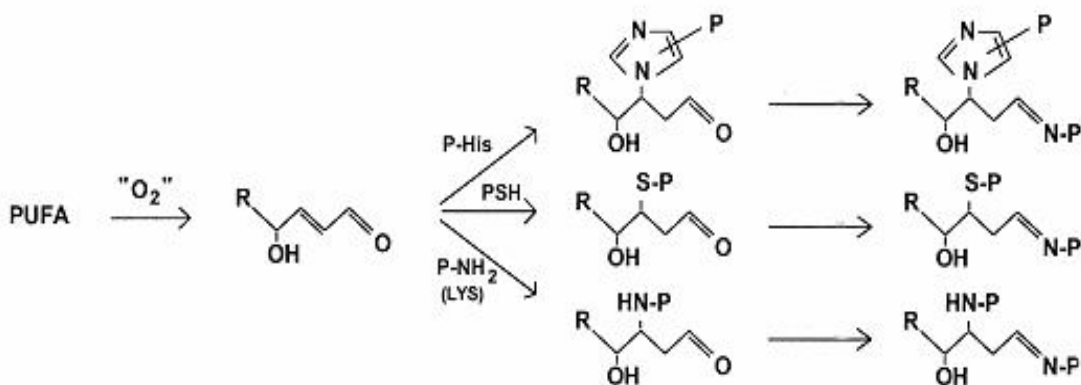


Figura 17: Reacción de alquenales reactivos con residuos de aminoácidos histidina, cistina y lisina para formar aductos de Michael (proteínas con grupos carbonilos proteicos). P1: otras proteínas. La figura también muestra la formación de derivados con enlaces cruzados con las proteínas. [82].

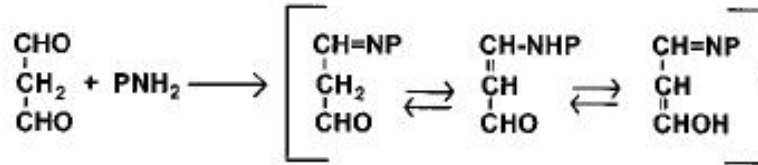


Figura 18: Formación de productos de carbonilación proteica por medio de la reacción del grupo amino con el producto de peroxidación lipídica malonaldehído (MDA). PNH₂: grupo amino de la cadena lateral de aminoácido de una proteína.

Los dienos conjugados

Los ácidos grasos insaturados poseen uno o más dobles enlaces carbono-carbono en su cadena carbonada. Casi inmediatamente después de que se forman los peróxidos lipídicos, los dobles enlaces no conjugados (C = C - C - C = C) que están presentes en los lípidos insaturados de la leche se convierten en enlaces dobles conjugados (C = C - C = C). Los dienos conjugados absorben la radiación ultravioleta fuertemente a 233 nm, mientras que los trienos conjugados absorben a 268 nm. Así, la oxidación puede ser seguida por la disolución del lípido en un disolvente orgánico adecuado y midiendo el cambio de absorbancia con el tiempo, utilizando un espectrofotómetro UV-visible [88]. En las últimas etapas de la oxidación de lípidos, los dienos conjugados (que son productos primarios de la oxidación) se descomponen en productos secundarios (que no se adsorben luz UV-visible fuertemente) que conduce a una disminución de la absorbancia. Este método es por lo tanto sólo es útil para el seguimiento de las primeras etapas de la oxidación de lípidos [88-89].

OXIDACIÓN DE AZÚCARES

La interacción de azúcares reductores o compuestos dicarbonílicos derivados a partir de azúcares también es capaz de producir la formación productos de carbonilación de proteínas, como se muestra en la Figura 19 [90].

GLICACIÓN/GLICOSILACIÓN

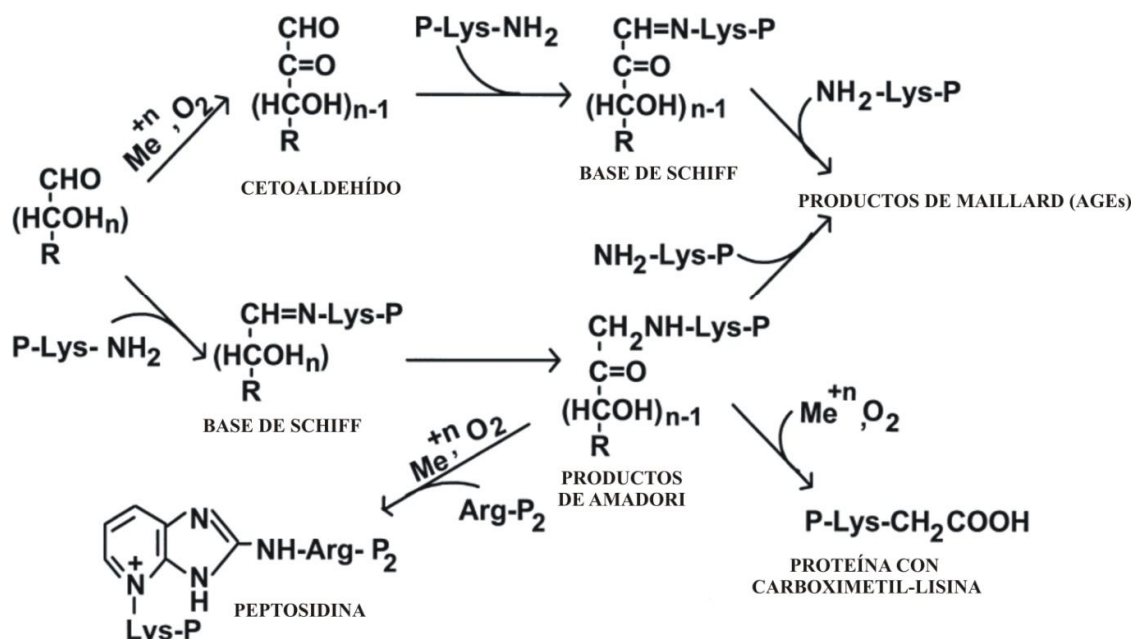


Figura 19. Formación de productos de carbonilación proteica e interacciones proteína-proteína por medio de reacciones de glicación/glicosilación. Meⁿ⁺: catión metálico con carga n. Lys-P: residuo lisina en la molécula de proteína. Arg-P₂: residuo de arginina en otra molécula de proteína. AGEs: productos finales de glicosilación avanzada.

OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS

La producción de proteínas oxidadas y su acumulación está involucrada en el envejecimiento natural de las proteínas tisulares, así como en la patogénesis de la aterosclerosis, hiperlipemias, enfermedades inflamatorias y autoinmunes [91-93].

Las proteínas en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos son propensas a reacciones de oxidación. Se produce oxidación de los aminoácidos y las proteínas por medio de la reacción con radicales libres generados como subproductos de los procesos metabólicos normales, ó por factores externos tales como tratamientos físicos (calentamiento, presión, agitación y bombeo), reacciones fotoquímicas e irradiación (γ -, x-, y UV), la interacción con compuestos químicos (Cu⁺, Fe²⁺, Glutación, HOCl, O₂, H₂O₂, lípidos peroxidados), y enzimas oxidoreductasas. [79, 94]. La oxidación de proteínas y aminoácidos es afectada por muchos factores como el pH, temperatura, actividad de agua, y la presencia de catalizadores o inhibidores [95]. Los radicales libres pueden reaccionar directamente con la proteína o pueden reaccionar con otras moléculas tales como lípidos y carbohidratos, formando productos que posteriormente reaccionan con las proteínas (Figura 20).

En la Figura 20 se muestran las vías más comunes por las cuales se oxidan las proteínas [96].

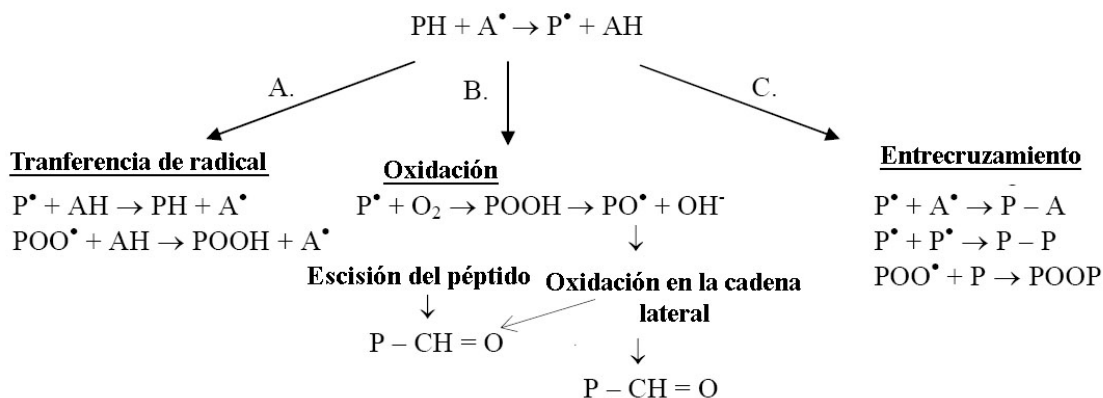


Figura 20. Vías de oxidación de proteínas a través de: A) la transferencia de los radicales libres, B) la oxidación, y C) formación de entrecruzamientos PH = proteína, P• = proteína radical, AH = cualquier molécula con átomos de hidrógeno que se puede abstraer. A• = radical no proteico, PO• = radical alcoxilo, POO• = radical peroxilo, POOH = hidroperóxido, P-CH=O = productos secundarios tales como los aldehídos.

Las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos son los sitios de oxidación de las proteínas. Estos pueden conducir a la fragmentación de la cadena polipeptídica, la formación de agregados proteína-proteína y a la formación de enlaces cruzados, que a menudo cambian la conformación, incluyendo la desnaturalización de la proteína funcional y por lo tanto la inactivación de la proteína [84]. Estos cambios producen frecuentemente aumento en la exposición de residuos hidrofóbicos de las proteínas, pudiendo modificar la capacidad intrínseca de la función proteica, tales como la unión a receptor o a ligandos y la interacción con bicapas lipídicas de membrana.

Cambios en la estructura primaria de la proteína. Oxidación de aminoácidos

Durante la oxidación proteica se produce la oxidación de los grupos sulfhidrilo y se forman grupos carbonilos en las cadenas laterales. Las tirosinas pueden entrecruzarse, clorinarse, nitrosarse, o hidroxilarse, los triptófanos sufren modificaciones, se forman hidroperóxidos a partir de los aminoácidos alifáticos y se producen aductos de peroxidación lipídica. También se han informado casos de productos de oxidación formados a partir de la modificación de dos residuos adyacentes [97].

En la tabla 6 se observan los productos de oxidación de aminoácidos conocidos [85].

Amino ácidos	Productos de oxidación
Cisteína	cistina, ácido cístico
Metionina	sulfóxido de metionina, sulfona de metionina
Triptofano	2-, 4-, 5-, 6-, y 7-hidroxitriptofano, nitrotriptofano, quinurenina, 3-hidroxikinurina, <i>N</i> -formilquinurenina
Fenilalanina	2,3-dihidroxifenilalanina (DOPA), <i>m</i> - y <i>o</i> -hidroxifenilalanina, dímeros de aminoácidos hidroxilados
Tirosina	3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), tirosina-tirosina (ditirosina) enlaces cruzados, Tyr-O-Tyr, nitrotirosina, clorotirosina
Histidina	2-oxohistidina, asparagina, ácido aspártico
Arginina	semialdehído glutámico, ácido 5-hidroxi-2-aminovalérico
Lisina	α -semialdehído aminoadípico, hidroperóxidos y hidróxidos de lisina
Prolina	2-pirrolidona, 4- y 5-hidroxiprolina, ácido piroglutámico, semialdehído glutámico, hidroperóxidos de prolina
Treonina	2-amino-3-cetobutírico
Ácido Glutámico	ácido oxálico, ácido pirúvico, hidroperóxido de ácido glutámico
Valina	hidroperóxidos y hidróxidos de valina, compuestos carbonílicos
Glicina	ácido aminomalónico
cadenas laterales de aminoácidos no aromáticos	compuestos carbonílicos

Tabla 6. Productos de oxidación de aminoácidos.

Formación de grupos carbonilos

Los grupos carbonilos en las proteínas pueden ser producidos por tres vías:

- Por clivaje oxidativo de la cadena de aminoácidos por la vía de reacción de la α -amidación, o por el clivaje asociado con la oxidación de residuos glutámicos [98].
- Por reacciones secundarias de las cadenas laterales de aminoácidos con productos de oxidación lipídica (por ejemplo: MDA y HNE), por medio de la formación de aductos de Michael con residuos lisina, histidina, y cisteína para formar productos finales de lipoxidación avanzada (Figura 17 y 18).
- Por reacciones de glicación/glicosilación de grupos amino de Lys, con azúcares reductores, formando productos finales de glicosilación avanzada [99] [98-99] (Figura 19).

Los grupos carbonilos proteicos generados por cualquiera de estos mecanismos pueden reaccionar además con grupos amino de residuos lisina en la misma u otra molécula de proteína para formar derivados con enlaces cruzados inter o intra-molécula de proteína [90].

Los carbonilos proteicos generados por la oxidación de las cadenas laterales de los aminoácidos son: 2-pirrolidona a partir de la oxidación directa de residuos Pro, semialdehído glutámico a partir de Pro y Arg, semialdehído aminoadípico a partir de Lys, ácido 2-amino-3-cetobutírico resultante de la oxidación directa de residuos Thr, y oxohistidina a partir de Hys [100]. Los primeros cuatro productos se muestran en la Figura 21.

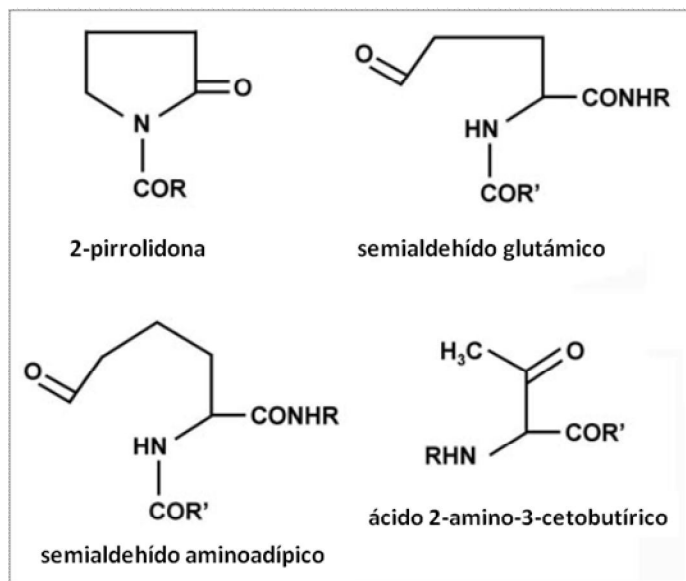
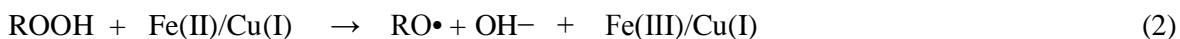
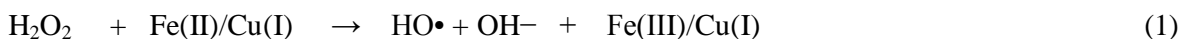


Figura 21. Estructuras químicas de carbonilos proteicos producto de la oxidación directa de las cadenas laterales de aminoácidos proteicos. Se muestra la estructura de: 2-pirrolidona (resultante de la oxidación directa de residuos Pro), semialdehído glutámico (resultante de la oxidación directa de residuos Arg o Pro), semialdehído α -aminoadípico (resultante de la oxidación directa de residuos Lys), y ácido 2-amino-3-cetobutírico (resultante de la oxidación directa de residuos Thr).

Un valor típico de contenido de grupos carbonilos en órganos de animales jóvenes sanos es de 2 nmol/mg proteína (~0.10 mol carbonilos/mol proteína), por lo tanto en promedio hay 1 en 10 moléculas de proteínas que poseen un grupo carbonilo en un tejido sano.

Oxidación de proteínas catalizadas por metales

Dependiendo de las condiciones ambientales y dietarias, cualquier sistema prooxidante es capaz de dañar las proteínas. Los peróxidos por si mismos son compuestos relativamente no reactivos. Sin embargo, en presencia de metales de transición, Fe(II) o Cu(I), son convertidos en radicales libres altamente reactivos: hidroxilo (1) o radical alcoxilo (2) las cuales son capaces de reaccionar con la mayoría de los compuestos orgánicos.



A altas concentraciones de H₂O₂ y Fe(II) o Cu(I) ó radiación ionizante todo tipo de residuo de aminoácido de proteína es un blanco potencial para la oxidación [101, 87]. Sin embargo, a bajas

concentraciones de hierro o cobre y H_2O_2 el daño proteico parece ser limitado a la modificación de los residuos aminoácidos en los sitios de la proteína que tiene unido un metal. En la Figura 22 se muestra la oxidación de proteínas bajo condiciones fisiológicas. Este es un proceso sitio-específico en el cual, la unión al Fe(II) o Cu(I) a sitios de unión a metales dentro de las proteínas es seguida por la reacción con peróxidos para generar especies reactivas ($OH\cdot$, $RO\cdot$) que reaccionará preferencialmente con residuos aminoácidos en el sitio de unión a metales [102-105].

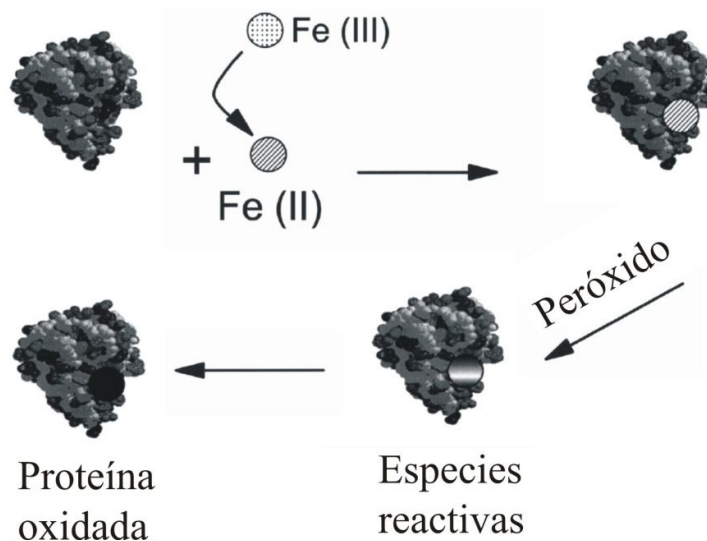


Figura 22. Oxidación de proteínas mediada por cationes divalentes.

Oxidación de Proteínas por luz

Cuando las proteínas se exponen a la luz UV o visible pueden darse dos procesos principales. El primero involucra la fotooxidación directa debida a la absorción de radiación UV por la proteína (primeramente las cadenas laterales) y grupos cromóforos unidos, generando estados excitados (sigletes o tripletes) o radicales vía foto-ionización. Estos mecanismos son a menudo llamados “Procesos Tipo I” [106]. El segundo proceso principal implica la oxidación indirecta de la proteína por medio de la formación y subsecuente reacción del oxígeno singlete (oxígeno molecular en su estado de oxidación primario $^1\Delta_g$; 1O_2) generado por la transferencia de energía del estado basal (triplete) del oxígeno molecular a los enlaces proteicos u otros cromóforos. Estas reacciones son conocidas como “Procesos de Tipo 2”. El oxígeno singlete puede ser generado por diversas reacciones enzimáticas y no enzimáticas, incluyendo procesos mediados por proteínas hémicas, lipoxigenasas, y leucocitos activados, así como reacciones de terminación radicalaria. [79]

El estado $^1\Delta_g$ del oxígeno molecular, que posee dos electrones en el mismo orbital molecular con espines apareados, se forma rápidamente y es solo 94 kJmol^{-1} por sobre el estado triplete basal ($^3\Sigma$), y posee una larga vida de $10^{-6} - 10^{-5} \text{ s}$ en ausencia de moléculas con las cuales pueda sufrir

una reacción rápida. Otros estados oxidados pueden ser formados (por ej. el estado $^1\Sigma_g$, el cual posee los dos electrones de mayor energía en diferentes orbitales con espines apareados), pero estos son de mayor energía ($\sim 158 \text{ kJ mol}^{-1}$ por arriba del estado triplete basal en el caso de $^1\Sigma_g$), son de vida corta, y usualmente sufren rápido decaimiento (con k de $\sim 10^{11} \text{ s}^{-1}$) en vez de reacción química. El estado $^1\Delta_g$ es por lo tanto el estado excitado más importante del oxígeno en reacciones de oxidación fotosensibilizadas en sistemas biológicos.

Generación de oxígeno singlete por luz en presencia de sensibilizadores endógenos y exógenos

La formación de oxígeno singlete por absorción de luz solar por aminoácidos presentes dentro de la estructura proteica es un proceso limitado en ausencia de cromóforos. Las proteínas no poseen usualmente ningún grupo funcional que absorba a longitudes de onda mayores a 320 nm. Los principales aminoácidos cromóforos presentes en las proteínas son triptofano (Trp), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), histidina (His), cisteína (Cys), y cistina [107]. Los demás aminoácidos no absorben de forma significativa a longitudes de onda mayores a 230 nm, y los enlaces peptídicos -C(O)-NH- solo exhiben una pobre banda de absorción a 210 nm-220 nm, la absorción de la cadena polipeptídica es despreciable [108].

La fotoquímica directa de las proteínas es dominada por las cadenas laterales de aminoácidos y ninguna de estas especies es muy eficiente para la generación de oxígeno singlete a partir de sus estados excitados [109]. Algunos productos de oxidación (particularmente del Trp), o sus derivados son más eficientes para la formación de oxígeno singlete [109]. Además, la formación de oxígeno singlete puede ser sensibilizada por las cadenas laterales de los aminoácidos presentes en la estructura proteica, en general esto es ineficiente y contribuye sólo en una forma minoritaria al flujo total de oxígeno singlete que puede ser generado dentro de una célula o tejido bajo circunstancias normales. En contraste, la exposición al UV o luz visible de una amplia gama de compuestos aromáticos (ej: derivados del naftaleno y antraceno) ó alquenos conjugados (ej: porfirinas, una amplia variedad de moléculas colorantes) genera estados excitados que pueden sufrir transferencia de energía rápida y eficiente del O_2 para producir $^1\text{O}_2\cdot$ [109].

La transferencia de energía para producir $^1\text{O}_2$ usualmente compite con la transferencia de electrones, por lo cual muchos fotosensibilizadores dan tanto $^1\text{O}_2$ así como radicales $\text{O}_2\cdot^-$. Las constantes de velocidad para la transferencia de energía para generar $^1\text{O}_2$ ($k \approx 1-3 \times 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) son generalmente más altas que aquellas para la transferencia de electrones para producir $\text{O}_2\cdot^-$ ($k \leq 1 \times 10^7 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), por lo que el proceso de formación predomina. El rendimiento de $^1\text{O}_2$ versus el radical, como es $\text{O}_2\cdot^-$, es muy dependiente del sensibilizador, la longitud de onda de excitación, y de las condiciones de reacción.

El $^1\text{O}_2$ puede interactuar con blancos potenciales por dos vías principales: desactivación (quenching) física y reacción química.

La mayoría de las reacciones de $^1\text{O}_2$ con aminoácidos, péptidos y proteínas se producen a través de vías químicas en lugar de vías físicas [110]. Para los residuos de Trp, las constantes de velocidad de reacción física y química son de magnitud similar [110], siendo afectadas las

contribuciones relativas de estos procesos por un número de factores que incluyen el medio ambiente local [79].

La presencia y la posición de los sustituyentes en el anillo indólico del Trp también afecta a la velocidad de estos procesos [111].

Las constantes de velocidad para la reacción química del $^1\text{O}_2$ con las cadenas laterales de otros aminoácidos libres varían dramáticamente, lo que resulta en el daño selectivo de residuos particulares. De los aminoácidos comunes sólo His, Tyr, Met, Cys, y cistina, además de Trp, reaccionan a velocidades significativas a valores de pH fisiológicos [112-113, 79]. Todas las otras cadenas laterales de aminoácidos reaccionan mucho más lentamente, con constantes de velocidad menores a $0,7 \times 10^7 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a valores de pH neutro [112]. A valores de pH altos, que es improbable que se encuentren fisiológicamente, Arg y Lys reaccionan rápidamente a través de sus formas no protonadas.

Oxidación de residuos triptófano

La reacción inicial de $^1\text{O}_2$ con Trp se cree que produce ya sea un diojetano a través del enlace C2-C3 o un doble hidroperóxido a C3 [114-115]. Se ha reportado posterior descomposición de estos intermediarios a través de la escisión del enlace C2-C3 para dar *N*-formilquinurenina, mientras que el cierre del anillo da lugar a 3 α -hidroperoxipirrolindol y 3 α -hidroxipirrolindol [114] (Figura 23). La descomposición de 3 α -hidroperoxipirrolindol a 3 α -hidroxipirrolindol también produce *N*-formilquinurenina [114-115]. La descomposición de los peróxidos iniciales puede implicar reacciones no radicalarias o ruptura homolítica del enlace -O-O- para formar radicales. La reducción de dos electrones de 3 α -hidroperoxipirrolindol da como resultado una conversión relativamente limpia a 3 α -hidroxipirrolindol [116]. Se ha demostrado que los iones metálicos y la luz UV catalizan la descomposición de los peróxidos a radicales [117]. La formación de 3 α -hidroperoxipirrolindol (y por lo tanto 3 α -hidroxipirrolindol) requiere una reacción de cierre de anillo que implica el grupo α -amino de los aminoácidos libres, que estarían menos disponibles en péptidos y en proteínas debido a su participación en la formación del enlace peptídico. Sin embargo, derivados de 3 α -hidroperoxipirrolindol son formados en péptidos protegidos y especies similares pueden ser formadas en proteínas. *N*-formilquinurenina y quinurenina son mejores fotosensibilizadores que el Trp y son más eficientes en la formación de $^1\text{O}_2$ durante la exposición a la luz. Además, la formación de *N*-formilquinurenina y quinurenina en proteínas puede resultar en la propagación del daño. La exposición UV prolongada exacerba el daño por medio de la descomposición de endo- e hidro-peróxidos iniciales [79].

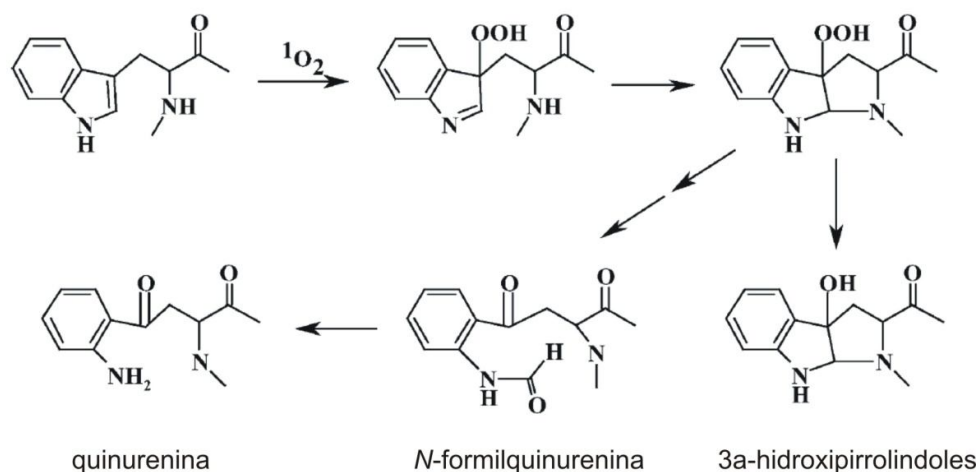


Figura 23. Formación de productos de oxidación del triptofano

Oxidación de residuos Tirosina

En estudios *in vitro* se ha identificado *o*-tirosina y *m*-tirosina como productos estables de la reacción entre un radical hidroxilo y una fenilalanina [101]. *o,o'*-Ditirosina es el producto final cuando los radicales hidroxilos reaccionan entre sí formando una unión entre dos tirosinas (Figura 23). La gran estabilidad de los enlaces ditirosinas “*in vivo*” [92] e “*in vitro*” [118] ha sido utilizada como marcador de oxidación proteica en algunos casos, ya que se requiere la existencia de aminoácidos tirosinas susceptibles de ser alcanzados por la acción de la luz y/o de los metales. La caseína es una de las proteínas con mayor cantidad relativa de tirosinas por lo tanto la formación de ditirosina en caseínas es un tema importante en el estudio de la oxidación de las proteínas lácteas.

La generación de enlaces ditirosina se produce *in vitro* por distintos agentes: irradiación ultravioleta, radicales $\bullet\text{OH}$ y $\text{N}_3\bullet$, NO_2 , peroxinitrito $-\text{ONOO}\bullet$, e hidroperóxidos lipídicos [119]. También se produce ditirosina por el tratamiento con enzimas peroxidasa del rábano y mieloperoxidasa [119].

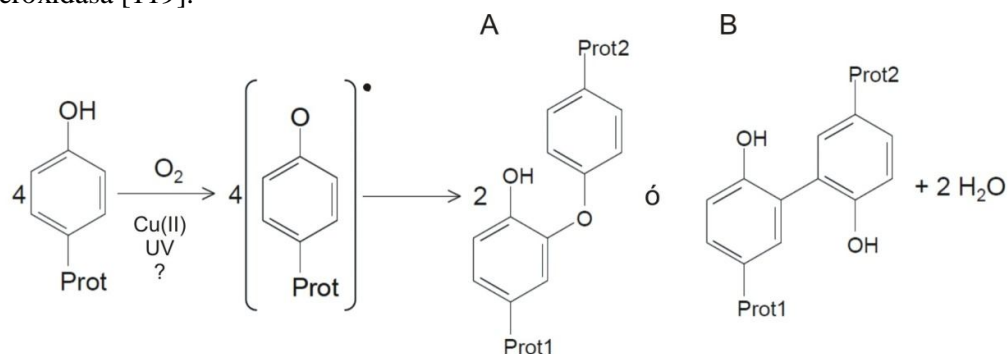


Figura 23. Formación de ditirosina produciendo el enlace entre dos moléculas proteicas distintas (Prot1 y Prot 2). A) *o,o'*-ditirosina B) *iso*-ditirosina.

La exposición de proteínas a rayos gama o a sistemas Fenton produce también otros productos de oxidación de tirosina en las proteínas como la 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) [120]. Este producto específico de la tirosina, en contraste con la formación de grupos carbonilos, puede estar presente en cantidades muy bajas.

La tirosina en las proteínas también puede formar productos carbonilos proteicos por oxidación [90]. En lipoproteínas de baja densidad, hay aproximadamente 1 DOPA por cada 1600 residuos Tyr [90]. Es normal que la determinación de DOPA en tejidos, dé valores con órdenes de magnitud menores que los asociados a carbonilos proteicos en la misma muestra [90].

Formación de polímeros, oligómeros y agregados

Hay evidencia considerable de la fácil formación de oligómeros y agregados de alto peso molecular en las proteínas expuestas a la luz [79]. Algunos de estos agregados pueden surgir de las reacciones de terminación radical-radical Tyr- radicales fenoxilo para dar ditirosina [79]. La agregación a través de formación de puentes disulfuros inter-moleculares parece ser un proceso común [79]. Otras reacciones también pueden dar lugar a la formación de agregados, y se ha informado que pueden surgir enlaces cruzados como resultado de reacciones secundarias u "oscuras" independiente de la formación continua de $^1\text{O}_2$ [79].

Se ha propuesto que los productos formados como resultado de la fotooxidación de residuos His pueden reaccionar con Lys, Cys u otros residuos His para dar entrecruzamientos, que pueden ser análogos a las bases de Schiff/productos de Amadori detectados en reacciones de compuestos carbonílicos de bajo peso molecular con cadenas laterales de residuos Lys y Arg [79].

La formación de polímeros proteicos entre proteínas del suero y caseínas ha sido descrita para leche tratada por calor [121]. La desnaturalización de β -LG parece ser el fenómeno clave que inicial para la formación de polímeros [122] y ha sido propuesto como marcador de leche procesada por calentamiento [123]. El calor induce un cambio conformacional que resulta en la exposición de un grupo tiol reactivo, el cual forma puentes disulfuro con otras proteínas que contienen cisteína como BSA, o con proteínas que poseen puentes disulfuro como α -LA, κ -CN, and α S2-CN [124]. El tratamiento térmico de la leche produce una mezcla compleja de proteínas del suero nativas y desnaturalizadas presentes como agregados de proteína del suero, agregados de CN con proteínas del suero, y micelas de caseína cubiertas de agregados de proteína de suero [125]. Aun no se conoce el efecto de la irradiación UV y FL en la generación de oligómeros y agregados de las proteínas de la leche.

Oxidación de proteínas en sistemas complejos: la matriz y la oxidación

Las proteínas comprenden alrededor del 68% del peso seco de las células y tejidos, y por eso son buenos blancos para el daño oxidativo e importantes en la calidad de los alimentos.

Ha sido descrito que para algunas matrices complejas de alimentos la fotooxidación afecta la estructura primaria de las proteínas produciendo cambios en los aminoácidos individuales, como los carbonilos proteicos, y pérdida de aminoácidos aromáticos [67, 80], y también se encontró formación de oligómeros y proteólisis en leche tratada por calor [126-127].

Las formulas infantiles están elaboradas con mezclas de leche, proteína del suero (expuesta a tratamientos térmicos y procesos de deshidratación), lípidos (ácidos grasos poliinsaturados), nucleótidos [80] y otros componentes adicionados para humanizar la leche y simular la composición de la leche materna, por lo cual la relación entre el estado oxidativo de las proteínas y los parámetros de calidad son difíciles de dilucidar. Además, se encontró que en estudios sobre los cambios que ocurren durante el almacenaje de las leches en polvo había polimerización proteica y disminución en la solubilidad, y que eran afectados por la temperatura y la humedad relativa [49, 128].

Hay poca literatura sobre las alteraciones oxidativas de las proteínas en leche, y el estado oxidativo de la leche en polvo no ha sido estudiado con profundidad. La mayoría de los estudios realizados se ha enfocado en la oxidación de los lípidos de la leche, por medio de la determinación de sus productos de oxidación como el malonaldehído y peróxidos lipídicos. Tampoco se han utilizado antioxidantes en leche en polvo para evaluar su capacidad para prevenir las modificaciones oxidativas en las proteínas, como la formación de carbonilos, o de enlaces ditirosina. Solo se han utilizado para inhibir la peroxidación lipídica y prevenir la aparición de aromas y sabores desagradables causados por la oxidación de los lípidos [129-130]. Se desconoce aún qué sucede en leche en polvo expuesta a la luz UV y fluorescente. No se ha descrito cómo la presencia de los distintos componentes de la matriz láctea puede afectar los procesos de oxidación de proteínas y qué cambios se producen en cada uno de los aminoácidos susceptibles y en las distintas estructuras de las proteínas de la leche.

REFERENCIAS

1. Fox P.F. y McSweeney P.L.H. eds. *Advanced Dairy Chemistry. Proteins*. 3rd. ed., ed. De Kruif CG H.C. 2003, Kluwer Academic/Plenum: New York. 233–76.
2. <http://www.primiciasrurales.com.ar/noticia-la-argentina-es-cuarto-productor-de-leche-en-polvo-y-se-analizan-mercados-a-futuro-7491.php>. *La Argentina es cuarto productor de leche en polvo y se analizan mercados a futuro*. 2010.
3. <http://www.comercioyjusticia.com.ar/2012/02/01/leche-en-polvo-exportaciones-creceran%20126-este-ano/>.
4. <http://www.comercioyjusticia.com.ar/2011/09/16/aporte-cordobes-decisivo-para-consolidar-el-boom-exportador-lacteo/>. *Aporte cordobés, decisivo para consolidar el boom exportador lácteo*. 2011.
5. Taverna M., Cuatrín A., Gaggiotti M., Páez R. y Chávez M. *Composición química de la leche producida en la Cuenca Lechera Central de la Argentina*. Rev. Arg. Prod. Anim . 2001. **21**(1): p. 271.
6. UFox P.F. y McSweeney P.L.H. eds. *Advanced Dairy Chemistry. Proteins*. 3rd. ed., ed. De Kruif CG H.C. 2003, Kluwer Academic/Plenum: New York. 233–76.
7. Pécora R.P., Gon G., Dalla Costa C.A., Hantis D. y Kivatinitz S.C. *Variación anual de la composición química de la leche de vaca de la cuenca lechera de Córdoba, Argentina*, in *CESIA-CIBSA* Zalazar M.R.y.J., Editor. 2008, Univ. Politécnica de Cataluña, Centro Internacional de Métodos Numéricos en Ingeniería. : Barcelona, España.
8. Fox P.F. y McSweeney P.L.H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. 3rd. ed, ed. Fox P.F. 1998, Cork: Blackie Academic & Professional.
9. Fox P.F. *The major constituents of milk*, in *Dairy processing. Improving quality*, Smit G., Editor. 2003, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC: Abinston. p. 5-38.
10. Rowland S.J. *The determination of the nitrogen distribution in milk*. . J. Dairy Res. , 1988 **9** p. 42-46.
11. Kjeldahl J. *En ny methode til kvaelstofbestemmelse i organiske stoffer*. Zeitschrift fur Analytische Chemie, 1883. **22**: p. 366-382.
12. Dauphas S., Mouhous-Riou N., Metro B., Mackie A.R., Wilde P.J., Anton M. y Riaublanc A. *The supramolecular organisation of β -casein: effect on interfacial properties*. Food Hydrocolloids, 2005. **19**(3): p. 387-393.
13. Andrews A.T. y Alichanidis E. *Proteolysis of caseins and the proteose-peptone fraction of bovine milk*. Journal of Dairy Research, 1983. **50**(03): p. 275-290.
14. DePeters E.J. y Ferguson J.D. *Nonprotein nitrogen and protein distribution in the milk of cows*. Journal of Dairy Science, 1992. **75**(11): p. 3192-3209.
15. Phadungath C. *Casein micelle structure: a concise review*. Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005. **27**(1): p. 201-212.
16. Jenness R., Wong N.P., Marth E.H. y Keeney M. *Fundamental of Dairy Chemistry*. 3ra. ed. 1988, New York: Van Nostrand Reinhold. 796.
17. Waugh D.F. *The interactions of α - β - and κ -caseins in micelle formation*. Discussions of the Faraday Society, 1958. **25**(0): p. 186-192.
18. Dalgleish D.G. y Corredig M. *The structure of the casein micelle of milk and Its changes during processing*. Annual Review of Food Science and Technology, 2012. **3**: p. 449-467.
19. Kruif C.G.d., Huppertz T., Urban V.S. y Petukhov A.V. *Casein micelles and their internal structure*. Advances in Colloid and Interface Science 2012. **171**: p. 36-52.
20. Walstra P. *Casein sub-micelles: do they exist?* International Dairy Journal, 1999. **9**(3–6): p. 189-192.
21. Buchheim W. y Welsch. *Evidence for the submicellar composition of casein micelles on the basis of electron microscopical studies*. . Neth. Milk Dairy J., 1973. **27**: p. 163-180.
22. Horne D.S. *Casein micelle structure: Models and muddles*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2006. **11**(2–3): p. 148-153.
23. Slattery C.W. y Evard R. *A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition*. Biochim. Biophys. Acta., 1973. **317**: p. 529-538.
24. Walstra P. y Jenness R. eds. *Dairy Chemistry and Physics*. ed. Sons J.W.a. 1984: New York. 477.
25. McMahon D.J. y McManus W.R. *Rethinking casein micelles structure using electron microscopy*. Journal of Dairy Science, 1998. **81**: p. 2985-93.

26. Dalgleish D., Spagnuolo P. y Goff H.D. *A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy*. International Dairy Journal, 2004. **14**: p. 1025-1031.
27. Schmidt D.G. *Association of caseins and casein micelle structure*, in *Developments in Dairy Chemistry*, Fox P.F., Editor. 1982, Applied Science Publishers: Barking. p. 61-86.
28. Horne D.S. *Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2003. **213**(2-3): p. 255-263.
29. Holt C. y Sawyer L. *Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of primary and secondary structures of the α SI-, β - and κ -caseins*. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, 1993. **89**(15): p. 2683-2692.
30. Holt C. *Casein micelle substructure and calcium phosphate interactions studied by sephacryl column chromatography*. Journal of Dairy Science, 1998. **81**(11): p. 2994-3003.
31. Horne D.S. *Casein Interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products*. International Dairy Journal, 1998. **8**(3): p. 171-177.
32. Godovac-Zimmermann J. *The structural motif of β -lactoglobulin and retinol-binding protein: a basic framework for binding and transport of small hydrophobic molecules?* Trends in biochemical sciences, 1988. **13**(2): p. 64-66.
33. Flower D.R. *The lipocalin protein family: structure and function*. Biochem J, 1996. **318**(Pt 1): p. 1-14.
34. Loveday S.M., Wang X.L., Rao M.A., Anema S.G., Creamer L.K. y Singh H. *Tuning the properties of β -lactoglobulin nanofibrils with pH, NaCl and CaCl₂*. Int Dairy J, 2010. **20**(9): p. 9-9.
35. Graveland-Bikker J.F., Ipsen R., Otte J. y de Kruif C.G. *Influence of calcium on the self-assembly of partially hydrolyzed α -lactalbumin*. Langmuir, 2004. **20**(16): p. 6841-6.
36. Akkermans C., Van der Goot A.J., Venema P., Gruppen H., Vereijken J.M., Van der Linden E. y Boom R.M. *Micrometer-sized fibrillar protein aggregates from soy glycinin and soy protein isolate*. J Agric Food Chem, 2007. **55**(24): p. 9877-82.
37. Mishra R., Sorgjerd K., Nystrom S., Nordigarden A., Yu Y.C. y Hammarstrom P. *Lysozyme amyloidogenesis is accelerated by specific nicking and fragmentation but decelerated by intact protein binding and conversion*. J Mol Biol, 2007. **366**(3): p. 1029-44.
38. Brodbeck U. y Ebner K.E. *Resolution of a soluble lactose synthetase into two protein components and solubilization of microsomal lactose synthetase*. J Biol Chem, 1966. **241**(3): p. 762-4.
39. Hiraoka Y., Segawa T., Kuwajima K., Sugai S. y Murai N. *α -Lactalbumin: a calcium metalloprotein*. Biochem Biophys Res Commun, 1980. **95**(3): p. 1098-104.
40. Stanciu N. y Rapeanu G. *An overview of bovine α -lactalbumin structure and functionality*. Food Technology, 2010. **34**(2).
41. McKenzie H.A. y White Jr F.H. *Lysozyme and α -Lactalbumin: Structure, Function, and Interrelationships*. Advances in Protein Chemistry, 1991. **41**: p. 173-315.
42. Farrell H.M., Jr., Jimenez-Flores R., Bleck G.T., Brown E.M., Butler J.E., Creamer L.K., Hicks C.L., Hollar C.M., Ng-Kwai-Hang K.F. y Swaisgood H.E. *Nomenclature of the proteins of cows' milk - sixth revision*. J. of Dairy Science, 2004. **87**(6): p. 1641-74.
43. Pike A.C.W., Brew K. y Acharya K.R. *Crystal structures of guinea-pig, goat and bovine \pm -lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthase*. Structure (London, England : 1993), 1996. **4**(6): p. 691-703.
44. Chrysina E.D., Brew K. y Acharya K.R. *Crystal structures of apo- and holo-bovine α -lactalbumin at 2.2-Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(47): p. 37021-37029.
45. Permyakov E.A. y Berliner L.J. *α -Lactalbumin: structure and function*. FEBS Lett, 2000. **473**(3): p. 269-74.
46. Humphrey R.S. y Jolley K.W. *³¹P-NMR studies of bovine beta-casein*. Biochim Biophys Acta., 1982. **708**(3): p. 294-9.
47. Mona A.M., Abd E.-G. y Nawal S.A. *Cheese yield as affected by some parameters*. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. , 2011. **10**(2): p. 131-153.
48. Sbodio O.A., Tercero E.J., Coutaz V.R., Luna J.A. y Martínez E. *Simultaneous interaction of pH, CaCl₂ addition, temperature and enzyme concentration on milk coagulation properties / Interacción simultánea del pH, CaCl₂ añadido, temperatura y concentración enzimática sobre la coagulación de la leche*. Food Science and Technology International, 1997. **3**(4): p. 291-298.
49. Stapelfeldt H., Nielsen B.R. y Skibsted L.H. *Effect of heat treatment, water activity and storage temperature on the oxidative stability of whole milk powder*. International Dairy Journal, 1997. **7**(5): p. 331-339.

50. Kalapathy U., Hettiarachchy N. y Rhee K. *Effect of drying methods on molecular properties and functionalities of disulfide bond-cleaved soy proteins*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1997. **74**(3): p. 195-199.
51. Kurozawa L.E., Park K.J. y Hubinger M.D. *Effect of carrier agents on the physicochemical properties of a spray dried chicken meat protein hydrolysate*. Journal of Food Engineering, 2009. **94**(3-4): p. 326-333.
52. Singh H. y Creamer L.K. *Denaturation, aggregation and heat stability of milk protein during the manufacture of skim milk powder*. Journal of Dairy Research, 1991. **58**(03): p. 269-283.
53. Dergal S.B. *Leche*, in *Química de los alimentos*, S.A. A.M., Editor. 1993, AVI Publishing Company: Naulcalpan de Juarez. p. 648.
54. Albert C.S. y Mándoki Z.S. *The effect of microwave pasteurization on the composition of milk*. Acta Univ. Sapientiae, Alimentaria, 2009. **2**(2): p. 153-165.
55. Elmira T. y Kees S. *Packaging and the Shelf Life of Milk Powders*, in *Food Packaging and Shelf Life*. 2009, CRC Press. p. 127-141.
56. Orlie V., Boserup L. y Olsen K. *Casein micelle dissociation in skim milk during high-pressure treatment: Effects of pressure, pH, and temperature*. Journal of dairy science, 2010. **93**(1): p. 12-18.
57. Elmnasser N., Dalgarrondo M., Orange N., Bakhrouf A., Haertlé T., Federighi M. y Chobert J.-M. *Effect of pulsed-light treatment on milk proteins and lipids*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(6): p. 1984-1991.
58. Huppertz T., Kelly A.L. y Fox P.F. *Effects of high pressure on constituents and properties of milk*. International Dairy Journal, 2002. **12** p. 561-572.
59. Reinemann D.J., Gouws P., Cilliers T., Houck K. y Bishop J.R. *New methods for UV treatment of milk for improved food safety and product quality*, in *American Society of Agricultural and Biological Engineers*. 2006, ASABE: Portland, Oregon p. 1-9.
60. Gachovska T.K., Kumar S., Thippareddi H., Subbiah J. y Williams F. *Ultraviolet and pulsed electric field treatments have additive effect on inactivation of E. coli in apple juice*. Journal of Food Science 2008. **73**(9): p. 412-417.
61. Sastry S.K., Datta A.K. y Worobo R.W. *Ultraviolet light*. Journal Food Science, 2000. **65**(12): p. 90-92.
62. Smith W.L., Lagunas-Solar M.C. y Cullor J.S. *Use of pulsed ultraviolet laser light for the cold pasteurization of bovine milk*. Journal of Food Protection, 2002. **65**(9): p. 1480-1482.
63. Guerrero-Beltrán J.A. y Barbosa-Cánovas G.V. *Advantages and limitations on processing foods by UV light*. Food Sci Tech Int, 2004. **10**(3): p. 137-11.
64. Snowball M.R. y Hornsey I.S. *Purification of water supplies using ultraviolet light*, in *Developments in food microbiology*, RK R., Editor. 1998, Elsevier Applied Science: New York. p. 171-191.
65. Rosenthal I. ed. *Ultraviolet-visible radiation. in Electromagnetic Radiations in Food Science*. ed. Sciences A.S.i.A. Vol. 19. 1992, Springer Verlag: Berlin. 54-104.
66. Bosset J.O., Gallmann P.U. y Sieber R. *Influence of light transmittance of packing materials on the shelf-life of milk and dairy products - a review*. Lait, 1993. **73**(1): p. 3-49.
67. Viljanen K., Kylli P., Hubbermann E.-M., Schwarz K. y Heinonen M. *Anthocyanin antioxidant activity and partition behavior in whey protein emulsion*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(6): p. 2022-2027.
68. Bergt C., Fu X., Huq N.P., Kao J. y Heinecke J.W. *Lysine residues direct the chlorination of tyrosines in YXXK motifs of apolipoprotein A-I when hypochlorous acid oxidizes high density lipoprotein*. The Journal of Biological Chemistry 2004. **279**(9): p. 7856-7866.
69. van Aardt M., Duncan S.E., Marcy J.E., Long T.E., O'Keefe S.F. y Nielsen-Sims S.R. *Effect of Antioxidant (α -Tocopherol and Ascorbic Acid) Fortification on Light-Induced Flavor of Milk*. J. of Dairy Science, 2005. **88**(3): p. 872-80.
70. Duncley W.L., Frankel D.J. y Pangborn R.M. *Effects of fluorescent light on flavor, ascorbic acid, and riboflavin in milk*. Food Tech, 1962. **16**: p. 112-118.
71. Dimick P.S. y Kilara A. *Photo-oxidative changes in milk-proteins and amino-acids*. Milchwissenschaft, 1983. **35**: p. 289-299.
72. Marsili R.T. *Comparison of solid phase micro-extraction and dynamic headspace method for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of light-induced lipid oxidation products in milk*. J. Chromatogr. Sci. , 1999. **37**: p. 17-23.
73. Biolatto A., Grigioni G., Irurueta M., Sancho A.M., Taverna M. y Pensel N. *Seasonal variation in the odour characteristics of whole milk powder*. Food Chemistry, 2007. **103**(3): p. 960-967.
74. Lloyd M.A., Hess S.J. y Drake M.A. *Effect of nitrogen flushing and storage temperature on flavor and shelf-life of whole milk powder*. Journal of Dairy Science, 2009. **92**(6): p. 2409-2422.

75. Birlouez-Aragon I., Pischetsrieder M., Leclère J., Morales F.J., Hasenkopf K., Kientsch-Engel R., Ducauze C.J. y Rutledge D. *Assessment of protein glycation markers in infant formulas*. Food Chemistry, 2004. **87**(2): p. 253-259.
76. Waraho T., McClements D.J. y Decker E.A. *Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions*. Trends in Food Science & Technology, 2011. **22**(1): p. 3-13.
77. Coupland J.N. y McClements D.J. *Lipid oxidation in food emulsions*. Trends in Food Science & Technology, 1996. **7**(3): p. 83-91.
78. Cardenia V., Rodriguez-Estrada M.T., Boselli E. y Lercker G. *Cholesterol photosensitized oxidation in food and biological systems*. Biochimie, 2013. **95**(3): p. 473-481.
79. Davies M.J. *Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **305**(3): p. 761-770.
80. Fenaille F., Parisod V., Visani P., Populaire S., Tabet J.-C. y Guy P.A. *Modifications of milk constituents during processing: A preliminary benchmarking study*. International Dairy Journal, 2006. **16**(7): p. 728-739.
81. Utrera M. y Estévez M. *Analysis of tryptophan oxidation by fluorescence spectroscopy: Effect of metal-catalyzed oxidation and selected phenolic compounds*. Food Chemistry, 2012. **135**(1): p. 88-93.
82. Berlett B.S. y Stadtman E.R. *Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress*. J Biol Chem, 1997. **272**(33): p. 20313-6.
83. Dalsgaard T.K., Otzen D., Nielsen J.H. y Larsen L.B. *Changes in structures of milk proteins upon photo-oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(26): p. 10968-10976.
84. Butterfield D. y Stadtman E.R. in *Advances in Cell Aging and Gerontology* 1997. p. 161-191.
85. Dean R.T., Fu S., Stocker R. y Davies M.J. *Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation*. Biochem. J., 1997. **324**(1): p. 1-18.
86. Frankel E.N. *Recent advances in lipid oxidation*. J Sci Food Agric., 1991. **54**: p. 495-511.
87. Neuzil J., Gebicki J.M. y Stocker R. *Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants*. Biochem J, 1993. **293**(Pt 3): p. 601-6.
88. Forcato D.O., Carmine M.P., Echeverria G.E., Pecora R.P. y Kivatinitz S.C. *Milk fat content measurement by a simple UV spectrophotometric method: an alternative screening method*. J Dairy Sci, 2005. **88**(2): p. 478-81.
89. Fennema O.R. *Química de los Alimentos*. 2nd ed. 2000, Wisconsin-Madison.
90. Stadtman E.R. y Levine R.L. *Protein oxidation*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **899**: p. 191-208.
91. Gutteridge J.M.C. y Halliwell B. *Iron toxicity and oxygen radicals*. Baillière's Clinical Haematology, 1989. **2**(2): p. 195-256.
92. Artola R.L., Conde C.B., Bagatolli L., Pecora R.P., D.Fidelio G. y Kivatinitz S.C. *High density lipoprotein from hypercholesterolemic animals has peroxidized lipids and oligomeric apolipoprotein A-I*. Biochem. Biophys. Res. Commun, 1997. **239**: p. 570-574.
93. Levine R.L. *Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(9): p. 790-6.
94. Stadtman E.R. y Levine R.L. *Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins*. Amino Acids, 2003. **25**(3-4): p. 207-18.
95. Kristensen D., Kröger-Ohlsen Maiken V. y Skibsted Leif H. *Radical formation in dairy products: Prediction of oxidative stability based on electron Spin Resonance Spectroscopy*, in *Free Radicals in Food*. 2002, American Chemical Society. p. 114-125.
96. Salminen H. *Effect of phenolic-rich plant materials on protein and lipid oxidation reactions*, in *Department of Applied Chemistry and Microbiology*. 2009, University of Helsinki: Helsinki. p. 109.
97. Viljanen A.P., Virtanen K.A., Jarvisalo M.J., Hallsten K., Parkkola R., Ronnema T., Lonnqvist F., Iozzo P., Ferrannini E. y Nuutila P. *Rosiglitazone treatment increases subcutaneous adipose tissue glucose uptake in parallel with perfusion in patients with type 2 diabetes: a double-blind, randomized study with metformin*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(12): p. 6523-8.
98. Stadtman E.R. y Levine R.L. *Protein Oxidation*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2000. **899**(1): p. 191-208.
99. Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo R., Giustarini D. y Milzani A. *Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease*. Clinical Chemistry, 2006. **52**(4): p. 601-623.
100. Levine R., Garland D., Oliver C., Amici A., Climent I., Lenz A., Ahn B., Shaltiel S. y Stadtman E. *Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins.*, in *Methods in Enzymology*. 1990. p. 464-478.
101. Huggins T.G., Wells-Knecht M.C., Detorie N.A., Baynes J.W. y Thorpe S.R. *Formation of o-tyrosine and dityrosine in proteins during radiolytic and metal-catalyzed oxidation*. J Biol Chem, 1993. **268**(17): p. 12341-7.

102. Fucci L., Oliver C.N., Coon M.J. y Stadtman E.R. *Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: Possible implication in protein turnover and ageing*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1983. **80**(6): p. 1521-1525.
103. Levine R.L., Oliver C.N., Fulks R.M. y Stadtman E.R. *Turnover of bacterial glutamine synthetase: oxidative inactivation precedes proteolysis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1981. **78**(4): p. 2120-2124.
104. Chevion M. *A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: The essential role of redox-active transition metals*. Free Radical Biology and Medicine, 1988. **5**(1): p. 27-37.
105. Stadtman E.R. *Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences*. Free Radic Biol Med, 1990. **9**(4): p. 315-25.
106. Davies M.J. y Truscott R.J.W. *Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2001. **63**(1-3): p. 114-125.
107. Bensasson R.V. y Land E.J. eds. *Excited states and free radicals in biology and medicine. Contributions from Flash Photolysis and Pulse Radiolysis*. Ira. ed. Oxford University Press, ed. Truscott T.G. 1993: Oxford.
108. Pattison Di Fau - Davies M.J. y Davies M.J. *Actions of ultraviolet light on cellular structures*. Exs, 2006(96): p. 131-57.
109. Redmond R.W. y Gamlin J.N. *A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules*. Photochemistry and Photobiology, 1999. **70**(4): p. 391-475.
110. Matheson I.B.C., Etheridge R.D., Kratoch N.R. y Lee J. *The quenching of singlet oxygen by amino acids and proteins*. Photochemistry and Photobiology, 1975. **21**(3): p. 165-171.
111. Michaeli A. y Feitelson J. *Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides*. Photochem Photobiol, 1994. **59**(3): p. 284-9.
112. Wilkinson F., Helman W.P. y Ross A.B. *Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation*. Journal of Physical and Chemical Reference Data, 1995. **24**(2): p. 663-677.
113. Rougee M., Bensasson R.V., Land E.J. y Pariente R. *Deactivation of singlet molecular oxygen by thiols and related compounds, possible protectors against skin photosensitivity*. Photochem Photobiol, 1988. **47**(4): p. 485-9.
114. Nakagawa M., Watanabe H., Kodato S., Okajima H., Hino T., Flippen J.L. y Witkop B. *A valid model for the mechanism of oxidation of tryptophan to formylkynurenine-25 years later*. Proc Natl Acad Sci U S A. , 1977. **74**(11): p. 4730-3.
115. Saito I., Matsuura T., Nakagawa M. y Hino T. *Peroxidic intermediates in photosensitized oxygenation of tryptophan derivatives*. Accounts of Chemical Research, 1977. **10**(9): p. 346-352.
116. Langlots R., Ali H., Brasseur N., Wagner J.R. y Lier J.E.v. *Biological activities of phthalocyanines-IV. Type II sensitized photooxidation of L-tryptophan and cholesterol by sulfonated metallo phthalocyanines*. Photochemistry and Photobiology, 1986. **44**(2): p. 117-123.
117. Pattison D.I., Rahmanto A.S. y Davies M.J. *Photo-oxidation of proteins*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2012. **11**(1): p. 38-53.
118. Kivatnitz S.C. *Relationship between protein oxidation markers and oxidative stress biomarkers, in Inflammatory Diseases - Immunopathology, Clinical and Pharmacological Bases*. 2012, Intech. p. 279-298.
119. Malencik D.A., Sprouse J.F., Swanson C.A. y Anderson S.R. *Dityrosine: preparation, isolation, and analysis*. Anal Biochem, 1996. **242**(2): p. 202-13.
120. Dalgaard T.K., Nielsen J.H., Brown B.E., Stadler N. y Davies M.J. *Dityrosine, 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), and radical formation from tyrosine residues on milk proteins with globular and flexible structures as a result of riboflavin-mediated photo-oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(14): p. 7939-7947.
121. Singh H., Roberts M.S., Munro P.A. y Teo C.T. *Acid-induced dissociation of casein micelles in milk: effects of heat treatment*. J. Dairy Sci., 1996. **79**(8): p. 1340-1346.
122. Anema S.G. *Effect of milk concentration on the irreversible thermal denaturation and disulfide aggregation of β -lactoglobulin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(9): p. 4168-4175.
123. Chen W.L., Hwang M.T., Liao C.Y., Ho J.C., Hong K.C. y Mao S.J.T. *β -Lactoglobulin is a thermal marker in processed milk as studied by electrophoresis and circular dichroic spectra*. Journal of Dairy Science, 2005. **88**(5): p. 1618-1630.
124. Roefs S., P. F. M. y De Kruif K.G. *A model for the denaturation and aggregation of β -lactoglobulin*. European Journal of Biochemistry, 1994. **226**(3): p. 883-889.

125. Vasbinder A.J., Alting A.C. y de Kruif K.G. *Quantification of heat-induced casein-whey protein interactions in milk and its relation to gelation kinetics*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003. **31**(1-4): p. 115-123.
126. Carbonaro M., Bonomi F., Iametti S., Cappelloni M. y Carnovale E. *Aggregation of Proteins in Whey from Raw and Heat-Processed Milk: Formation of Soluble Macroaggregates and Nutritional Consequences*. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 1998. **31**(6): p. 522-529.
127. Jovanovic S., Barac M., Macej O., Vucic T. y Lacnjevac C. *SDS-PAGE analysis of soluble proteins in reconstituted milk exposed to different heat treatments*. Sensors, 2007. **7**(3): p. 371-383.
128. Gaiani C., Scher J., Ehrhardt J.J., Linder M., Schuck P., Desobry S. y Banon S. *Relationships between dairy powder surface composition and wetting properties during storage: Importance of residual lipids*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(16): p. 6561-6567.
129. Matumoto-Pintro P.T., Petit H.V., Giroux H.J., Côrtes C., Gagnon N. y Britten M. *Effect of flaxseed lignans added to milk or fed to cows on oxidative degradation of dairy beverages enriched with polyunsaturated fatty acids*. Journal of Dairy Research, 2011. **78**(01): p. 111-117.
130. Romeu-Nadal M., Chávez-Servín J.L., Castellote A.I., Rivero M. y López-Sabater M.C. *Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder formulas*. Food Chemistry, 2007. **100**(2): p. 756-763.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La oxidación de proteínas lácteas en matrices alimentarias complejas altera la estructura y las propiedades funcionales de las mismas. Las modificaciones producidas varían según las condiciones de procesamiento y de la composición química del alimento.

El estudio de las modificaciones oxidativas de matrices complejas es un tema que es importante tanto desde el punto de vista del conocimiento básico como del aplicado.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la oxidación de la leche por luz, y evaluar las consecuencias funcionales y biológicas de la oxidación proteica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estudiar los fenómenos de oxidación proteica en leche entera y descremada y lactosuero sometidos a luz UV y FL.
- 2) Estudiar la oxidación de las proteínas aisladas de la leche (β -lactoglobulina y caseínas) por distintos agentes de relevancia industrial (radiaciones lumínicas, temperatura y oxidantes químicos).
- 3) Estudiar la oxidación proteica de los distintos tipos de leche en polvo (enteras, descremadas y fórmulas) comerciales aptas para el consumo humano y evaluar la relación con los distintos parámetros de calidad utilizados para la leche.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1: OXIDACIÓN PROTEICA EN LECHE ENTERA Y DESCREMADA, Y LACTOSUERO SOMETIDOS A LUZ UV Y FL

En este capítulo se estudió la oxidación de las proteínas cuando la leche en polvo reconstituida, entera y descremada, y el lactosuero de la leche se exponen a luz UV, y a luz fluorescente (FL). Se estudiaron los cambios en la estructura primaria mediante la determinación de productos de oxidación de aminoácidos (ditirosina, *N*-formilquinurenina, y productos carbonilos), y la disminución de triptofano, así como los cambios en la estructura terciaria, por medio de electroforesis en geles de agarosa con los cuales se separaron las proteínas por tamaño molecular y se evaluó la disminución de cada fracción proteica y la formación de oligómeros y agregados. Para cumplir con este objetivo se estudió también la oxidación de los lípidos de la leche, ya que ésta podría contribuir en el proceso de oxidación de las proteínas. Se realizaron determinaciones de la oxidación de las proteínas en presencia y ausencia de lípidos para entender cómo estos componentes de la matriz láctea interactúan en el proceso de oxidación proteica. También se estudiaron distintos aspectos de la funcionalidad proteica, en las cuales la oxidación de las proteínas podía producir alteraciones, como la coagulación por quimosina, la digestibilidad por pepsina, la actividad antioxidante, la inmunoreactividad ante anticuerpos contra proteínas nativas, el crecimiento de un hongo en un sustrato con leche irradiada. Cada una de estas pruebas nos da indicios además de los cambios químicos que se han producido ya sea en las proteínas como en la matriz láctea.

OXIDACIÓN LIPÍDICA

Formación de dienos y trienos conjugados en leche expuesta a luz UV y fluorescente

Se estudió la evolución en el tiempo de la oxidación de lípidos por acción de la irradiación UV ó FL en un intervalo de 0 a 24h. Se midió la cantidad de dienos y trienos conjugados, productos de oxidación temprana de los lípidos, utilizando el método espectrofotométrico de Forcato [1]. En la Figura 1 se observó que la irradiación con UV ó FL no afectó el nivel de dienos y trienos conjugados de manera significativa en el intervalo de tiempo analizado.

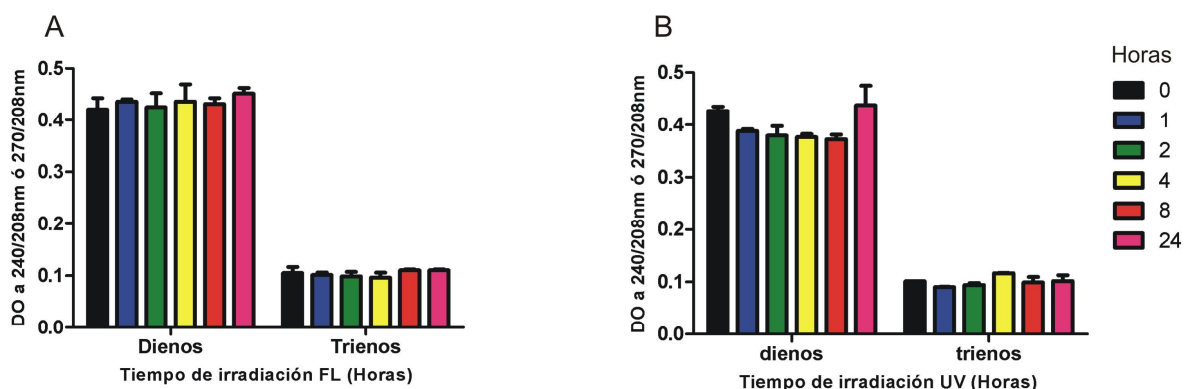


Figura 1. Oxidación de los lípidos en leche entera en polvo por irradiación lumínica. A. Dienos y trienos conjugados en la fracción lipídica de leches expuestas a luz FL por 0, 1, 2, 4 y 8 h. B. Dienos y trienos conjugados en la fracción lipídica de leches expuestas a luz UV por 0, 1, 2, 4 y 8 h.

Se sabe que los dienos y trienos son productos de oxidación tempranos de los lípidos, y que estos pueden luego seguir oxidándose para formar otros productos [2-3], por lo cual se podrían haber formado dienos y trienos conjugado en tiempos menores a los analizados y luego degradado. Por este motivo se evaluó la formación de dienos y trienos conjugados a tiempos menores a la hora de exposición al UV y FL.

Se observó como resultado, que en dicho intervalo de tiempos más cortos, los dienos y trienos conjugados en leche entera (LE) aumentaban en forma transiente entre los 15 y 30 minutos de irradiación UV (Figura 2 A y B), no observándose este aumento al irradiar con luz FL (Figura 2 C y D). A la hora de irradiación UV, los niveles de dienos y trienos volvieron al valor inicial en LE (Figura 2 A y B), coincidiendo con los resultados observados en el experimento a tiempos más largos de exposición (Figura 1).

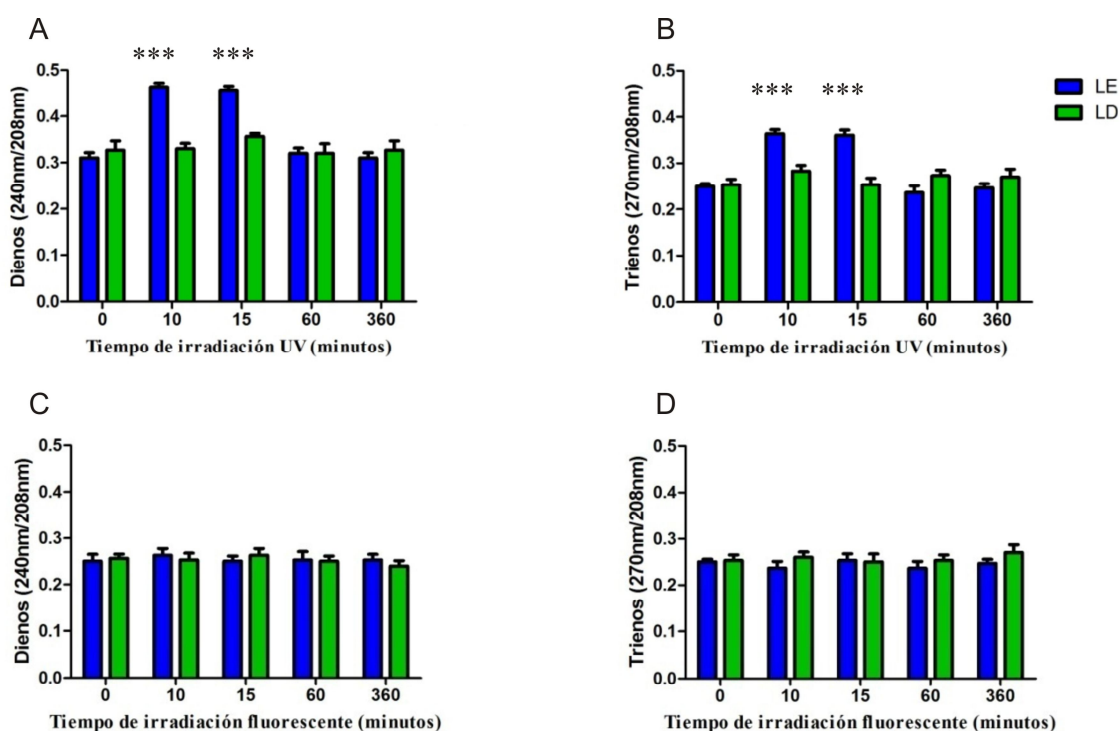


Figura 2. Formación de dienos y trienos en leche descremada y entera por exposición a luz. A) Dienes en leches expuestas al UV. B) Trienos en leches expuestas al UV. C) Dienes en leches expuestas a la luz FL. D) Trienos en leches expuestas a la luz fluorescente (FL). LE: leche entera, LD: leche descremada. Se midió la absorbancia a 240 nm (Dienes) y a 270 nm (Trienos) y se normalizó por la absorbancia a 208 nm (Lípidos Totales). * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

Se concluye que la radiación FL no genera formación de dienos y trienos conjugados en leche entera o descremada en el intervalo analizado, y que la irradiación con luz UV de la leche entera genera aparición de dienos y trienos entre los 15 y 30 minutos de exposición. Estos dienos y trienos que se generan pueden estar siendo degradados luego para formar otros productos de oxidación como el MDA y HNE.

OXIDACIÓN PROTEICA

Cambios en la Estructura Primaria de las Proteínas

Los cambios en los residuos de aminoácidos alteran la estructura primaria de las proteínas. Se midió la oxidación de los aminoácidos por varios métodos: determinación de grupos carbonilos proteicos, enlaces ditirosina, y *N*-Formilquinurenina (NFK), un derivado carbonilado del triptofano.

Se observó que los carbonilos proteicos aumentaron en función del tiempo de irradiación para ambos tipos de leche (Figura 3). Cuando las muestras de leche entera o descremada fueron irradiadas con luz UV, los grupos carbonilos proteicos aumentaron siguiendo una reacción cinética de primer orden (Tabla 1). Interesantemente, la velocidad inicial de formación de carbonilos proteicos fue mayor para LD que para LE. Los parámetros cinéticos de la formación de carbonilos proteicos en LE o LD irradiada por FL fue similar, indicando que los lípidos no están involucrados en el mecanismo oxidativo mediado por irradiación fluorescente y está de acuerdo con lo observado en el apartado anterior. Para las muestras sometidas a irradiación fluorescente el modelo que mejor ajustó las curvas experimentales fue el logístico, indicando la existencia de una fase de latencia en el comienzo de la reacción.

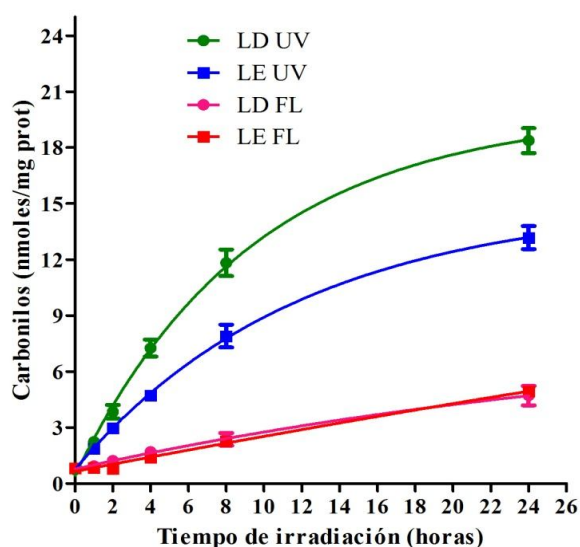


Figura 3. Cinética de formación de carbonilos. Los carbonilos proteicos fueron determinados colorimétricamente. Las leches fueron expuestas a luz ultravioleta (UV) o fluorescente (FL) por los tiempos indicados. ■: leche entera expuesta a FL ●: leche descremada expuesta a luz FL ■: leche entera expuesta a UV, y ●: leche descremada expuesta a UV. Los resultados fueron expresados como nanomoles de carbonilos proteicos por miligramo de proteína y representan el promedio \pm SEM de experimentos realizados por triplicado. LD: leche descremada, LE: leche entera.

La literatura sobre la formación de carbonilos proteicos por tratamientos térmicos o foto-oxidativos utilizados en el procesamiento de productos lácteos es escasa tanto para la leche entera [4] como para las proteínas aisladas en presencia de riboflavina [5]. Nuestros datos muestran que la oxidación por exposición a luz ultravioleta o fluorescente de leches en polvo reconstituida afecta notoriamente la fracción proteica pero no la lipídica (comparar Figuras 2 y

3). Estos datos refuerzan los hallazgos de los investigadores de Nestlé [6] que no observaron correlación para la oxidación de lípidos y proteínas de leches sometidas a distintos procesamientos industriales.

Es interesante notar que la formación de carbonilos por irradiación con luz UV fue menor para leche entera que para leche descremada, indicando que los lípidos confieren protección a la oxidación (Figura 3, Tabla 1). Esta observación podría ayudar a explicar el por qué a pesar de que la oxidación de lípidos y proteínas puede ocurrir simultáneamente es muy difícil dilucidar cuál de los componentes, lípidos o proteínas, es más sensible a la oxidación. Nuestros resultados proveen una explicación a la ausencia de correlación observada en la producción de sabores desagradables de leche descremada en polvo con los hallazgos de cromatografía gaseosa [7] ya que la técnica de cromatografía gaseosa detecta productos de oxidación lipídica pero no detecta la formación de carbonilos proteicos.

Tipo de irradiación	Muestra	Velocidad Inicial (nmol/h)	Asíntota (nmol)	Constante	Modelo que mejor se ajusta	r ²
UV	LE	1,20	15,3 ± 2,5		Monomolecular	0,998
UV	LD	1,95	21,2 ± 0,5		Monomolecular	0,997
FL	LE	0,25	5,2 ± 0,1	0,200 ± 0,010	Logístico	0,996
FL	LD	0,27	4,80 ± 0,06	0,233 ± 0,009	Logístico	0,995

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la formación de grupos carbonilos proteicos. Análisis de leche entera (LE) y leche descremada (LD) irradiada por luz UV o fluorescente (FL) con el programa Simfit a partir de los datos obtenidos en la figura 3. Los ± corresponden a los errores estándar obtenidos en la curva de ajuste utilizando los modelos monomolecular y logístico. Estas ecuaciones fueron elegidas porque aportaban el mejor modelo de ajuste para los datos experimentales (según en el patrón de los residuales y el menor r²).

El modelo monomolecular es un modelo de pseudo primer orden. El modelo logístico posee una curva sigmoideal en la cual hay una fase inicial de latencia y luego un crecimiento abrupto de tipo exponencial, para llegar finalmente a una fase estacionaria donde se alcanzó el máximo, lo que implica un cambio estructural en el estado inicial previo a la reacción que da lugar al producto de reacción.

Utilizando técnicas fluorimétricas se determinó la oxidación de tirosina (Tyr) y triptófano (Trp), ya que es posible medir la aparición de enlaces ditirosina y la aparición de *N*-formilquinurenina, producto de carbonilación del triptofano. Se observó que ditirosina y *N*-formilquinurenina aumentaron rápidamente, en las leches irradiadas con luz UV o FL. La formación de ditirosina y NFK fue mayor para las leches irradiadas con UV que para las expuestas a la luz FL (Figura 4, paneles A y B). Luego de las 24 h de irradiación UV, la LE tuvo mayores niveles de ditirosina y menores niveles de NFK que la LD. No se observaron diferencias entre LD y LE expuestas a la luz FL (Figura 4, paneles A y B).

En la Figura 4 (panel A) se observa que los niveles de formación de enlaces de ditirosina fueron muy superiores para las leches irradiadas con UV que con FL. En leche entera hubo niveles más elevados de ditirosina que en leche descremada (270 ± 13 y 193 ± 22 UAF, respectivamente; $P < 0.02$) indicando que los lípidos presentes en LE podrían intervenir en la formación de este enlace. Por lo tanto, la aparición de ditirosina parece ser más compleja que la de carbonilos.

La cinética de aparición de NFK se asemejó a la de aparición de carbonilos proteicos (Figura 3 y Figura 4, panel B). Luego de 24 h de exposición UV, LD tuvo niveles de NFK significativamente mayores que LE (251 ± 23 y 183 ± 14 UAF, respectivamente; $P < 0.04$). Por lo tanto, lo observado para NFK fue similar a lo observado con los carbonilos proteicos (Figura 3 y Figura 4, panel B). Lo cual es coherente con el hecho de que NFK es un producto de carbonilación del triptofano.

Los hallazgos en la formación de carbonilos proteicos y NFK mostraron que los lípidos presentes en LE previenen su formación mientras que favorecen la aparición de enlaces ditirosinas.

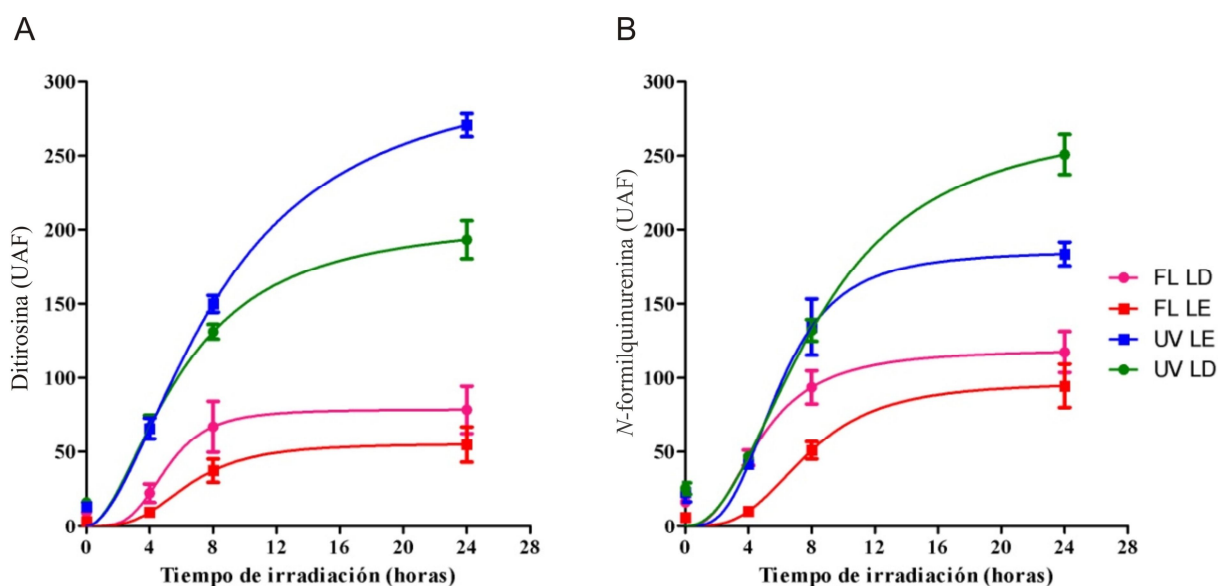


Figura 4. Cinética de formación de (A) ditirosina y (B) N-Formilquinurena (NFK) por exposición a la luz UV o FL. La formación de ditirosina y NFK fueron determinadas por espectroscopía de fluorescencia en una alícuota de 1mg/mL de proteína de leche expuesta a UV o FL, en función del tiempo de exposición. Se utilizó como λ excitación: 315 nm y λ emisión: 410 nm para ditirosina y λ excitación: 325 nm y λ emisión: 435 nm para NFK. ■: leche entera expuesta a luz FL ●: leche descremada expuesta a luz FL ■: leche entera expuesta a UV, y ●: leche descremada expuesta al UV. Los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) de las muestras menos UAF del control y representa la media \pm SEM de triplicados. Un experimento representativo de tres es mostrado.

Se realizaron experiencias donde se irradió simultáneamente con UV y FL (Figura 5) y se determinó aparición de carbonilos proteicos (panel A) y ditirosina (panel B). El análisis cinético de las figuras mostró que los niveles máximos de carbonilos y de ditirosina fueron indistinguibles para LE y LD, además fue igual al de LD irradiada con UV, por lo tanto parecería que la máxima cantidad de carbonilos proteicos es aproximadamente 20 nmoles por

mg de proteína. El único parámetro que cambió significativamente por irradiación simultánea UV y FL fue la velocidad de aparición de carbonilos en LE que fue mayor que cuando se irradió con UV.

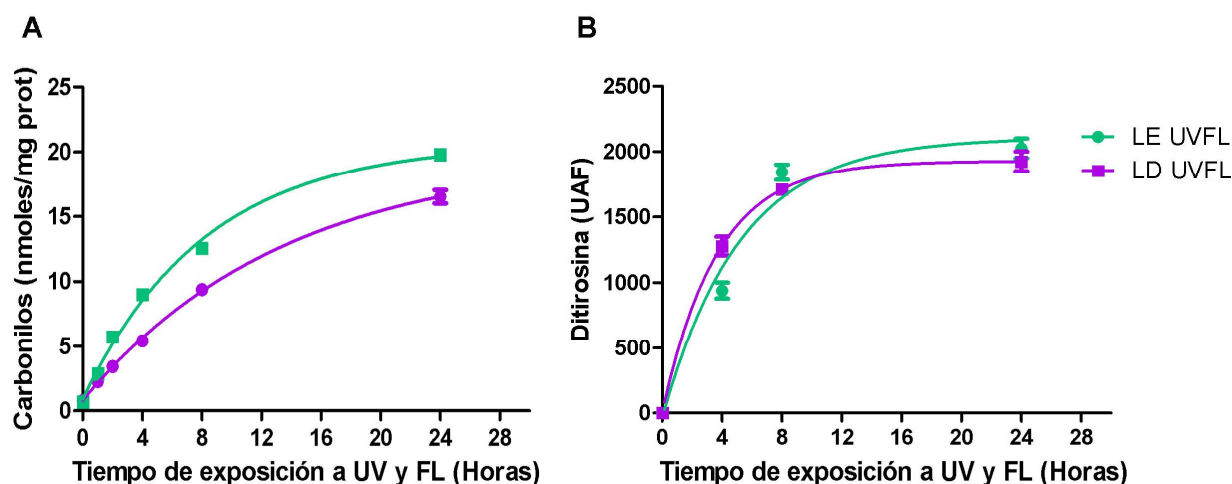


Figura 5. Cinética de formación de (A) carbonilos y (B) ditirosina por exposición simultánea a UV y FL. Los carbonilos proteicos fueron determinados coloriméricamente. Los resultados fueron expresados como nanomoles de carbonilos proteicos por miligramo de proteína y representan el promedio \pm SEM de los experimentos por triplicado. LD: leche descremada, LE: leche entera. La formación de ditirosina fue determinada por espectroscopía de fluorescencia. Los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) de las muestras menos UAF del control y representa la media \pm SEM de triplicados. Un experimento representativo de tres es mostrado.

Estos resultados sugieren que los lípidos preservarían la estructura primaria de las proteínas y favorecerían la dimerización de los radicales tirosilo (dando enlaces ditirosina) frente a la formación de radicales secundarios como la 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) [8].

La formación de ditirosina en leche fotooxidada sugiere que podrían ocurrir cambios en la estructura terciaria (si los enlaces son intramoleculares) y cuaternaria por oligomerización de proteínas (si los nuevos enlaces son intermoleculares) [9].

La formación de *N*-formilquinurena a partir de triptófano ha sido señalada como una de las causas de fragmentación proteica durante los procesos oxidativos [10].

Ya que por exposición a radiación UV y FL se observó formación de ditirosina y de *N*-formilquinurena, se procedió a estudiar si se producía proteólisis, oligomerización y agregados.

Proteólisis, oligomerización y agregados en leche expuesta a la luz UV o fluorescente

Para determinar proteólisis y oligomerización se analizó la movilidad electroforética de las proteínas de la leche. Las proteínas fueron resueltas por peso molecular en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (con SDS) reductoras (Figura 6 paneles A, C y E) y en condiciones desnaturizantes no reductoras (Figura 6 paneles B, D y F).

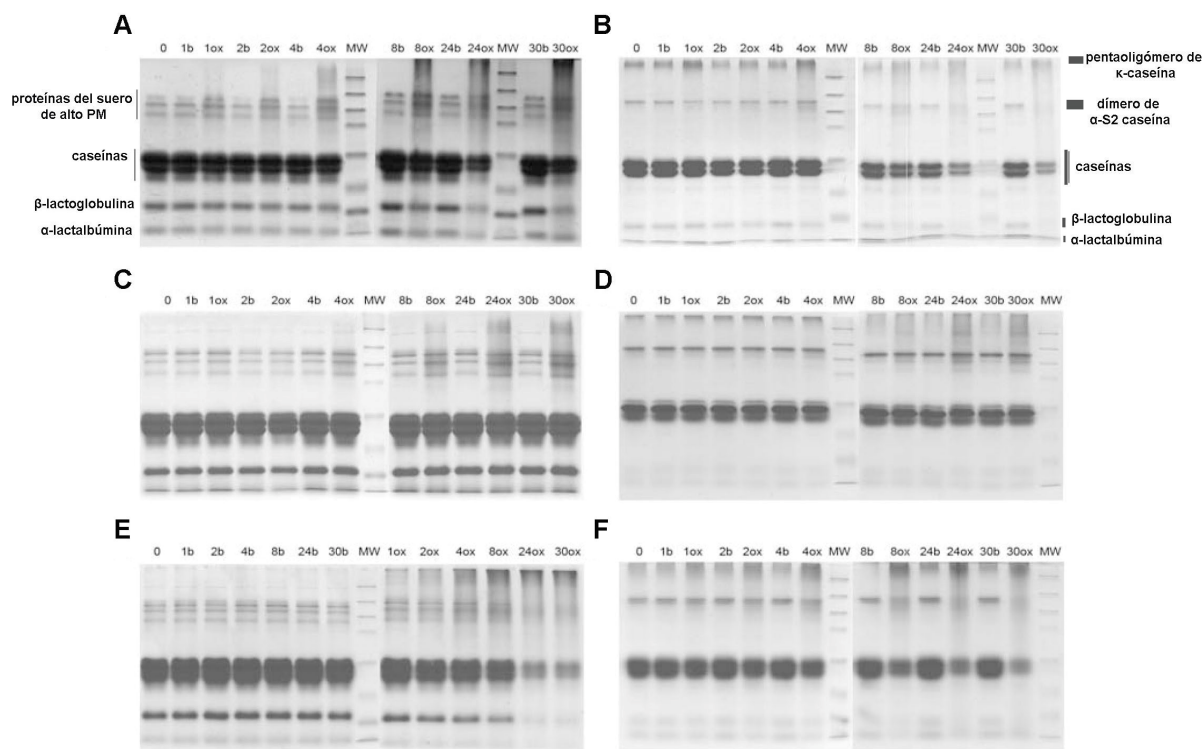


Figura 6. Perfiles proteicos de muestras de leche entera en polvo reconstituida irradiadas por luz UV y FL. SDS-PAGE en condiciones reductoras de leche expuesta a luz UV (A), a luz FL (C), a luz UV+FL (E) por 0, 1, 2, 4, 8, 24, y 30 h. SDS-PAGE en condiciones no reductoras de leche expuesta a luz UV (B), a luz FL (D), a luz UV+FL (F) por 0, 1, 2, 4, 8, 24, y 30 h. MW: marcador de peso molecular (las bandas corresponden a proteínas de 175, 83, 62, 47.5, 32.5, 25, 16.5, y 6.5 kDa respectivamente). **b**: control (sin exposición a irradiación), **ox**: expuestas a la luz. Los tiempos de exposición se indican sobre el carril, con el número de horas seguido de la condición de oxidación **b** u **ox**.

Cuando se observan los carriles correspondientes a los tiempos cero de irradiación y se comparan en condiciones reductoras (Figura 6 paneles A, C y E) y no reductoras (Figura 6 paneles B, D y F), es evidente la diferencia en el patrón de las bandas. Las correspondientes a β -LG y α -LA, no se observan en condiciones no reductoras ya que estas proteínas estarían formando oligómeros de mayor peso molecular por uniones disulfuro, como es conocido [11-12]. Ocurre algo parecido con las bandas correspondientes a la lactoferrina y la cadena pesada de las inmunoglobulinas, que se encuentran entre las proteínas del suero de alto peso molecular. Estas bandas no se observan en condiciones no reductoras, observándose sólo la banda correspondiente a un dímero de α_{S2} -caseína [11]. En condiciones no reductoras se observa una gran banda de alto peso molecular que corresponde a un pentaoligómero de k-caseína [11].

Después de las 4 h de irradiación FL, UV, ó UV+FL, se produjo una disminución en la cantidad de proteína correspondiente a las bandas de caseínas y un aumento en la bandas de alto peso molecular, tanto en condiciones reductoras como no reductoras (Figura 6), probablemente debido a la proteólisis de las caseínas y a la unión del péptido escindido con proteínas de mayor peso molecular o a otras caseínas intactas. Los patrones no fueron iguales en las dos condiciones significando que parte de las uniones fueron puentes disulfuro.

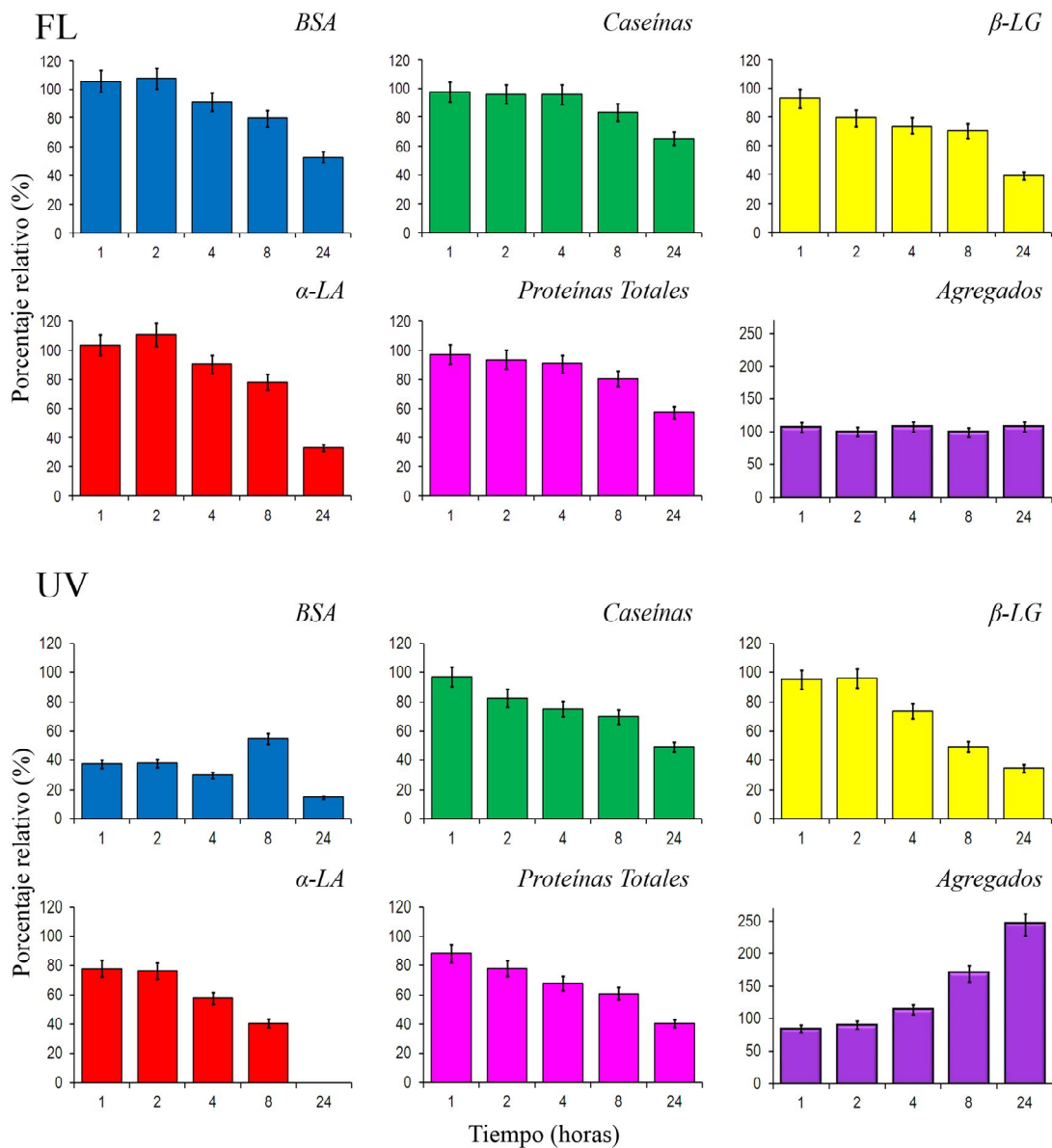


Figura 7: Variación en la cantidad de proteínas individuales en leche entera irradiada FL o UV. Muestras de leche fueron expuestas en los tiempos indicados a la luz. Las proteínas fueron resueltas por SDS-PAGE y cuantificadas por análisis densitométrico de las bandas. Cada banda representa un promedio \pm SEM de tres determinaciones de experimentos de SDS-PAGE independientes. Los resultados fueron expresados como un promedio de los porcentajes de los píxeles determinados en cada banda en relación a la banda correspondiente en la muestra de leche sin exponer a la luz. Los agregados en leche entera fueron cuantificados como los porcentajes relativos sobre el tiempo de exposición cero, el cual fue del 100% (sin exposición a la luz). Los datos de los agregados fueron tomados del análisis densitométrico de las bandas de proteína presentes en el gel retenedor usado en el SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol.

Después de 8 h de irradiación se observó disminución de la mayoría de las bandas (Figura 6 y 7). El descenso en el total de las proteínas luego de las 24 h de irradiación podría atribuirse a proteólisis y fue mayor para la exposición a luz UV que para FL (Figura 6 y 7). El nivel de agregados (proteínas que no ingresaron al gel separador, peso molecular mayor a 175.000 Dalton) no fue afectado por la irradiación con luz FL pero sí por luz UV, aumentando al doble del valor inicial a las 24 h.

La disminución de las caseínas se asemeja a la de la disminución de las proteínas totales. Estos resultados fueron los esperados ya que la CN es la proteína más abundante de la leche (70-80%). La proteína más afectada fue la α -LA, independientemente del tipo de irradiación. Solo quedó un 30% restante luego de las 24 h de irradiación FL y fue casi indetectable luego del mismo periodo de tiempo por exposición UV.

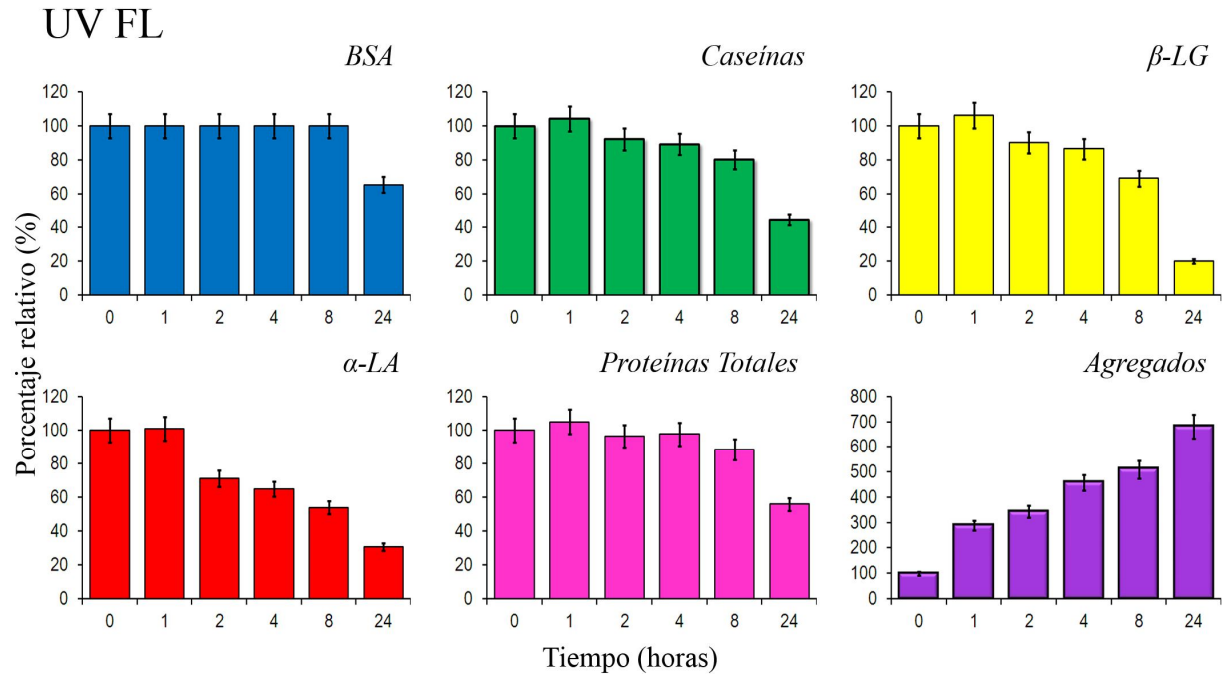


Figura 8. Variación en la cantidad de proteínas individuales en leche entera irradiada con luz fluorescente (FL) y UV simultáneamente. Muestras de leche fueron expuestas en los tiempos indicados a la luz. Las proteínas fueron resueltas por SDS-PAGE y cuantificadas por análisis densitométrico. Cada valor es el promedio \pm SEM de tres determinaciones de SDS-PAGE independientes. Los resultados fueron expresados en relación a la banda correspondiente en la muestra de leche sin exponer a la luz. Los agregados en leche entera expuesta a los distintos tipos de luz fueron cuantificados como los porcentajes relativos sobre el tiempo de exposición cero (sin exposición a la luz). Los datos fueron tomados del análisis densitométrico de las bandas de proteína retenidas en el gel retenedor.

Cuando la leche entera fue sometida a irradiación con las dos luces simultáneamente (UVFL) los resultados fueron inesperados ya que la aparición de agregados después de 24 horas de exposición fue muy superior a la suma de los agregados formados por los tratamientos de irradiación con UV ó FL individualmente después del mismo tiempo de irradiación (Figura 8). Por el contrario no se observó cambios notorios en relación a lo observado con UV o FL (Figura 7) respecto de la desaparición de las proteínas totales o individuales.

La Tabla 2 muestra que la relación entre las caseínas y las proteínas del suero aumenta luego de la irradiación a FL o UV.

Luz	Tiempo de exposición (h)			Significancia ($P \leq$)	
	0	4	24	0-4 h	0-24 h
FL	2,1 ± 0,1	2,5 ± 0,2	3,3 ± 0,3	0,02	0,02
UV	2,2 ± 0,1	3,4 ± 0,3	5,5 ± 0,4	0,01	0,002

Tabla 2. Relación de caseínas a proteína del suero luego de ser expuesta a la luz FL o UV. Las muestras de leche fueron expuestas por triplicado a la luz FL o UV por 0, 4 o 24 h. Las proteínas de leche fueron resueltas y cuantificadas por análisis de densitometría del SDS-PAGE en condiciones reductoras. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm SEM de las relaciones: caseína/proteína del suero. Las diferencias entre FL y UV fueron significativas luego de las 4 h.

Utilizando proteínas puras de leche irradiadas con FL Dalsgaard [5] mostró que las caseínas son más lábiles ante la oxidación que las proteínas del suero de la leche que son globulares y compactas. Nuestros resultados muestran que en la leche entera ocurre lo contrario. Estos resultados están en línea con los de otros autores que ya han señalado que el comportamiento de los componentes aislados es difícil de relacionar con el de la mezcla original [13].

La distinta sensibilidad de las proteínas de la leche en su matriz natural o de las proteínas aisladas [5] señalan la importancia de realizar experimentos con la matriz natural de un producto alimentario cuando se trata de sacar conclusiones sobre los procesos oxidativos y no con sus componentes aislados.

Estos datos pueden ser importantes para la industria ya que el balance entre caseínas y proteínas del suero ha sido relacionado con la alergenicidad de la leche [14] y por lo tanto se podrían diseñar procesos industriales y de almacenamiento que preserven la proporción relativa de las proteínas de la leche. También pueden llegar a influir en los aspectos industriales o fisiológicos que requieren la acción de enzimas, como la quimosina (para la preparación del queso) o la pepsina (en la digestión humana).

ASPECTOS FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS DE LECHE OXIDADA

Proteólisis enzimática de la leche expuesta a diferentes tipos de luz

Se ha sugerido que la accesibilidad de las proteínas del suero a las enzimas proteolíticas depende del grado de agregación, ya que la digestión in vitro del total de las proteínas del suero disminuye en función de la intensidad del tratamiento térmico que se les aplica [15-16]. La proteólisis por enzimas digestivas (pepsina y quimosina) podría verse dificultada por la formación de agregados proteicos. Por esto se realizaron experimentos en los que se evaluó la digestión por pepsina y la coagulación por quimosina luego de la exposición de LE a UV o FL.

Digestión con pepsina

La pepsina es una enzima que se encuentra en el estómago que actúa a pH ácido sobre los enlaces peptídicos de aminoácidos hidrofóbicos, principalmente los aromáticos [17].

Leche entera en polvo reconstituida irradiada por luz UV o FL por 8 h, fue expuesta a la digestión por pepsina durante 0, 15, 30 y 60 min. Se observó que las proteínas de leche, especialmente las caseínas, fueron clivadas tan fácilmente como aquellas en las muestras de leche que no fueron expuestas a la luz. Luego de 15 min de actividad enzimática, solo quedó remanente un 2% del contenido respecto de las proteínas a tiempo cero, indicando que la oxidación proteica por UV no favoreció, ni disminuyó la proteólisis por pepsina en las caseínas (Figura 9). En las proteínas del suero parece aumentar la digestión por pepsina de las muestras oxidadas por UV durante 8 h.

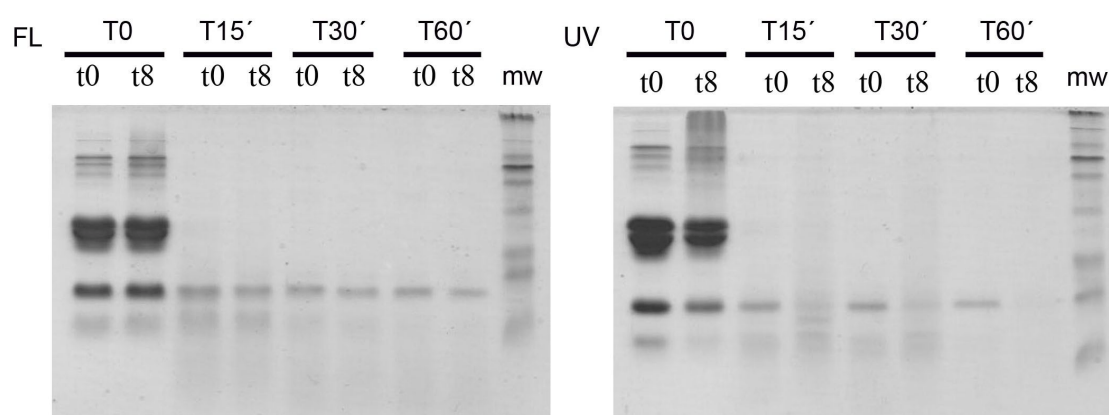


Figura 9. Digestión con pepsina de leches irradiadas con FL o UV. Las proteínas de las muestras de leche irradiada fueron digeridas por pepsina y resueltas por SDS-PAGE en condiciones reductoras. Las muestras fueron expuestas a la luz por 0 u 8 horas (t0 ó t8, respectivamente), y digeridas por 0, 15, 30, o 60 min (T0, T15', T30', y T60', respectivamente). **mw**: marcador de peso molecular

Este resultado es importante ya que la resistencia a la digestibilidad de las proteínas es asociada a la alergenicidad de las proteínas de la leche, especialmente a las proteínas del suero [18].

A pesar de la formación de oligómeros y agregados que se encontraron en las proteínas de la leche, los resultados obtenidos de digestibilidad en este experimento no están de acuerdo con otros de la bibliografía que afirman que las modificaciones de la estructura terciaria [19], y los tratamientos térmicos [20], disminuyen la digestibilidad. El tratamiento oxidativo por UV degrada los aminoácidos aromáticos preferentemente, lo cual favorece la proteólisis en dichos enlaces peptídicos [10] por lo tanto este tipo de tratamiento oxidativo parece favorecer la actividad de las enzimas proteolíticas ya que estas atacan preferentemente las proteínas parcialmente desplegadas o degradadas.

Coagulación de leche por quimosina

La coagulación de la leche es un proceso importante en la fabricación de los quesos. Se estudió el rendimiento de coagulación de la leche expuesta a la luz UV y FL por quimosina. La irradiación de la leche podría producir desnaturalización de proteínas del suero de la leche, como β -lactoglobulina, que precipiten y se unan a las micelas de caseínas impidiendo el clivaje de κ -

caseína por la quimosina, como se ha descrito para la leche expuesta a tratamientos térmicos [21-22].

En la Tabla 3 se muestra la cantidad de proteínas en: leche que no fue sometida a la acción de la quimosina, suero sobrenadante de la leche tratada con quimosina y después de centrifugar, y el producto de la resta de estas dos cantidades, que debería corresponder a la proteína coagulada y precipitada por acción de la centrifugación. A las 24h de irradiación UV se observó que se perdieron 13,5 mg/mL de proteína de leche, equivalentes a un 30,5% del valor inicial, 4,1mg/mL de proteína del suero y 9,5mg/mL de caseína (leche-sobrenadante) equivalente a un 28,4%, respecto del valor de proteínas en cada fracción al tiempo cero. Esta disminución observada podría ser causada por la formación de agregados insolubles, la destrucción de aminoácidos aromáticos y a la proteólisis, teniendo en cuenta que la cantidad de proteínas fue medida por el método de Bradford [23].

Tiempo irradiación(h)	Leche (mg/mL)	Sobrenadante (mg/mL)	Leche-sobrenadante (mg/mL)
0	44,3	10,8	33,5
1	41,2	8,4	32,8
2	45,5	7,7	37,8
4	44,9	7,2	37,7
8	42,4	6,4	36,0
24	30,8	6,7	24,0

Tabla 3. Efecto de la irradiación UV sobre la partición de proteína de leche coagulada por acción de la quimosina. Las muestras de leche fueron expuestas a UV por los tiempos indicados y luego coaguladas por acción enzimática. Las proteínas se determinaron antes de la acción enzimática (segunda columna), y en el sobrenadante luego de centrifugar la muestra.

Con estos resultados no es posible inferir si la actividad de coagulación por quimosina se ve afectada por la cantidad de oxidación que ha sufrido la leche, sólo saber cuánta proteína se perdió por oxidación y cuál sería la reducción del rendimiento esperado. Debido a esto es que se realizó otro tipo de experimentación donde se midió la masa total retenida en el coágulo y determinada como peso húmedo y como peso seco, ya que las dos mediciones pueden arrojar diferencias.

En la Figura 10 se puede observar que la exposición a la luz FL no afectó la partición de los componentes de la leche entre el coágulo y el suero. La retención de masa en el precipitado seco obtenido por incubación con quimosina fue similar a la de las muestras no expuestas. El pequeño descenso en la masa seca observada luego de 24 h de exposición a UV pudo estar relacionado a la proteólisis a ese tiempo ($100 \pm 2\%$ y $95 \pm 2\%$ para el control y UV, respectivamente; $P < 0.03$). El aumento en la retención de agua en el coágulo de LE expuesta a UV podría estar dado por un aumento en la hidrofiliidad causada por la oxidación de las moléculas de caseína, en forma similar a lo descrito para caseína expuesta a luz FL [24] o a la agregación de proteínas del suero tratadas térmicamente [15].

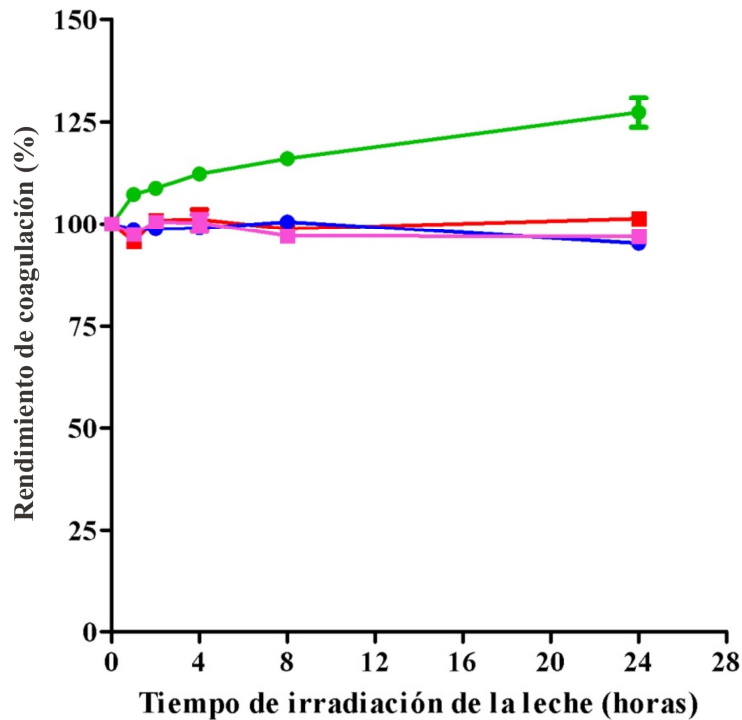


Figura 10. Efecto de la irradiación fluorescente (FL) ó UV de la leche en la coagulación por quimosina. ● = rendimiento de coagulación húmedo de leche entera expuesta a luz UV, ■ = rendimiento de coagulación húmedo de leche entera expuesta a luz FL ● = rendimiento de coagulación liofilizado de leche entera expuesta a luz UV, ■ = rendimiento de coagulación liofilizado de leche entera expuesta a luz FL. Los resultados fueron expresados como la media \pm SEM de las muestras analizadas por triplicado, considerando 100% al rendimiento de la muestra sin exponer a la luz.

Actividad secuestradora de radicales de leche expuesta a UV

Se ha propuesto que los péptidos derivados de las proteínas lácteas podrían utilizarse en alimentos como antioxidantes ya que se ha descrito que poseen actividad secuestradora de radicales libres [25-26]. Por esto se decidió probar si la capacidad de secuestrar radicales libres de la leche aumenta en función del tiempo de irradiación de luz ultravioleta. En la Figura 11 se observa que después de 24 horas de irradiación hubo un aumento importante en la capacidad de secuestrar radicales libres, es interesante que en estas condiciones se genera una considerable cantidad de péptidos por proteólisis (Figuras 6 y 7).

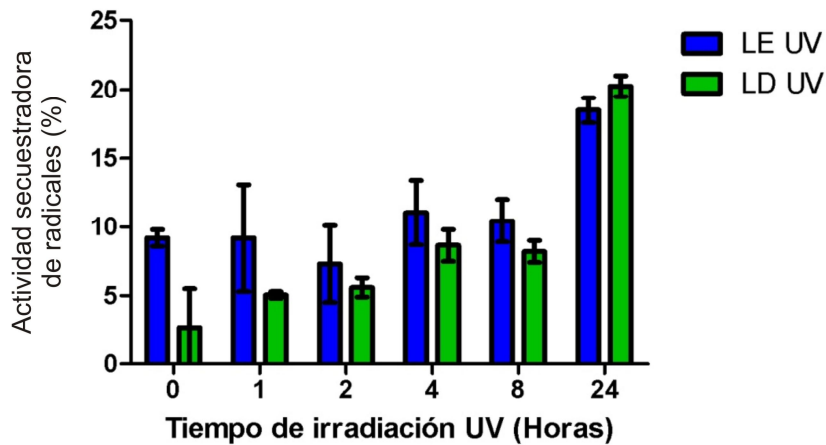


Figura 11. Actividad secuestradora de radicales libres de leche expuesta a luz UV. Se estudió la actividad secuestradora de radicales libres (% inhibición de DPPH) en leche entera (LE) y descremada (LD) expuesta a la luz UV por los tiempos indicados. Se muestran los promedios de tres experimentos.

Capacidad de la leche como sustrato de crecimiento de un hongo: efecto de la irradiación UV

Penicillium roqueforti es un hongo aeróbico que se utiliza en la producción de quesos azules. Como los experimentos anteriores han mostrado que la exposición de la leche en polvo entera (LE) y descremada (LD) reconstituida, expuestas a irradiación lumínica sufren alteraciones en sus componentes proteicos, se decidió evaluar si éstas afectan el desarrollo de *Penicillium roqueforti* en medios de cultivo sólidos. Para esto se prepararon medios de cultivos con leche que fue previamente irradiada por 0, 4, 8, 12 y 24 horas con luz UV y FL simultáneamente (UVFL).

Se observó una disminución del crecimiento de *P. roqueforti* en función del tiempo de exposición a luz UVFL de la leche (Figura 12). Esto muestra que en la leche tratada por UVFL se podría estar produciendo un componente que actúa como inhibidor del crecimiento del hongo o disminuyendo la capacidad nutricional de la leche en función del aumento de oxidación.

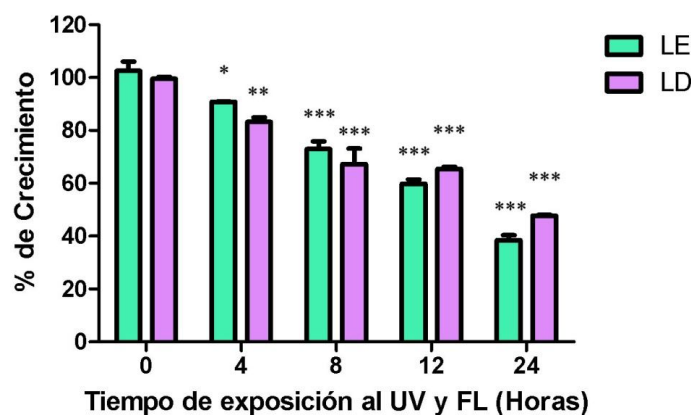


Figura 12. Crecimiento de *P. roqueforti* sobre sustrato leche irradiada con UV y FL por distintos periodos de tiempo. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS DEL SUERO DE LECHE EXPUESTO A DISTINTOS TRATAMIENTOS

En las secciones anteriores hemos demostrado que las proteínas del suero son más susceptibles a cambios oxidativos que las caseínas. También hemos demostrado que la cantidad de proteínas que se recuperan en el suero obtenido por acción de quimosina en leche oxidada y nativa es similar. Ahora mostraremos experimentos que realizamos tendientes a estudiar qué sucede cuando se separa el suero y luego se lo somete a tratamientos oxidantes.

Lactosuero se sometió a distintos tratamientos oxidativos siempre en presencia de luz ultravioleta. Estos tratamientos incluyeron además peróxido de hidrógeno o/y metales divalentes que han sido señalados como importantes en la oxidación de la leche y de otros fluidos biológicos [27-28].

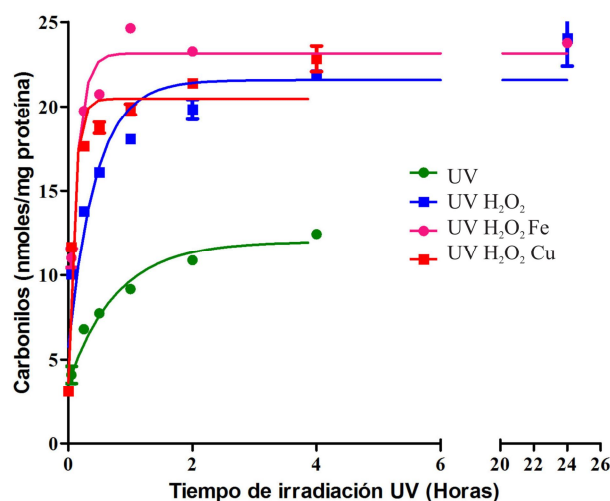


Figura 13. Formación de carbonilos en lactosuero. UV. ● = luz UV, ● = luz UV y peróxido de hidrógeno, ■ luz UV, peróxido de hidrógeno y Fe⁺². ■ = luz UV, peróxido de hidrógeno y Cu⁺². Los resultados fueron expresados como la media ± SEM de las muestras analizadas por triplicado.

En la Figura 13 se puede observar que la formación de carbonilos fue mucho más rápida cuando se irradió en presencia de peróxido de hidrógeno y que la inclusión de metales divalentes aumentó aún más la velocidad de aparición de carbonilos proteicos. Este gran aumento que se produce al incorporar metales junto con el peróxido de hidrógeno se debe a la formación de los radicales OH• que son altamente reactivos y son capaces de reaccionar con la mayoría de los compuestos orgánicos. Cuando se comparó los parámetros cinéticos del suero con el de la leche entera (Figura 3) se observa que la velocidad es más de 10 veces más rápida y llega al mismo valor de carbonilos por mg de proteína cuando se irradia en presencia de peróxido.

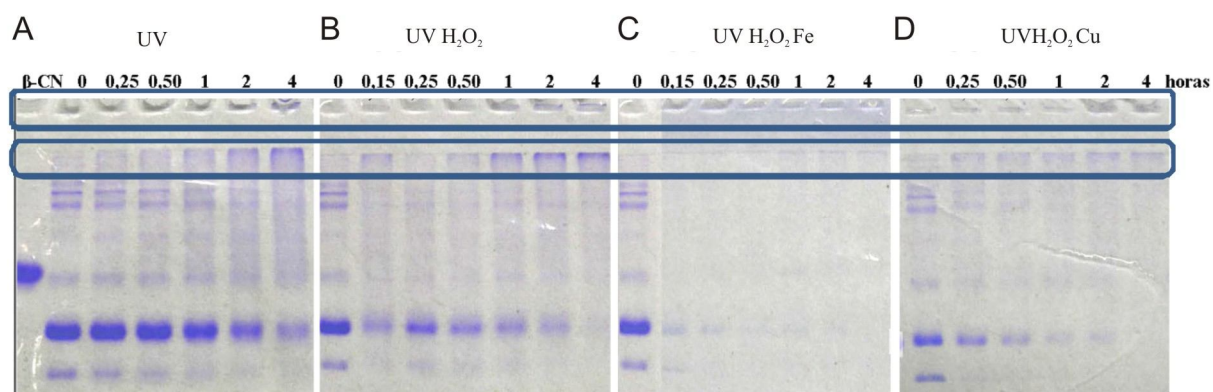


Figura 14. Formación de oligómeros y agregados en lactosuero. SDS-PAGE en condiciones reductoras de lactosuero expuesto a distintos tratamientos oxidantes: **(A)** UV, **(B)** UV y peróxido de hidrógeno, **(C)** UV, peróxido de hidrógeno y Fe^{+2} y **(D)** UV, peróxido de hidrógeno y Cu^{+2} . Los tiempos de exposición se indican sobre el carril. Se fotografió el gel retenedor (gel superior), junto con el gel separador (gel inferior). Tiempos de exposición: 0, 0,25, 0,50, 1, 2 y 4 h. β -CN: marcador de peso molecular de la β -caseína (24kDa).

En la Figura 14 se observó que, cuando se irradió el lactosuero con UV por una hora, la cantidad de β -lactoglobulina disminuyó y que la cantidad de oligómeros y agregados aumentó. Después de 4 horas de irradiación la cantidad de proteína de suero nativa fue menos del 20 % del valor inicial y la cantidad de agregados aumentó notoriamente. Cuando los tratamientos se realizaron en presencia de peróxido de hidrógeno se observó una disminución importante de proteína aún al tiempo menor medido. La adición de metales divalentes causó la desaparición de proteína, que fue más notoria para hierro que para cobre. La disminución de proteína total por carril se debe a la proteólisis, ya que los péptidos pequeños no son retenidos en el gel.

En otra serie de experimentos se probó como afectaba el nivel de carbonilos, ditirosina (Figura 15) e inmunoreactividad frente anticuerpos anti α -LA y anti β -LG nativa frente a la exposición a distintos tratamientos microbicidas alternativamente (Figura 16): irradiación por luz UV durante 24 h, irradiación por luz UV y recirculación por bombeo (Materiales y Métodos) y un tratamiento térmico a 80 °C por 15 minutos.

Se observó un incremento en la formación de carbonilos proteicos al exponer al lactosuero a los tratamientos térmico, a irradiación UV durante 24 h e irradiación UV por bombeo y recirculación por 9,7 min. La formación de ditirosina también aumentó en las dos primeras condiciones pero no por temperatura (Figura 15). Cuando se realizó la correlación entre las dos variables dependientes se obtuvo significancia ($p < 0,04$), señalando que el comportamiento de éstas está fuertemente relacionado.

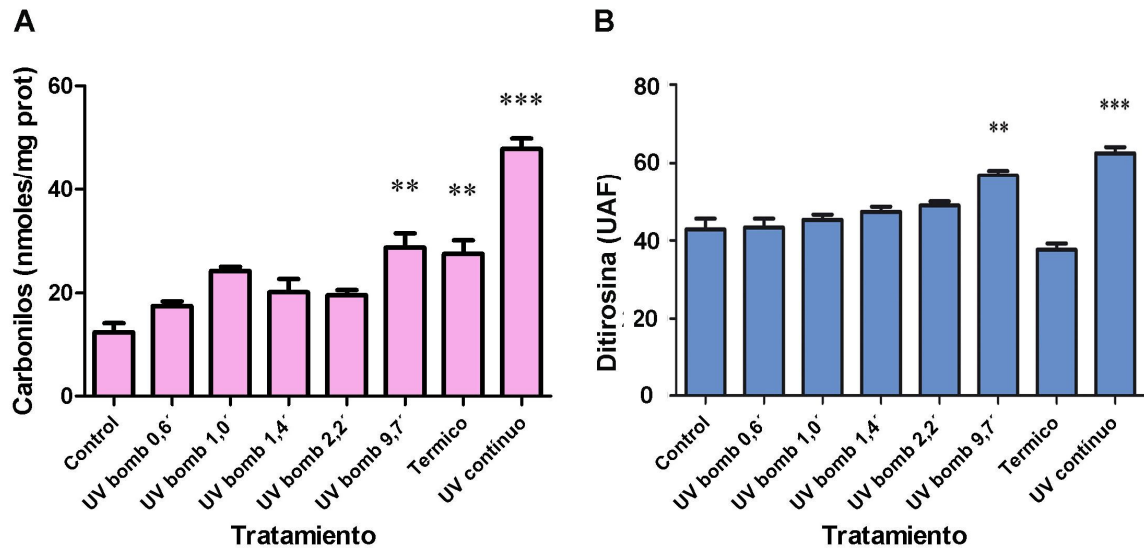


Figura 15. Oxidación de lactosero expuesto a distintos tratamientos microbicidas. Panel A Carbonilos Proteicos, Panel B Ditirosina. Control: lactosero sin tratamiento. **UV bomb:** lactosero irradiado por UV-C en columna, con recirculación y bombeo del lactosero por distintos periodos de tiempos (0,6', 1,0', 1,4', 2,2', y 9,7'). **Térmico:** lactosero sometido a calentamiento a 80°C por 15 minutos. **UV continuo:** lactosero sometido a irradiación UV por 24h de continuo, sin recircular, ni bombear. * P ≤ 0,05, ** P ≤ 0,01, *** P ≤ 0,001.

Cuando se analizó la reactividad con dos anticuerpos específicos para las proteínas del suero se observó una disminución en la inmunoreactividad en función del tiempo de exposición a la luz de la α -LA y β -LG, indicando un cambio en la estructura terciaria (Figura 16). Lo mismo ocurrió con el tratamiento térmico. Sorprendente fue lo encontrado con UV continuo ya que la inmunoreactividad para la α -LA aumentó levemente (115±6%) respecto al control y no se observaron diferencias en el caso de β -LG (Figura 16).

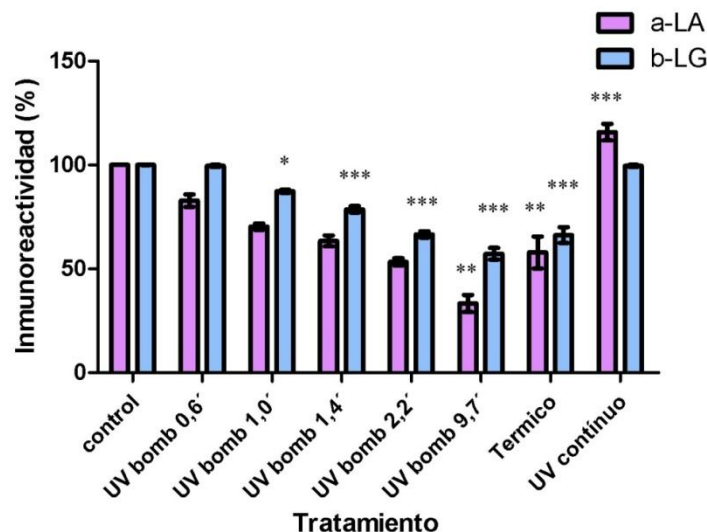


Figura 16. Inmunoreactividad frente a anticuerpos anti α -lactoalbúmina y anti β -lactoglobulina del lactosero expuesto a distintos tratamientos microbicidas. Control: lactosero sin tratamiento. **UV bomb:** lactosero irradiado por UV-C en columna, con recirculación y bombeo del lactosero por distintos periodos de tiempos (0,6', 1,0', 1,4', 2,2', y 9,7'). **Térmico:** lactosero sometido a calentamiento a 80°C por 15 minutos. **UV continuo:** lactosero sometido a irradiación UV por 24h de continuo, sin recircular, ni bombear. * P ≤ 0,05, ** P ≤ 0,01, *** P ≤ 0,001.

Se concluye que el tratamiento por UV no resulta una alternativa germicida con mayores beneficios que el tratamiento por calor, ya que éste tratamiento afecta de igual o mayor manera a la calidad proteica de la leche. Estos datos muestran que el aumento en el grado de oxidación y desnaturalización proteica que se produce como consecuencia de los tratamientos de irradiación con UV-C o térmicos es similar.

CONCLUSIÓN GENERAL CAPÍTULO 1

En este capítulo hemos visto que al irradiar con UV y FL se producen cambios en la estructura primaria de las proteínas de la leche entera, descremada y en el lactosuero, evidenciados principalmente por la formación de carbonilos proteicos. Es importante destacar que las velocidades de formación fueron distintas para las tres matrices estudiadas, siendo la velocidad más rápida a medida que la matriz fue más simple.

También se pudo comprobar que al exponer la leche a la radiación UV se produjeron cambios en la estructura terciaria de las proteínas, ya que se evidenció proteólisis y formación de oligómeros y agregados de alto peso molecular. Estos oligómeros fueron formados por distintos tipos de enlaces covalentes, principalmente puentes disulfuros y enlaces ditirosina.

Los cambios producidos en la estructura primaria y terciaria de las proteínas fueron acompañados por cambios en la funcionalidad de las proteínas de la leche, ya fuese que estuvieran en la matriz natural o en el lactosuero.

Las diferencias observadas entre la oxidación en matrices de distinta complejidad planteó la necesidad de realizar estudios en las proteínas aisladas de la leche. En el próximo capítulo se aborda esta temática.

CAPÍTULO 2: ESTUDIO DE LA OXIDACIÓN DE LAS PROTEÍNAS AISLADAS DE LECHE POR AGENTES DE RELEVANCIA INDUSTRIAL

OXIDACIÓN DE β -LACTOGLOBULINA, β -CASEÍNA Y α -LACTOALBÚMINA

Cambios en la estructura primaria de las proteínas por radiación UV

Se eligió estudiar la oxidación de β -caseína (β -CN), una de las principales proteínas del coágulo de la leche, y de β -lactoglobulina (β -LG) y α -lactoalbúmina (α -LA), proteínas mayoritarias del suero. Esta elección nos permitió sacar relaciones entre el proceso oxidativo y la estructura terciaria de las proteínas, ya que β -CN posee una estructura tridimensional flexible, poco estructurada a cual se la ha denominado estructura reomórfica [29], mientras que β -LG posee una estructura globular compacta y α -LA una estructura parcialmente desordenada [8, 5, 30]. Como se hizo con las proteínas en la leche entera en el capítulo 1, se procedió a analizar cómo la irradiación por luz UV altera la estructura primaria de aminoácidos. Para ello se determinó carbonilos proteicos, *N*-formilquinurena (NFK), ditirosina y disminución de triptófano.

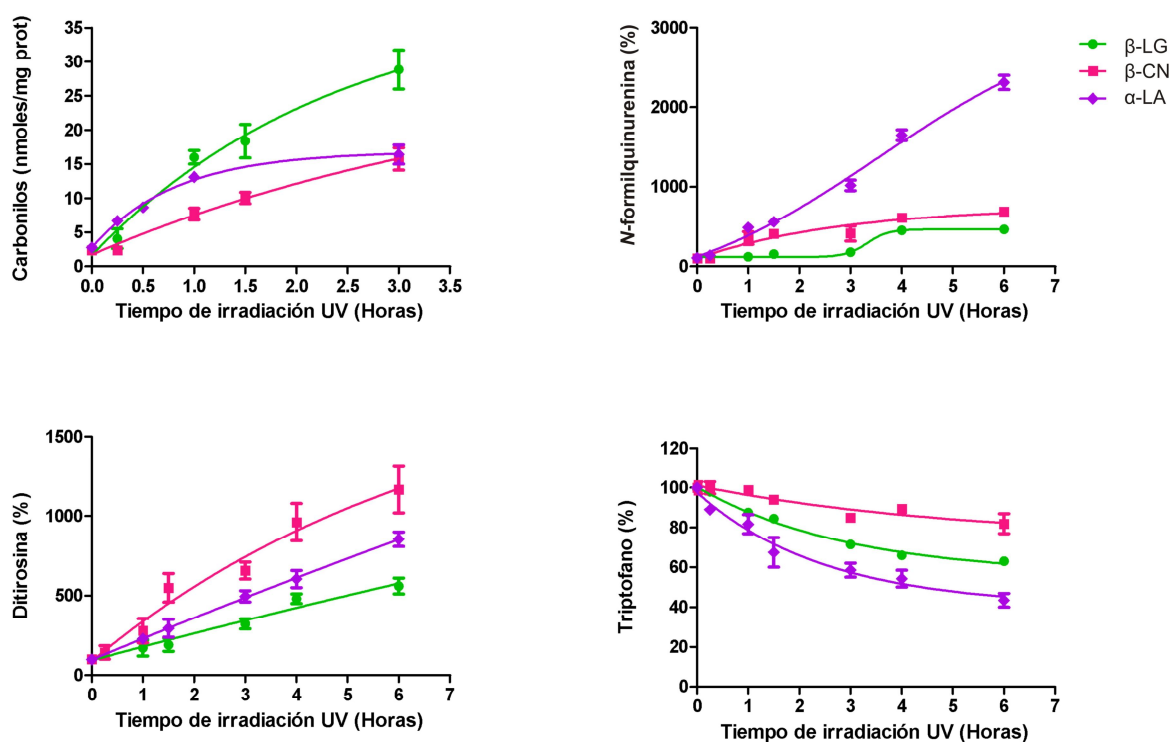


Figura 1. Oxidación de aminoácidos de β -LG, β -CN y α -LA por irradiación UV. (A). Carbonilos formados en β -LG, β -CN y α -LA, determinados por la técnica colorimétrica de Levín, expresados en nmoles/mg de proteínas. (B). *N*-formilquinurena en β -LG, β -CN y α -LA. (C). Ditirosina en β -LG, β -CN y α -LA. (D). Triptofano en β -LG, β -CN y α -LA. Los parámetros medidos en B, C y D se determinaron por fluorescencia, y son expresados como porcentaje respecto del control a tiempo cero, con valor 100%.

En la Figura 1 se puede observar que la formación de carbonilos fue mayor para β -lactoglobulina que para β -caseína y α -lactoalbúmina. Cuando se analizó la aparición de *N*-formilquinurena, un producto de carbonilación del triptófano, la situación fue inversa ya que hubo mayor formación de NFK en α -lactoalbúmina que en las otras proteínas. La formación de ditirosina fue mayor para β -caseína que para β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina.

Todas las cinéticas se ajustaron a un modelo de primer orden, menos la formación de *N*-formilquinurena en β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina. En estas proteínas el modelo que logró ajustar la curva fue un modelo cooperativo, que en realidad muestra que hay más de un estado nativo, uno en el que no hay formación de *N*-formilquinurena (antes de las 4 horas) y otro en el que se forma la cantidad máxima (después de las 4 horas). En el caso de β -lactoglobulina la cinética se ajustó a un modelo todo o nada [31-32]. Este modelo contempla un estado inicial para la proteína (β -lactoglobulina) en su estado nativo (N), que al ser irradiada por UV se desnaturaliza parcialmente, adquiriendo una estructura nativa parcialmente desplegada (N') que es más susceptible de ser oxidada y formar *N*-formilquinurena que la estructura nativa inicial (N). Por lo tanto N' reacciona más rápido que N para formar la proteína con *N*-formilquinurena y no se observa acumulación de la forma parcialmente desplegada sin oxidar, sino que todo el producto está desplegado y oxidado [32-33]. No se puede saber si hay uno o más de un intermediario parcialmente desplegado ya que los intermediarios más desplegados reaccionarían con mayor velocidad que los más cercanos en estructura a la proteína nativa [32-33]. La cinética sigmoidea de aparición de *N*-formilquinurena junto con la marcada pérdida de triptófano en α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina son compatibles con la proteólisis después de 4 horas de irradiación, ya que la proteólisis está relacionada con la pérdida de triptófano para formar *N*-formilquinurena [10]. Más adelante se aborda esta cuestión con experimentos específicos para intentar dilucidar si efectivamente hay proteólisis después de 4 horas de irradiación UV.

Se decidió estudiar el efecto de la inclusión de ácido gálico, un antioxidante resistente al calentamiento, para ver si es posible prevenir la aparición de carbonilos causada por irradiación UV. La principal fuente de ácido gálico de la dieta es el té, principalmente té verde [34] y se ha demostrado que se une covalentemente a los grupos amino libres de las proteínas del suero [35], es por ello que los experimentos se realizaron con β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina.

La Tabla 1 muestra que la inclusión de ácido gálico modificó los parámetros cinéticos de aparición de carbonilos para las dos proteínas β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina: produjo una reducción en la cantidad máxima de carbonilos proteicos alrededor del 25 % o del 50% respectivamente sin afectar la velocidad de reacción. Por lo tanto el gálico actúa como un antioxidante no competitivo, sugiriendo que produce un cambio en la conformación estructural de ambas proteínas, probablemente por unión a éstas. Se ha descrito que los polifenoles del té interactúan con las caseínas y que esta interacción disminuye la cantidad de estructuras α -hélice y hoja β -plegada y aumenta la cantidad de proteína desplegada [36].

	β -lactoglobulina	β -lactoglobulina + ácido gálico	α -lactoalbúmina	α -lactoalbúmina + ácido gálico
Velocidad (t ½ minutos)	173 ± 34	200 ± 44	192 ± 35	226 ± 45
Cmax (nmoles/mg proteína)	39 ± 4	31 ± 3*	21 ± 2	13 ± 2*

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la formación de grupos carbonilos proteicos. Las proteínas aisladas fueron irradiadas por luz UV hasta tres horas, se determinó carbonilos a seis tiempos distintos. El ajuste de los parámetros cinéticos se realizó con el programa Simfit utilizando los modelos monomolecular. Los \pm corresponden a los errores estándar. Estas ecuaciones fueron elegidas porque aportaban el mejor modelo de ajuste para los datos experimentales (según el patrón de los residuales y el menor r^2). $p < 0,001$.

Nuestros datos son interesantes ya que la inclusión de ácido gálico podría disminuir la formación de carbonilos en las proteínas del suero aisladas cuando éstas son sometidas a tratamiento térmico.

En otro experimento (Figura 2) se probaron los antioxidantes sintéticos BHT (3,5-di-tert-4-butilhidroxitolueno) y terbutil-hidroquinona (BHTQ), muy utilizados en alimentos para impedir la autooxidación de los lípidos, debido a que son dadores de átomos de hidrógeno [37]. En este experimento se evaluó la capacidad de preservar la estructura de las proteínas de leche, al ser irradiadas por UV por un periodo de tiempo de 0 a 24h.

Como resultado no se observaron diferencias significativas en los perfiles de proteína por SDS-PAGE, indicando que éstos antioxidantes no impiden la polimerización de las proteínas ni la fragmentación (Figura 2). Tampoco se observaron diferencias en la formación de carbonilos proteicos respecto de los controles sin oxidar (datos no mostrados). Se concluye que estos antioxidantes podrían utilizarse en la preservación de leche entera ya que inhiben la oxidación lipídica pero que no serían útiles en productos pobres en grasas. Esta observación es concordante con lo reportado por otros autores que han evaluado la actividad de BHT en leche y productos lácteos [38].

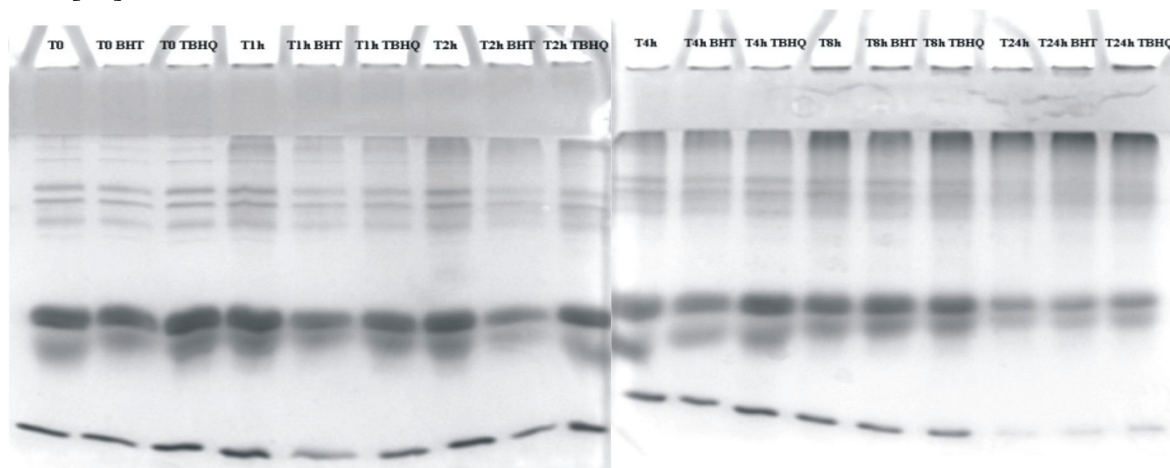


Figura 2. Perfil de proteínas de leches irradiadas con UV: efecto del BHT y BHTQ. Muestras de leches irradiadas por UV durante los tiempos (T_n) indicados ($n=0, 1, 2, 4, 8$ y 24 h) en ausencia de antioxidante, en presencia de BHT, y en presencia de BHTQ. De izquierda a derecha se sembró en los carriles: T0: leche sin irradiar, TOBHT: leche sin irradiar con BHT, TOBHTQ: leche sin irradiar con BHTQ. Los carriles que siguen se repiten con mayor tiempo de irradiación (T_n : leche irradiada por n horas, T_n BHT: leche con BHT irradiada por n horas, T_n BHTQ: leche con BHTQ irradiada por n horas).

Oxidación de β -lactoglobulina y β -caseína por irradiación UV en presencia de peróxido de hidrógeno y metales divalentes

El papel del cobre y hierro en la formación de ditirosina en matrices complejas que contienen peróxido de hidrógeno ha sido estudiado. MacGregor (2011) [39] mostró que el cobre, pero no el hierro, es capaz de favorecer la formación de ditirosinas en presencia de peróxido de hidrógeno y que la cantidad de enlaces formados es proporcional a la cantidad de tirosinas en la secuencia primaria de la proteína. Es importante recordar que caseína es una de las proteínas con mayor abundancia relativa de este aminoácido. La intervención de cobre en la formación de enlaces ditirosinas ha sido descrito además para lipoproteínas y la proteína del amiloide [28, 40]. Por esto se procedió a investigar los efectos de la oxidación con UV en presencia de peróxido de hidrógeno y cobre o hierro. Se analizó la formación de carbonilos, ditirosina, *N*-formilquinurena y disminución de triptófano.

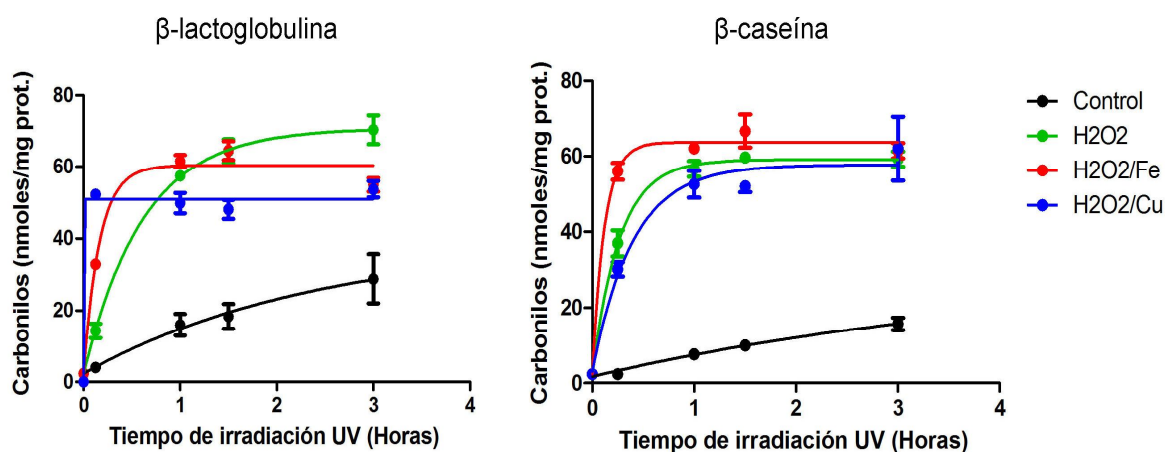


Figura 3. Cinética de formación de carbonilos en β -LG y β -CN con UV en presencia de peróxido de hidrógeno y cobre o hierro. Los carbonilos proteicos fueron determinados colorimétricamente. Los resultados fueron expresados como nanomoles de carbonilos proteicos por miligramo de proteína y representan el promedio \pm SEM de tres experimentos.

La inclusión de peróxido de hidrógeno aceleró la formación de carbonilos en las dos proteínas probadas, y se llega a un valor máximo similar. La adición de un metal bivalente no aumentó significativamente la velocidad de reacción ni el máximo alcanzado; alcanzándose estos niveles después de 1 h (50 a 70 ± 5 nmol/mg proteína) (Figura 3).

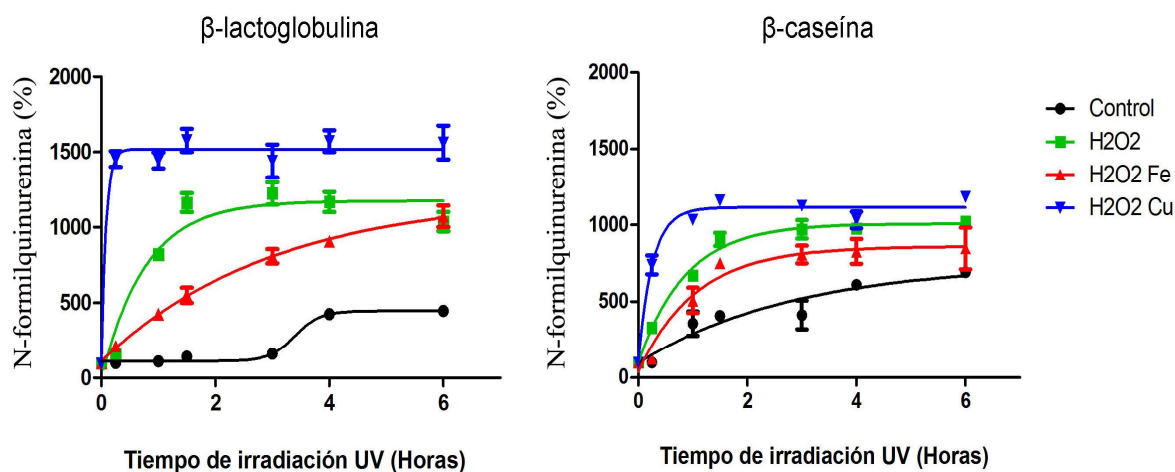


Figura 4. Cinética de formación de *N*-formilquinurena en β -LG y β -CN con UV en presencia de peróxido de hidrógeno y cobre o hierro. La NFK fue determinada fluorimétricamente. Los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) y representan el promedio \pm SEM de tres experimentos.

La formación de NFK tuvo cinéticas parecidas para las dos proteínas (Figura 4), se observó un aumento en la velocidad de aparición por la inclusión de peróxido de hidrógeno, la inclusión de cobre aumentó aún más esta velocidad, mientras que la de hierro disminuyó la misma. Esta observación es importante ya que se suele utilizar el tratamiento UV para esterilizar leche [41], el peróxido es un agente antimicrobiano utilizado en la línea de envasado de leche larga duración y no es imposible la presencia de cobre o de hierro en la línea de esterilización, homogeneización y secado de la leche. Nuestros resultados muestran que es imprescindible evitar que haya cobre y peróxido simultáneamente, mientras que la presencia de hierro parece impedir la actividad oxidante del peróxido. Algo similar ocurre con la formación de ditirosina (Figura 5).

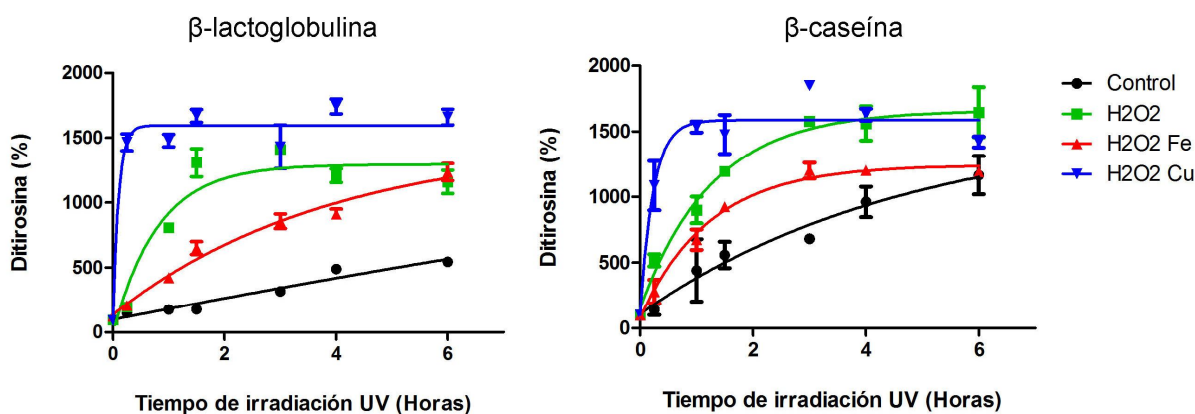


Figura 5. Cinética de formación de ditirosina en β -LG y β -CN con UV en presencia de peróxido de hidrógeno y cobre o hierro. La ditirosina fue determinada fluorimétricamente. Los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) y representan el promedio \pm SEM de tres experimentos.

Se ha descrito que el cobre interviene en la formación de enlaces ditirosina [39-40] y que no ocurre lo mismo con el hierro [42], pero no hemos encontrado en la literatura algún dato que nos permita explicar por qué el hierro en presencia de peróxido disminuye la velocidad de aparición de productos de oxidación de aminoácidos en comparación con la velocidad de formación con peróxido sin metal (Figura 4 y 5).

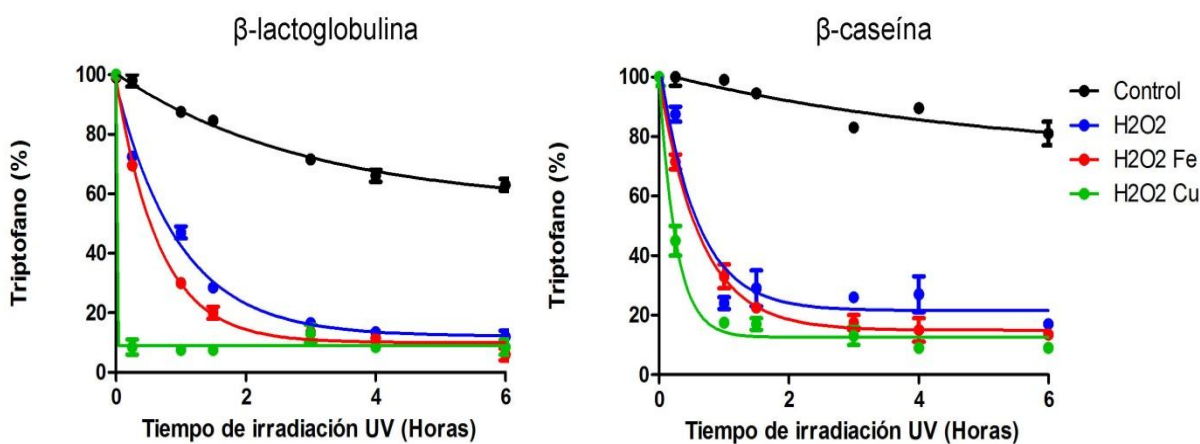


Figura 6. Cinética de desaparición de triptófano en β -LG y β -CN con UV en presencia de peróxido de hidrógeno y cobre o hierro. El triptófano fue determinado fluorimétricamente. Los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) y representan el promedio \pm SEM de tres experimentos.

La cinética de desaparición de triptófano en β -LG y β -CN irradiadas con UV en presencia de peróxido de hidrógeno y cobre o hierro (Figura 6) mostró cinéticas de decaimiento que se ajustaron con curvas de pseudo primer orden. La cinética de β -LG irradiada por UV en presencia de peróxido de hidrógeno y cobre fue inmediata (presentó el máximo valor de reducción de triptófano al primer tiempo analizado), por lo tanto no fue ajustada a ningún modelo cinético. En presencia de cobre la desaparición de triptófano fue casi completa antes de la hora de exposición. Lo que es evidente es que la desaparición de triptófano de β -LG fue inmediata.

Cambios en la estructura terciaria de β -caseína y β -lactoglobulina irradiadas con UV

Luego de analizar los cambios en la estructura primaria de las proteínas aisladas se evaluó la integridad estructural de β -caseína y β -lactoglobulina. Estas proteínas se irradiaron por luz UV, por luz UV en presencia de peróxido de hidrógeno, y por luz UV en presencia de peróxido de hidrógeno y metales (hierro ó cobre), y luego fueron separadas por peso molecular en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras. En este experimento se determinó la proteólisis, y la formación de oligómeros y agregados.

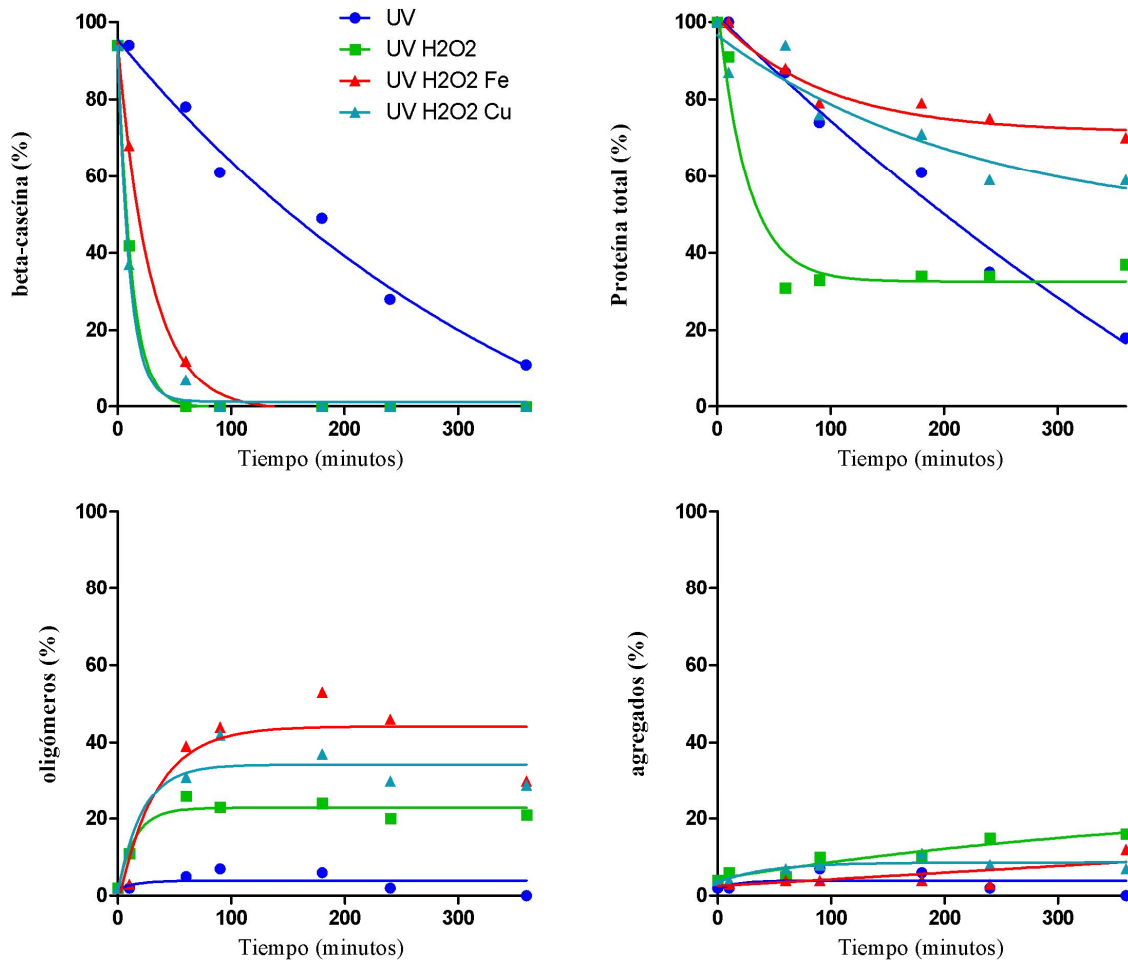


Figura 7. Cinética de los cambios en la estructura terciaria de β -caseína expuesta a UV. Las muestras de proteína fueron expuestas a la luz UV por los tiempos indicados. Las proteínas de leche fueron resueltas y cuantificadas por análisis de densitometría del SDS-PAGE en condiciones reductoras. Se muestra un experimento de tres que difirieron entre sí menos del 15 %.

Cuando se expuso β -caseína a irradiación UV (Figura 7), la banda de proteína nativa disminuyó en función del tiempo, y lo hizo más rápido en presencia de peróxido que no fue modificada significativamente por la inclusión de metales divalentes. La proteína total también disminuyó reflejando lo que ocurre con la proteína nativa ya que los péptidos pequeños, resultantes de la extensiva proteólisis que sufre la misma, no son cuantificados en el gel. Es interesante notar que la cantidad de proteína total refleja lo que se recupera como agregados y oligómeros en cada condición. En el gráfico se evidencia que la inclusión de los metales favoreció la formación oligómeros.

Cuando se analizó la integridad de β -lactoglobulina (Figura 8) se observó que la banda de proteína nativa fue disminuyendo en función del tiempo, y lo hizo más rápido en presencia de peróxido y esta no fue modificada significativamente por la inclusión de hierro. La proteína total también disminuyó reflejando lo que ocurre con la proteína nativa en forma similar a lo que ocurrió con caseína (Figura 7). Es interesante notar que la cantidad de proteína total remanente al

tiempo de mayor exposición a UV refleja lo que se recupera como tetrámero, y que la condición que más favoreció su formación fue UV más peróxido.

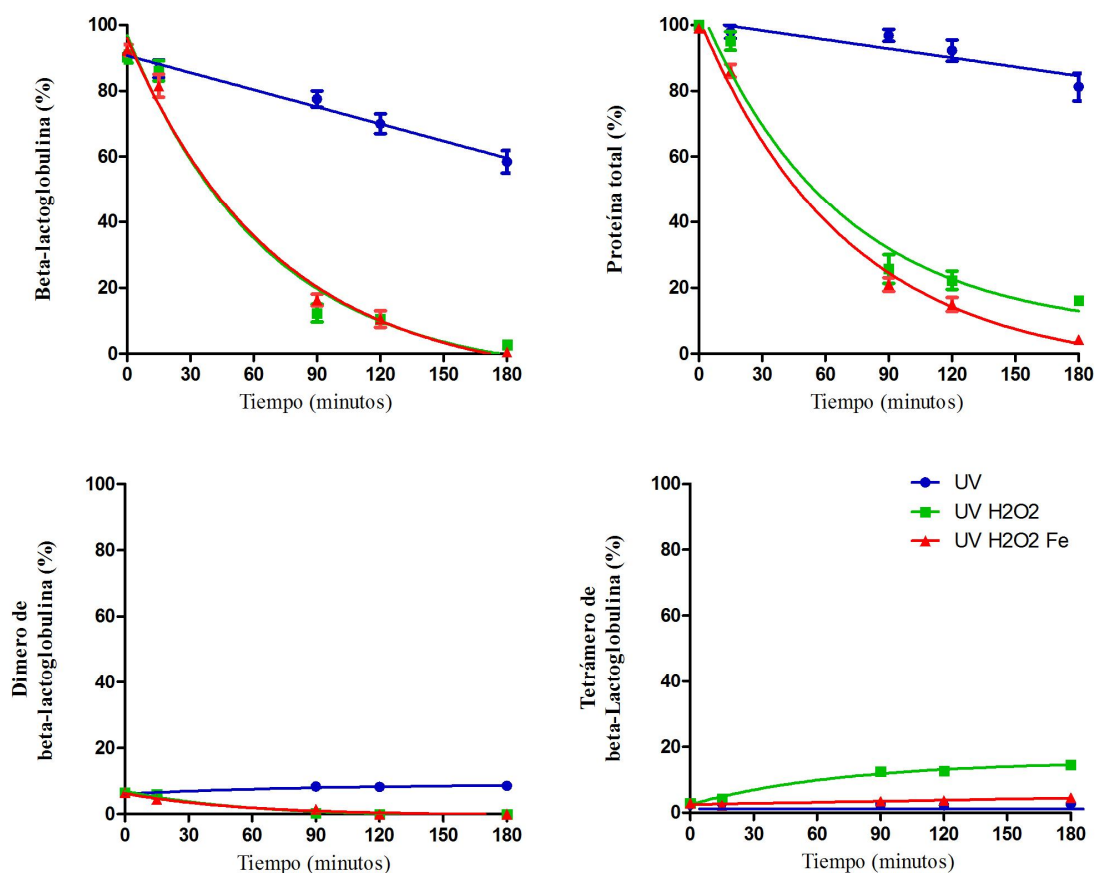


Figura 8. Cinética de los cambios en la estructura terciaria de β -lactoglobulina expuesta a UV. Las muestras de proteína fueron expuestas a la luz UV por los tiempos indicados. Las proteínas de leche fueron resueltas y cuantificadas por análisis de densitometría del SDS-PAGE en condiciones reductoras. Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar de tres determinaciones.

Formación de geles estables de β -lactoglobulina

Es conocido que los cambios en la estructura de las proteínas pueden llevar a la formación de fibrillas o de geles. La formación de fibrillas o de geles es de mucho interés tecnológico para la industria alimentaria y farmacéutica. La β -lactoglobulina ha despertado mucho interés y se ha encontrado que forma nano fibrillas cuando se somete a calentamiento [43-44], por lo tanto es interesante evaluar la formación de estas estructuras en condiciones menos drásticas, como la irradiación UV.

Se evaluó la formación de fibrillas tipo amiloide utilizando la técnica de la tioflavina que cambia las propiedades de fluorescencia cuando se une a fibrillas. En la Figura 9 se puede apreciar que aunque se pudo detectar un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia de tioflavina T en incubados con β -lactoglobulina sometida a calentamiento, no se pudo detectar este incremento cuando se incubó con β -lactoglobulina fotooxidada en distintas condiciones.

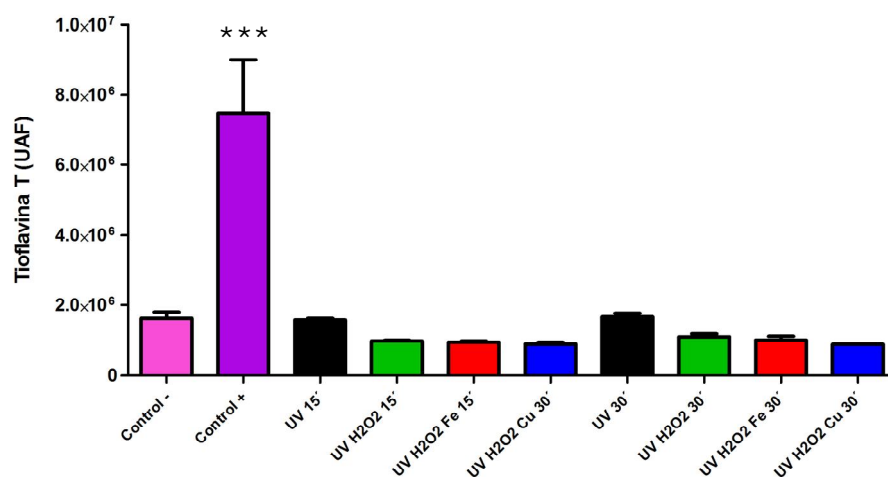


Figura 9. Formación de fibrillas de amiloide. Se determinó la presencia de fibrillas de amiloide por la reacción con Tioflavina T en β -lactoglobulina irradiada con luz UV, en presencia de peróxido de hidrógeno y de metales por distintos periodos de tiempo. Tratamientos: Control negativo: Control -. Control positivo: Control +. Irradiación UV (UV), UV en presencia de peróxido de hidrógeno (UV H₂O₂), y UV en presencia de peróxido de hidrógeno y hierro (UV H₂O₂ Fe) ó cobre (UV H₂O₂ Cu) por 15' y 30'. Las diferencias entre tratamientos fueron analizadas por ANOVA con un test de Tukey. * P ≤ 0,05, ** P ≤ 0,01, *** P ≤ 0,001.

A pesar de que no se detectaron cambios por Tioflavina T si se pudo observar la formación de geles a simple vista (Figura 10) después de seis horas de irradiación en presencia de peróxido de hidrógeno ya sea en presencia o ausencia de metales divalentes. Esto demuestra que se pueden obtener geles sin la formación de fibrillas en β -lactoglobulina. A las 4h de irradiación UV también se observa la aparición de color a amarillo y un poco de turbidez en las muestras de β -lactoglobulina irradiadas en presencia de peróxido de hidrógeno y metales (FeSO₄ y Cu₂SO₄).

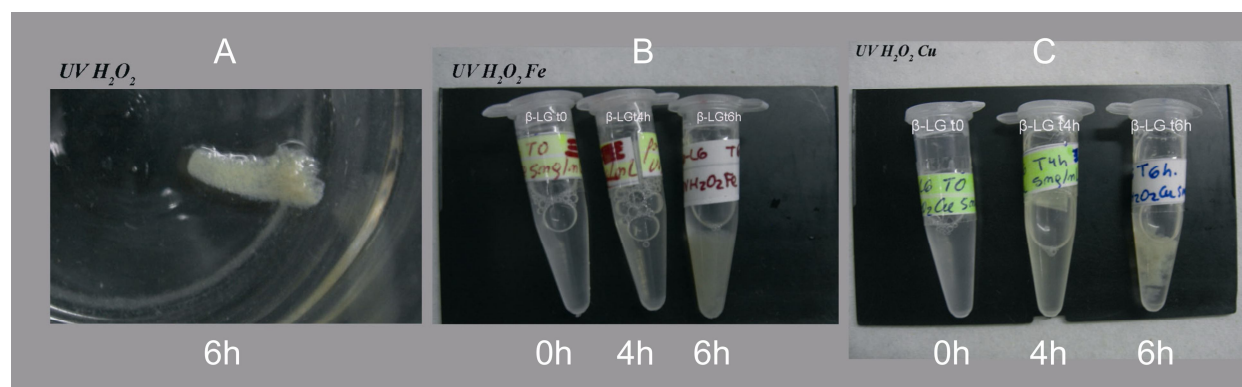


Figura 10. Formación de geles de β -lactoglobulina. (A) β -lactoglobulina irradiada por UV en presencia de peróxido de hidrógeno durante seis horas. (B) β -lactoglobulina sin irradiar (tubo izquierdo), irradiada durante 4 h (tubo en el centro) e irradiada durante 6 h (tubo derecho) por UV en presencia de peróxido de hidrógeno y hierro. (C) β -lactoglobulina sin irradiar (tubo izquierdo), irradiada durante 4 h (tubo en el centro) e irradiada durante 6 h (tubo derecho) por UV en presencia de peróxido de hidrógeno y cobre.

En β -caseína, con los tratamientos más oxidantes, se observó formación de agregados insolubles pero no se observó la formación de geles. La formación de oligómeros y agregados de β -caseína fue muy importante cuando hubo metales divalentes en el medio de incubación (Figura 11). La formación de complejos de caseína con cationes divalentes para formar precipitados es conocida y ha sido atribuida a la gran cantidad de residuos fosfoserina que esta proteína posee [45].

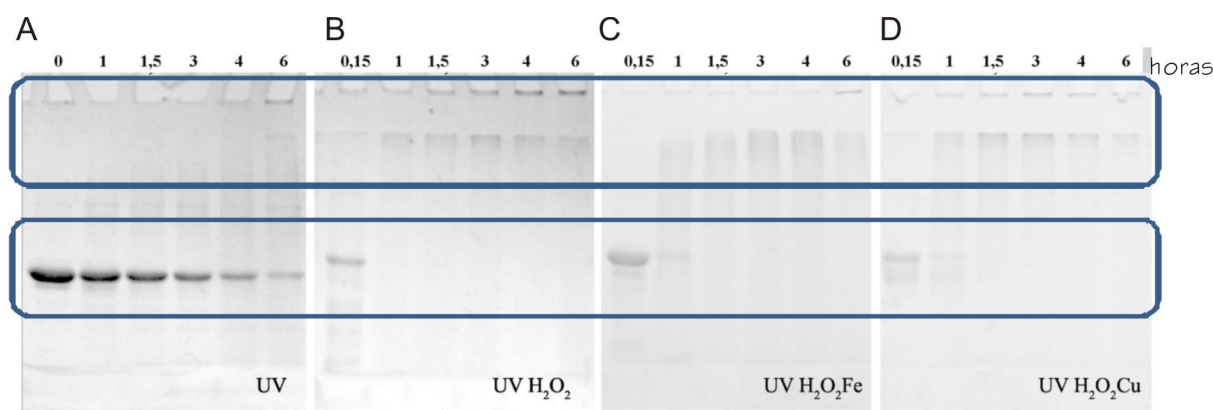


Figura 11. Formación de oligómeros y agregados de β -caseína. La proteína se irradió con UV (A); con UV en presencia de peróxido de hidrógeno (B), con UV en presencia de peróxido de hidrógeno y hierro (C) y con UV en presencia de peróxido de hidrógeno y cobre (D) por 0, 1, 1,5, 3, 4 y 6 h.

CONCLUSIÓN GENERAL CAPÍTULO 2

La conclusión más general de este capítulo es que a nivel de estructura primaria los cambios oxidativos fueron distintos para cada una de las tres proteínas estudiadas. La proteína que más se carboniló fue β -lactoglobulina, la que más aumentó en cantidad de *N*-formilquinurena fue α -lactoalbúmina y la que más aumento registró en ditirosina en relación a la cantidad inicial fue β -caseína. Estas observaciones no coinciden con lo propuesto por otros autores que han medido carbonilos en aminoácidos individualmente [5] en lugar de los carbonilos totales por mg de proteína, que es lo que se determinó en este caso. Se concluye que es importante utilizar una técnica capaz de abarcar la totalidad de los aminoácidos carbonilados para cuantificar oxidación proteica, ya que la cuantificación de la formación de carbonilos en algunos aminoácidos específicos puede llevar a conclusiones engañosas, como ocurre con la *N*-formilquinurena, que aumentó más en α -lactoalbúmina. En β -lactoglobulina los carbonilos se formaron cuando los triptófanos fueron expuestos al medio acuoso después de la proteólisis. Este dato ayuda a explicar por qué la irradiación selectiva de β -lactoglobulina con luz UV a 295 nm, longitud de excitación del triptófano, durante 24 horas, sólo produjo parcial oxidación de los triptófanos [46].

Desde el punto de vista de la formación de ditirosinas nuestros resultados fueron similares a los hallados por otros investigadores en cuanto β -caseína fue la proteína que más enlaces de este tipo formó. Nosotros relacionamos esto a la gran proporción de tirosina que tiene esta proteína y a la estructura terciaria desordenada, como ha sido propuesto [8]. La formación de agregados de β -caseína expuesta a luz fluorescente en presencia de riboflavina y por tiempos prolongados ha sido descrita recientemente. En estos estudios se ha hipotetizado que la formación de agregados de β -caseína están relacionados con la pérdida de triptófano y el aumento de *N*-formilquinurena [47] o con la formación de uniones ditirosina [5], contrapuestamente. En el sistema de irradiación UV nuestros datos demuestran que la formación de ditirosinas está relacionada con el aumento de agregados, y no se observó relación entre la formación de carbonilos proteicos y la aparición de ditirosina o *N*-formilquinurena.

Los datos más novedosos que aportan las observaciones reportadas en este capítulo son la fragmentación elevada de las proteínas del suero y los cambios producidos en la estructura primaria por la irradiación UV, y por los tratamientos oxidantes con peróxido.

La otra conclusión importante desde lo funcional, es que hay condiciones de oxidación que favorecen cambios en estructura terciaria de las proteínas que culminan con la aparición de agregados o de geles que pueden tener utilidad industrial.

CAPÍTULO 3: ESTADO OXIDATIVO DE LAS PROTEÍNAS DE LECHE EN POLVO COMERCIALES (ENTERAS, DESCREMADAS Y FÓRMULAS). RELACIÓN CON LOS PARÁMETROS DE CALIDAD

LECHES EN POLVO COMERCIALES DEL MERCADO LOCAL

En los capítulos anteriores hemos comprobado que las proteínas de la leche sufren cambios oxidativos importantes, y que estos son más importantes cuando están aisladas que cuando están en su matriz natural. La leche en polvo se produce por un procedimiento complejo que requiere varios procesos unitarios, que utilizan el calentamiento (concentrado por evaporación y secado por atomización o esprayado). Hay varios tipos de formulación de leche en polvo: entera (LE), descremada (LD) y especiales para lactantes (LF) [48-49]. Para tratar de asimilar estas últimas a la leche materna, la preparación incluye el agregado de suero y la hidrólisis parcial de las proteínas [6]. Estas operaciones influyen en el estado oxidativo de las proteínas de las leches en polvo debido a la temperatura [50] y se han observado cambios en la hidrofobicidad y solubilidad de las proteínas [51].

La producción de leche en polvo en los últimos diez años siempre superó el 50% del total de productos lácteos [52]. En particular en Córdoba, datos extraoficiales pero confiables, señalan que cerca del 80 % del total de leche producida va a la elaboración de leche en polvo. Además en Porteña, Córdoba, está la planta de producción de proteínas de suero de Arla (Sociedad mixta de capitales suecos, daneses y SanCor) que es la segunda más grande en el mundo, la cual concentra los sueros de descarte de la producción quesera de la cuenca central. Estos sueros son empleados en la fabricación de fórmulas infantiles.

Teniendo en cuenta estas razones y nuestros hallazgos pareció importante evaluar la integridad y estado de oxidación de las leches en polvos comerciales disponibles en el mercado. También se estudió si el estado de oxidación proteica está relacionado con parámetros de calidad.

LECHES EN POLVO COMERCIALES LOCALES: COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PARÁMETROS DE CALIDAD

Las leches en polvo estudiadas se adquirieron en supermercados de la ciudad de Córdoba. A continuación se detalla en una Tabla (Tabla 1) la marca, tipo de leche en polvo y la numeración que se le dio para operar a ciego.

Numeración	Marca	Tipo	Grupo
1	La Serenisima Entera	Leche Entera	LE
2	La Serenisima Fe	Leche Entera	LE
3	Nido Entera	Leche Entera	LE
4	Nido Crecimiento	Fórmula Infantil	LF
5	Sancor Entera	Leche Entera	LE
6	Sancor Bebe	Fórmula Infantil	LF
7	Jumbo Entera	Leche Entera	LE
8	Purísima Entera	Leche Entera	LE
9	La Serenisima Descremada	Leche Descremada	LD
10	Nidina Infantil	Fórmula Infantil	LF
11	Nan 3	Fórmula Infantil	LF
12	Svelty	Leche Descremada	LD
13	Sancor Descremada	Leche Descremada	LD
14	Ser Descremada	Leche Descremada	LD
15	Vital 3	Fórmula Infantil	LF

Tabla 1. Marcas y tipos de leches comerciales analizadas. Las leches en polvo comerciales analizadas fueron agrupadas según fuesen: Leche entera (LE), leche descremada (LD) y fórmulas infantiles (LF).

La composición química y los parámetros de calidad de cada muestra de leche en polvo se detallan en la Tabla 2. Los mismos están de acuerdo por lo exigido por la normativa para leches en polvo y coincide con lo expresado en la rotulación.

LE	1	2	3	5	7	8	Promedio ± DS
Grasa (%)	23 ± 1	24 ± 1	25 ± 1	25 ± 1	25 ± 1	25 ± 1	25 ± 1
Proteína (%)	27 ± 1	29 ± 1	28 ± 1	25 ± 1	26 ± 1	27 ± 1	27 ± 1
Humedad (%)	2,7 ± 0,1	2,4 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,3 ± 0,1	2,9 ± 0,1	3,0 ± 0,4
Proteína de suero (%)	33 ± 2	34 ± 2	31 ± 2	33 ± 2	34 ± 2	35 ± 2	33,6 ± 0,5
Dispersabilidad (%)	89 ± 3	91 ± 3	90 ± 3	95 ± 4	85 ± 3	88 ± 4	90 ± 3
Color	17,1 ± 0,4	19 ± 1	18 ± 1	19 ± 1	19 ± 1	17 ± 1	18,2 ± 0,7
LD	9	12	13	14	Promedio ± DS		
Grasa (%)	1,00 ± 0,04	1,10 ± 0,04	1,00 ± 0,04	1,00 ± 0,04	1,1 ± 0,1		
Proteína (%)	37 ± 1	35 ± 1	33 ± 1	37 ± 1	35,8 ± 1,8		
Humedad (%)	3,7 ± 0,1	4,8 ± 0,2	3,3 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,8 ± 0,7		
Proteína de suero (%)	38,0 ± 2,7	36,3 ± 2,5	36,9 ± 2,6	36,7 ± 2,6	37,0 ± 0,7		
Dispersabilidad (%)	90 ± 4	84 ± 3	85 ± 3	90 ± 4	87 ± 3		
Color	17,6 ± 1,5	18,9 ± 0,5	17,9 ± 1,3	17,6 ± 0,5	18,0 ± 0,6		
LF	4	6	10	11	15	Promedio ± DS	
Grasa (%)	18,2 ± 0,7	22,1 ± 0,9	20,3 ± 0,8	17,8 ± 0,7	19,6 ± 0,8	19,6 ± 2,0	
Proteína (%)	21,3 ± 0,9	18,2 ± 0,7	19,3 ± 0,8	16,6 ± 0,7	14,3 ± 0,6	18,9 ± 2,0	
Humedad (%)	3,6 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,6 ± 0,7	
Proteína de suero (%)	42,7 ± 2,9	36,6 ± 2,6	37,8 ± 2,6	48,1 ± 3,4	53,4 ± 3,7	44 ± 4	
Dispersabilidad (%)	83 ± 3	74 ± 3	82 ± 3	83 ± 3	74 ± 3	80,7 ± 4,5	
Color	17,0 ± 1,0	17,8 ± 1,7	20,0 ± 0,8	16,3 ± 0,8	15,0 ± 1,2	17,8 ± 1,6	

Tabla 2. Composición y parámetros de calidad. Leche entera (LE), leche descremada (LD) y fórmulas infantiles (LF). La última columna muestra el promedio ± desviación estándar (DS). Cada determinación se realizó en cuadruplicado. Las diferencias significativas se obtuvieron utilizando un t-test para muestras apareadas.

Se utilizaron dos métodos diferentes para la cuantificación de la relación de proteínas del suero sobre proteínas totales, SDS-PAGE y la derivada cuarta del espectro de absorción de las muestras de proteínas de las leches. El valor encontrado, utilizando el método de la cuarta derivada, en leche entera fue $33,6 \pm 0,5$ % de proteína de suero del total de proteínas, en leche descremada el nivel fue significativamente mayor $37,0 \pm 0,7$ % (leche entera vs. leche descremada $p < 0,002$) y el de fórmulas infantiles fue aun mayor 44 ± 4 % (leche entera vs. fórmulas infantiles $p < 0,007$). Estos datos mostraron una buena correlación con los obtenidos por SDS-PAGE ($p < 0,002$, dato no mostrado) y son coherentes con el hecho de que las fórmulas infantiles contienen proteínas de suero agregadas en diferentes proporciones. La dispersabilidad fue significativamente menor para fórmulas infantiles que para leche entera y descremada ($80,7 \pm 4,5$; 90 ± 3 y 87 ± 3 LD, LF y LE respectivamente, $p < 0,0025$ fórmulas infantiles vs. leche entera y $p < 0,03$ fórmulas infantiles vs. leche descremada). No se observaron diferencias en el color.

LECHES EN POLVO COMERCIALES LOCALES: ESTADO OXIDATIVO DE LAS PROTEÍNAS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

En la Tabla 3 se muestran los parámetros relacionados con el estado oxidativo de las proteínas y la capacidad antioxidante de las muestras estudiadas. Se encontró diferencias significativas en el contenido de carbonilos proteicos para los tres tipos de leches en polvo; el nivel fue un poco menor en leche descremada que leche entera, mientras que el grupo de fórmulas infantiles tuvo más del doble que leche entera ($2,8 \pm 0,4$; $2,1 \pm 0,2$ and $6,5 \pm 1,3$ nmol/mg proteína para leche entera, leche descremada y fórmulas infantiles respectivamente, $p \leq 0,009$ leche descremada vs. leche entera y $p \leq 0,0001$ fórmulas infantiles vs. leche entera). No se observaron diferencias en los niveles de enlaces ditrosina entre los tres grupos de leche en polvo.

Para determinar la actividad antioxidante se utilizaron dos métodos convencionales: la determinación del contenido de polifenoles y la actividad secuestradora de radicales libres medida como inhibición del DPPH. La evaluación de los polifenoles mostró una gran variabilidad entre los niveles determinados para cada grupo pero hubo diferencias significativas (Tabla 3); leche descremada tuvo contenido más bajo de polifenoles que leche entera o fórmulas infantiles ($8,6 \pm 0,7$; $7,4 \pm 0,9$ y $9,9 \pm 1,5$ mg/L para leche entera, leche descremada e fórmulas infantiles respectivamente, leche descremada vs. leche entera $p \leq 0,04$, leche descremada vs. fórmulas infantiles $p \leq 0,03$). La capacidad secuestradora de radicales fue significativamente diferente para leche entera comparada con el blanco (87 ± 11 vs. 100 ± 5 %, $p \leq 0,04$), no se observó capacidad en el grupo de leche descremada ni en el de fórmulas infantiles, debido a la gran variabilidad de las muestras individuales. No se encontró correlación entre el contenido de polifenoles y la capacidad secuestradora de radicales en las leches en polvo reconstituidas. Este resultado si bien es inusual en la mayoría de los alimentos no es sorprendente para leche en polvo ya que la actividad secuestradora de radicales libres de la leche ha sido relacionada con el contenido total de lípidos, el nivel de polifenoles, caseínas y proteínas del suero [53-54]. La presencia de polifenoles en leche depende de la dieta y puede tener efectos bioactivos en la conservación de los componentes de la leche [55].

LE	1	2	3	5	7	8	Promedio ± DS
Carbonilos (nmol/mg proteína)	2,7 ± 0,2	3,5 ± 0,3	2,3 ± 0,2	2,7 ± 0,2	2,8 ± 0,2	3,0 ± 0,3	2,8 ± 0,4
Ditirosina (UAF/ mg proteína)	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1
Polifenoles (mg/L)	9 ± 1	8,1 ± 0,2	8,7 ± 0,3	9,8 ± 0,5	7,7 ± 0,3	8,8 ± 0,9	8,6 ± 0,7
% Inhibición de DPPH	82 ± 4	77 ± 3	73 ± 3	94 ± 9	97 ± 9	99 ± 3	87 ± 11
Agregados (%)	2,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,9 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,0 ± 0,4
Oligómeros (%)	2,0 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,7 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,4 ± 0,1	2 ± 1
LD	9	12	13	14	Promedio ± DS		
Carbonilos (nmol/mg proteína)	2,0 ± 0,1	2,3 ± 0,2	2,10 ± 0,2	1,8 ± 0,1	2,1 ± 0,2		
Ditirosina (UAF/ mg proteína)	1,0 ± 0,1	0,84 ± 0,08	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1		
Polifenoles (mg/L)	8,6 ± 0,5	7,1 ± 0,3	7,3 ± 0,6	6,6 ± 0,2	7,4 ± 0,9		
% Inhibición de DPPH	108 ± 3	104 ± 4	102 ± 4	114 ± 5	107 ± 5		
Agregados (%)	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,2 ± 0,1	1,9 ± 0,5		
Oligómeros (%)	1,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,6 ± 0,1	2,1 ± 0,1	1,7 ± 0,4		
LF	4	6	10	11	15	Promedio ± DS	
Carbonilos (nmol/mg proteína)	7,7 ± 0,4	6,2 ± 0,3	4,9 ± 0,4	7,3 ± 0,4	8,4 ± 0,3	6,5 ± 1,3	
Ditirosina (UAF/mg proteína)	1,4 ± 0,1	0,81 ± 0,06	0,88 ± 0,05	1,00 ± 0,09	1,11 ± 0,08	1,0 ± 0,3	
Polifenoles (mg/L)	10,5 ± 0,9	10,4 ± 1,0	7,9 ± 0,3	11,7 ± 1,3	8,8 ± 0,6	9,9 ± 1,5	
% Inhibición de DPPH	139 ± 9	58,3 ± 1,5	100 ± 8	158 ± 2	85 ± 3	19,6 ± 2,0	
Agregados (%)	3,7 ± 0,4	3,7 ± 0,4	4,1 ± 0,4	3,5 ± 0,4	6,2 ± 0,5	4,2 ± 1,1	
Oligómeros (%)	2,2 ± 0,1	2,0 ± 0,1	1,8 ± 0,1	2,4 ± 0,1	1,8 ± 0,1	2,0 ± 0,3	

Tabla 3. Estado oxidativo y capacidad antioxidante de las leches en polvo comerciales. Leche entera (LE), leche descremada (LD) y fórmulas infantiles (LF). La última columna muestra el promedio ± desviación estándar. Cada determinación se realizó en cuadruplicado. Las diferencias significativas se obtuvieron utilizando un t-test para muestras apareadas. UAF: unidades arbitrarias de fluorescencia.

Los valores de carbonilos reportados previamente para muestras de leches fluidas europeas [6] son más altos que los encontrados por nosotros, lo cual es una muestra de la buena calidad de las leches locales. El nivel de carbonilos de las leches en polvos se correlaciona positivamente con la severidad del tratamiento térmico durante el proceso productivo [4], por lo tanto sugerimos que los niveles más elevados de carbonilos proteicos en fórmulas infantiles podría ser indicativo de condiciones térmicas más fuertes para la elaboración de las fórmulas infantiles en comparación con las leche entera o leche descremada. Las diferencias en el nivel de grupos carbonilos sin diferencias en los de formación de ditirosina ha sido observada para otros productos lácteos, por ejemplo el queso Mozzarella producido a partir de leche de vaca o de búfalo [56].

El grado de polimerización proteica fue analizado por SDS-PAGE. El nivel de agregados y oligómeros fue evaluado en los tres grupos de leche en polvo. También se determinó la formación de oligómeros (peso molecular mayor a 80 kDa y menor que 175 kDa). El menor contenido de oligómeros fue observado en leche descremada ($1,7 \pm 0,4$ %), sin embargo no se hallaron diferencias significativas (Tabla 3). El porcentaje de agregados (proteínas que no

entran en el gel stacking) fue significativamente diferente entre todos los grupos de leches ($3,0 \pm 0,4$, $1,9 \pm 0,5$, $4,2 \pm 1,1$ % para leche entera, leche descremada y fórmulas infantiles respectivamente, $p \leq 0,05$) (Tabla 3).

RELACIONES ENTRE LA OXIDACIÓN PROTEICA Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE CON OTROS PARÁMETROS DE CALIDAD Y LA COMPOSICIÓN

Se realizaron múltiples análisis de correlación para determinar si los distintos parámetros estudiados, tanto de composición química como de calidad, estaban asociados. Se probaron todos los pares de variables posibles para ver si existía correlación entre ellos. Se encontró que cuatro de ellos estaban correlacionados: carbonilos, proteínas del suero (SP), agregados y dispersibilidad (Tabla 4).

Las mejores correlaciones fueron entre carbonilos versus proteínas del suero y para dispersibilidad versus proteínas del suero. Es interesante notar que estas correlaciones comprenden 15 muestras, por lo que se puede hipotetizar que el contenido de carbonilos proteicos y la dispersibilidad dependieron del contenido de proteínas de suero, independientemente del tipo de leche en polvo considerado.

Estos hallazgos están de acuerdo con otros reportes, ya que se conoce que las proteínas del suero de la leche son más susceptibles a modificaciones oxidativas que las caseínas, particularmente la β -lactoglobulina [57]. En consecuencia, era esperable que las muestras de leche en polvo con altas proporciones de proteína de suero tuvieran valores de carbonilos proteicos más elevados. La correlación directa entre el contenido de proteínas del suero y el contenido total de carbonilos ($p < 0,002$, Tabla 4), sugiere que las proteínas del suero contribuyen porcentualmente más al nivel de carbonilos totales que las caseínas. Esto explica porque las fórmulas infantiles tienen mayor nivel de carbonilos ya que el alto porcentaje de proteína del suero en fórmulas infantiles es superior al de leche entera y leche descremada (Tabla 4).

El nivel de agregados en las muestras correlacionó de forma negativa con la dispersibilidad ($p=0,016$). La velocidad de reconstitución de las leches en polvo depende de que ocurran tres pasos: la humectabilidad, la habilidad de hundirse, la dispersabilidad, y finalmente la solubilidad [58]. La presencia de proteínas desnaturalizadas disminuye la habilidad de humectación [59-60], por lo tanto el resultado de que las leches en polvo con alto contenido de carbonilos, agregados y proteínas de suero fueron más difíciles de dispersar podría indicar que hay mayor cantidad de proteína desnaturalizada.

También se encontró una correlación significativa para los carbonilos proteicos versus contenido de polifenoles (Tabla 4).

	a	b	p	r ²	n
Carbonilos proteicos vs. proteína de suero	2,1 ± 0,4	29 ± 2	0,0002	0,590	15
Carbonilos proteicos vs. agregados	0,4 ± 0,1	1,6 ± 0,4	0,002	0,733	15
Carbonilos proteicos vs. dispersabilidad	-1,9 ± 0,5	93 ± 2	0,002	-0,714	15
Carbonilos proteicos vs. polifenoles	0,4 ± 0,1	7,1 ± 0,5	0,003	0,708	15
Proteína de suero vs. agregados	3,0 ± 1,1	28 ± 4	0,020	-0,610	15
Proteína de suero vs. dispersabilidad	-0,6 ± 0,2	110 ± 8	0,0010	-0,640	15
Proteína de suero vs. color	-0,15 ± 0,04	23 ± 1	0,002	-0,740	15
Agregados vs. dispersabilidad	-3,1 ± 1,1	95 ± 4	0,016	-0,740	15

Tabla 4. Relaciones entre los parámetros de calidad y el estado oxidativo de las proteínas de la leche. a: pendiente, b: ordenada al origen, r²: Coeficiente de correlación.

Los compuestos polifenólicos tienen fuertes efectos antioxidantes “in vitro” en muchos sistemas, pero pueden actuar como pro-oxidantes en otros [61]. Es conocido que las catequinas del té contribuyen a la formación de carbonilos proteicos en albúmina sérica bovina (HSA) [62]. Nuestros resultados son los primeros que muestran una relación entre el contenido de polifenoles y el contenido de carbonilos de la leche sugiriendo que podría haber mecanismos similares a los que operan en el caso de HSA y polifenoles. Además no hay informes relacionados a la actividad secuestradora de radicales y el contenido de polifenoles en la leche, probablemente debido al hecho de que esta relación es nula como se ha enunciado arriba. En una investigación extensiva con plantas comestibles se encontró que sólo para algunas especies había relación entre el contenido de polifenoles y la actividad capturadora de radicales [63], los autores concluyeron que la correlación solo se encontró cuando los compuestos fenólicos son los mayores contribuyentes a la capacidad antioxidante. La leche contiene algunos factores antioxidantes: vitaminas (E y C), betacaroteno, sistemas enzimáticos, albúmina sérica y lactoferrina, la cual actúa como un agente quelante de hierro, así como aminoácidos, como la tirosina y cisteína [25], por lo tanto los polifenoles podrían no ser los principales contribuyentes a la capacidad antioxidante.

Finalmente la correlación negativa entre las proteínas de suero y el color podría deberse al alto contenido de productos tardíos de Maillard en leche en polvo con menor contenido de proteínas de suero [64].

EFFECTOS DEL ALMACENAMIENTO EN EL ESTADO OXIDATIVO DE LAS PROTEÍNAS, DISPERSABILIDAD Y COLOR

Todas las muestras de leche fueron analizadas luego de nueve meses de almacenamiento a -20 °C (CS) o a temperatura ambiente (WS) para evaluar los cambios en el estado oxidativo de las proteínas (carbonilos, ditirosina e integridad) y en los parámetros relacionados (dispersabilidad y color). La Figura 1 muestra los cambios observados.

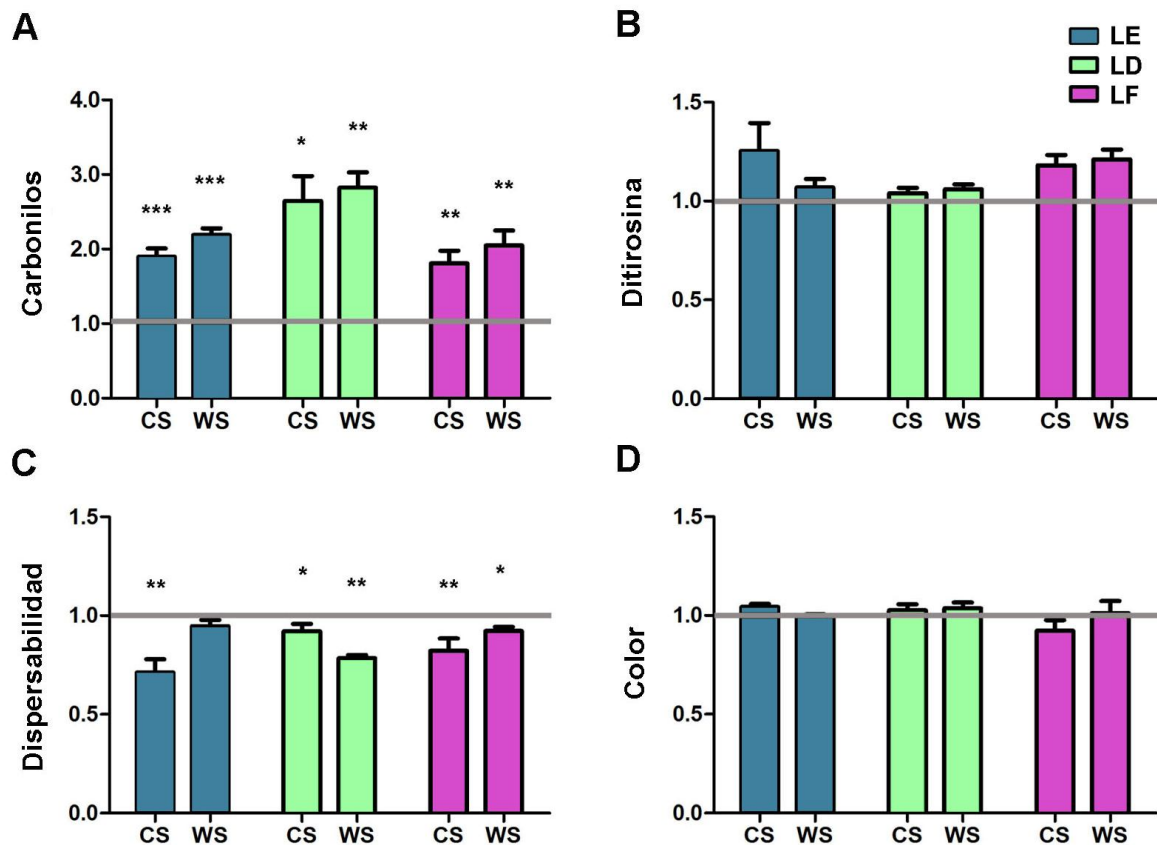


Figura 1. Efecto del almacenamiento sobre carbonilos proteicos, ditirosina, dispersabilidad y color. (A) carbonilos proteicos, (B) ditirosina, (C) dispersabilidad, (D) color. Las muestras se almacenaron por nueve meses a 24 °C (WS) o -20 °C (CS) en oscuridad. Los resultados se expresaron como relación del valor inicial al que se le dio el valor de 1 para cada grupo (línea horizontal). Leche entera: LE, barras verdes. Leche descremada: LD, barras azules. Fórmulas infantiles: LF, barras rojas. Se usó ANOVA para diferenciar entre grupos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Carbonilos proteicos fue uno de los parámetro más afectados ya que los valores fueron casi el doble del valor inicial (Figura 1, Panel A) en todas las muestras analizadas (leche entera y leche descremada $p \leq 0,05$ para CS y $p \leq 0,01$ para WS; fórmulas infantiles $p \leq 0,001$ para CS y WS). La formación de ditirosina no incrementó de forma significativa, independientemente de la condición, cuando se comparó en los distintos grupos de leche en polvo (Figura 14, Panel B). En contraste, cuando se realizó un análisis usando las quince muestras en forma apareada, antes y después del almacenamiento, se encontró que hubo diferencia significativa ($p = 0,0292$ y $p = 0,0186$ para CS y WS, respectivamente).

Las leches en polvo almacenadas tuvieron una menor dispersabilidad cuando fueron comparadas con las condiciones iniciales (leche entera y fórmulas infantiles $p \leq 0,01$ para CS; fórmulas infantiles $p < 0,05$ para WS; leche descremada $p < 0,05$ para CS, $p < 0,01$ para WS) (Figura 1, Panel C). La evaluación de las quince muestras apareados usando el t test de Student mostró que la reducción fue del 17% para CS y 9% para WS ($p = 0,0002$ y $p = 0,0007$, respectivamente).

No hubo cambios en el color cuando las muestras fueron analizadas como grupos por tipo de leches en polvo (Figura 1, Panel D), ni tampoco cuando fueron analizadas las quince muestras juntas por el t-test apareado.

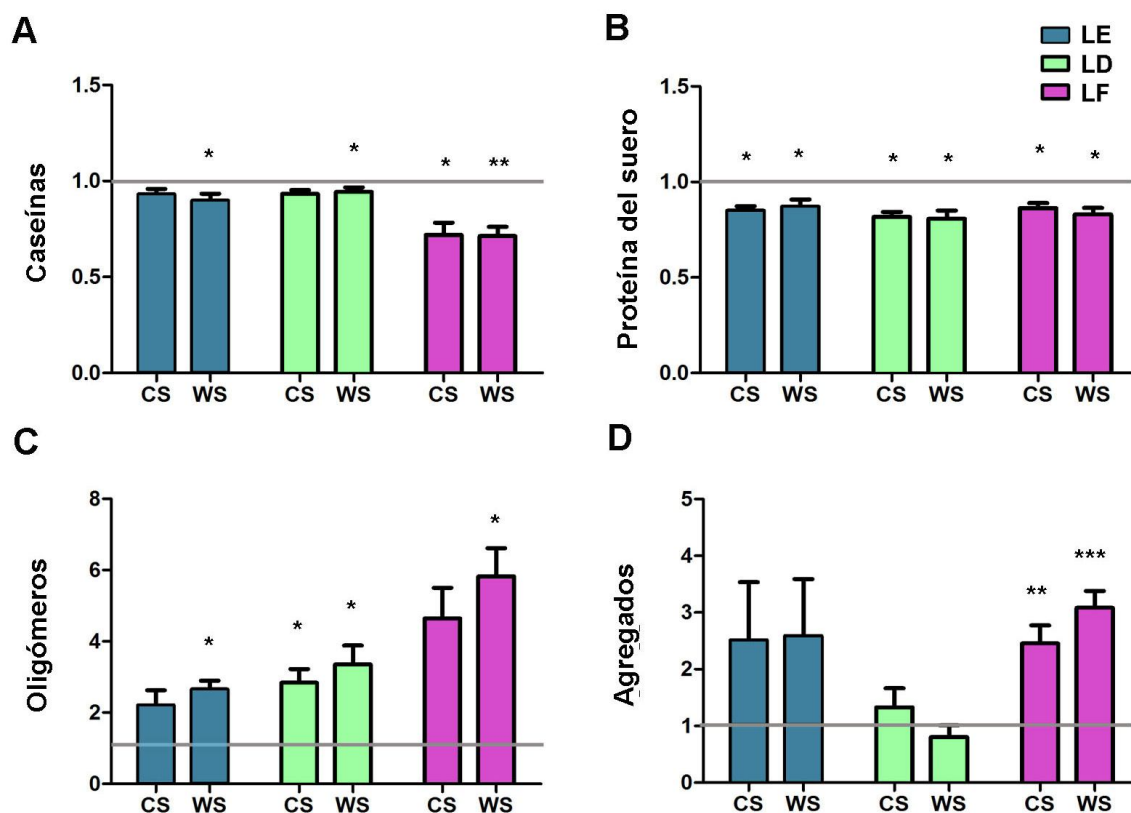


Figura 2. Efecto del almacenamiento sobre la integridad proteica. (A) caseína, (B) proteína de suero, (C) oligómeros y (D) agregados. Las muestras se almacenaron por nueve meses a 24 °C (WS) o -20 °C (CS) en oscuridad. Los resultados se expresaron como relación del valor inicial al que se le dio el valor de 1 para cada grupo (línea horizontal). Leche descremada: LD, barras azules. Fórmulas infantiles: LF, barras rojas. Se usó ANOVA para diferenciar entre grupos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Cuando las caseínas fueron analizadas en grupos de tipos de leche por SDS-PAGE, sólo se observó disminución para el grupo de fórmulas infantiles luego del almacenamiento ($p = 0,0192$ y $p = 0,0072$ para CS y WS, respectivamente) (Figura 2, Panel A). Cuando se realizó el test a todas las quince muestras juntas se encontró una disminución significativa (media de las diferencias aproximadamente 13 %, $p = 0,002$ para CS y $p = 0,0008$ para WS).

Las proteínas del suero disminuyeron para los tres grupos de leches en polvo ($p < 0,05$) luego de CS o de WS (Figura 2, Panel B). El t test de Student pareado mostró la reducción de todas las muestras agrupadas (media de las diferencias 15,5 y 16,8, para CS y WS respectivamente $p < 0,0001$).

Se encontró un aumento significativo en la formación de oligómeros luego de CS sólo para leche descremada ($p < 0,05$). Todas las muestras almacenadas a temperatura ambiente mostraron mayor nivel de oligómeros ($p < 0,05$). La comparación de toda la población aplicando el test de Student demostró que el aumento fue de 211 % luego de CS y de 282 % después de WS ($p = 0,0023$ y $0,0009$, respectivamente).

La formación de agregados aumentó significativamente solo para fórmulas infantiles luego del CS y WS ($p < 0,05$) (Figura 2, Panel D). Cuando todas las muestras de leche en polvo fueron analizadas juntas se encontró un aumento significativo (133 % y 167 % media para CS o WS comparado con IC, respectivamente; $p < 0,05$).

Para analizar si los valores iniciales influyen en el proceso de deterioro se realizó un análisis de la correlación. Se observó que el único parámetro inicial que tuvo una correlación significativa con los valores después del almacenamiento fue carbonilos proteicos ($p < 0,0001$).

Luego de nueve meses de almacenamiento todos los parámetros analizados cambiaron, indicando que la calidad de la leche en polvo disminuyó irrespectivamente del tipo de leche en polvo y condición de almacenaje.

CONCLUSIÓN GENERAL CAPÍTULO 3

La conclusión más importante es que hay cuatro parámetros relacionados a las proteínas de la leche en polvo y su integridad que están fuertemente asociados: cantidad relativa de proteína de suero, niveles de carbonilos proteicos, agregados y dispersabilidad. Esta observación es muy novedosa ya que relaciona el estado oxidativo, determinado colorimétricamente como cantidad de carbonilos proteicos, con un parámetro de calidad importante: la dispersabilidad.

Luego de nueve meses de almacenamiento las diferencias en carbonilos proteicos fueron los cambios más significativos observados y los únicos que mostraron que el nivel inicial influyó en el aumento luego del almacenaje.

Se concluye que el nivel de carbonilos proteicos es una determinación de rutina que debería utilizarse de rutina cuando se evalúa la calidad de leches en polvo.

REFERENCIAS

1. Forcato D.O., Carmine M.P., Echeverria G.E., Pecora R.P. y Kivatinitz S.C. *Milk fat content measurement by a simple UV spectrophotometric method: an alternative screening method*. J Dairy Sci, 2005. **88**(2): p. 478-81.
2. Fennema O.R. *Química de los Alimentos*. 2nd edition ed. 2000, Wisconsin-Madison.
3. Frankel E.N. *Recent advances in lipid oxidation*. J Sci Food Agric., 1991. **54**: p. 495-511.
4. Scaloni A., Perillo V., Franco P., Fedele E., Froio R., Ferrara L. y Bergamo P. *Characterization of heat-induced lactosylation products in caseins by immunoenzymatic and mass spectrometric methodologies*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics, 2002. **1598**(1-2): p. 30-39.
5. Dalsgaard T.K., Otzen D., Nielsen J.H. y Larsen L.B. *Changes in structures of milk proteins upon photo-oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(26): p. 10968-10976.
6. Fenaille F., Parisod V., Visani P., Populaire S., Tabet J.-C. y Guy P.A. *Modifications of milk constituents during processing: A preliminary benchmarking study*. International Dairy Journal, 2006. **16**(7): p. 728-739.
7. Karagul-Yuceer Y., Drake M.A. y Cadwallader K.R. *Evaluation of the character impact odorants in skim milk powder by sensory studies on model mixtures*. Journal of Sensory Studies, 2004. **19**(1): p. 1-13.
8. Dalsgaard T.K., Nielsen J.H., Brown B.E., Stadler N. y Davies M.J. *Dityrosine, 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), and radical formation from tyrosine residues on milk proteins with globular and flexible structures as a result of riboflavin-mediated photo-oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(14): p. 7939-7947.
9. Artola R.L., Conde C.B., Bagatolli L., Pecora R.P., D.Fidelio G. y Kivatinitz S.C. *High density lipoprotein from hypercholesterolemic animals has peroxidized lipids and oligomeric apolipoprotein A-I*. Biochem. Biophys. Res. Commun, 1997. **239**: p. 570-574.
10. Davies M.J. *Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **305**(3): p. 761-770.
11. Pesic M.B., Barac M.B., Stanojevic S.P., Ristic N.M., Macej O.D. y Vrvic M.M. *Heat induced casein-whey protein interactions at natural pH of milk: A comparison between caprine and bovine milk*. Small Ruminant Research, 2012. **108**(1-3): p. 77-86.
12. Jovanovic S., Barac M., Macej O., Vucic T. y Lacnjevac C. *SDS-PAGE analysis of soluble proteins in reconstituted milk exposed to different heat treatments*. Sensors, 2007. **7**(3): p. 371-383.
13. Mazzocchi F. *Complexity in biology. Exceeding the limits of reductionism and determinism using complexity theory*. EMBO, 2008. **9**: p. 10-14.
14. Lara-Villoslada F., Olivares M. y Xaus J. *The Balance Between Caseins and Whey Proteins in Cow's Milk Determines its Allergenicity*. J. Dairy Sci., 2005. **88**(5): p. 1654-1660.
15. Carbonaro M., Bonomi F., Iametti S., Cappelloni M. y Carnovale E. *Aggregation of Proteins in Whey from Raw and Heat-Processed Milk: Formation of Soluble Macroaggregates and Nutritional Consequences*. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 1998. **31**(6): p. 522-529.
16. Carbonaro M., Cappelloni M., Sabbadini S. y Carnovale E. *Disulfide Reactivity and In Vitro Protein Digestibility of Different Thermal-Treated Milk Samples and Whey Proteins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(1): p. 95-100.
17. Dunn B.M. *Overview of pepsin-like aspartic peptidases*, in *Curr Protoc Protein Sci* 2001.
18. Bannon G., Fu T.-J., Kimber I. y Hinton D.M. *Protein digestibility and relevance to allergenicity*. Environ Health Perspect, 2003. **111**(8): p. 1122-1124.
19. Umetsu H. y Van Chuyen N. *Digestibility and peptide patterns of modified lysozyme after hydrolyzing by protease*. J Nutr Sci Vitaminol, 1998. **44**(2): p. 291-300.
20. Cook B.B., Fraenkel-Conrat J., Singer B. y Morgan A.F. *The effect of heat treatment on the nutritive value of milk proteins*. Journal of Nutrition, 1951. **44**: p. 217-235.
21. Dergal S.B. *Leche*, in *Química de los alimentos*, S.A. A.M., Editor. 1981, AVI Publishing Company: Naulcalpan de Juarez. p. 648.
22. Fox P.F. y McSweeney P.L.H. eds. *Advanced Dairy Chemistry. Proteins*. 3rd ed., ed. De Kruif CG H.C. 2003, Kluwer Academic/Plenum: New York. 233-76.
23. Bradford M.M. *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**: p. 248-254.
24. Dalsgaard T.K., Heegaard C.W. y Larsen L.B. *Plasmin digestion of photooxidized milk proteins*. Journal of Dairy Science, 2008. **91**(6): p. 2175-2183.
25. Pihlanto A. *Antioxidative peptides derived from milk proteins*. International Dairy Journal, 2006. **16**(11): p. 1306-1314.

26. Clausen M.R., Skibsted L.H. y Stagsted J. *Characterization of Major Radical Scavenger Species in Bovine Milk through Size Exclusion Chromatography and Functional Assays*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(7): p. 2912-2919.
27. Havemose M.S., Weisbjerg M.R., Bredie W.L.P., Poulsen H.D. y Nielsen J.H. *Oxidative Stability of Milk Influenced by Fatty Acids, Antioxidants, and Copper Derived from Feed*. J. Dairy Sci., 2006. **89**(6): p. 1970-1980.
28. Kivatinitz S.C. *Relationship between protein oxidation markers and oxidative stress biomarkers*, in *Inflammatory Diseases - Immunopathology, Clinical and Pharmacological Bases*. 2012, Intech. p. 279-298.
29. Holt C. y Sawyer L. *Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of primary and secondary structures of the α S1-, β - and κ -caseins*. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, 1993. **89**(15): p. 2683-2692.
30. Kelkar D., Chaudhuri A., Haldar S. y Chattopadhyay A. *Exploring tryptophan dynamics in acid-induced molten globule state of bovine α -lactalbumin: a wavelength-selective fluorescence approach*. European Biophysics Journal, 2010. **39**(10): p. 1453-1463.
31. Stănciuc N., Râpeanu G., Bahrim G. y Aprodu I. *pH and heat-induced structural changes of bovine apo- α -lactalbumin*. Food Chemistry, 2012. **131**(3): p. 956-963.
32. Chang Y. y Park C. *Mapping transient partial unfolding by protein engineering and native-state proteolysis*. J. Mol. Biol., 2009. **393**: p. 543-556.
33. Matthyssens G.E., Simons G. y Kanarek L. *Study of the Thermal-Denaturation Mechanism of Hen Egg-White Lysozyme through Proteolytic Degradation*. European Journal of Biochemistry, 1972. **26**(4): p. 449-454.
34. Kroll J., uuml, rgen, Rawel H.M. y Rohn S. *Reactions of plant phenolics with food proteins and enzymes under special consideration of covalent bonds*. Food Science and Technology Research, 2003. **9**(3): p. 205-218.
35. Rawel H.M., Kroll J. y Hohl U.C. *Model studies on reactions of plant phenols with whey proteins*. Food / Nahrung, 2001. **45**(2): p. 72-81.
36. Hasni I., Bourassa P., Hamdani S., Samson G., Carpentier R. y Tajmir-Riahi H.-A. *Interaction of milk α - and β -caseins with tea polyphenols*. Food Chemistry, 2011. **126**(2): p. 630-639.
37. Huang D., Ou B. y Prior R.L. *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(6): p. 1841-1856.
38. van Aardt M., Duncan S.E., Marcy J.E., Long T.E., O'Keefe S.F. y Nielsen-Sims S.R. *Aroma analysis of light-exposed milk stored with and without natural and synthetic antioxidants*. Journal of dairy science, 2005. **88**(3): p. 881-890.
39. MacGregor H.J., Kato Y., Marshall L.J., Nevell T.G. y Shute J.K. *A copper-hydrogen peroxide redox system induces dityrosine cross-links and chemokine oligomerisation*. Cytokine, 2011(56): p. 669-75.
40. Atwood C.S., Perry G., Zeng H., Kato Y., Jones W.D., Ling K.-Q., Huang X., Moir R.D., Wang D., Sayre L.M., Smith M.A., Chen S.G., y Bush A.I. *Copper mediates dityrosine cross-linking of Alzheimer's amyloid- β* . Biochemistry, 2003. **43**(2): p. 560-568.
41. Altic L.C., Rowe M.T. y Grant I.R. *UV light inactivation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk as assessed by FASTPlaqueTB phage assay and culture*. Appl Environ Microbiol., 2007. **73**(11): p. 3728-33.
42. Skinner A.M. y Turker M.S. *Oxidative mutagenesis, mismatch repair, and aging*. Sci. Aging Knowl. Environ., 2005. **2005**(9).
43. Hettiarachchi C.A., Melton L.D., Gerrard J.A. y Loveday S.M. *Formation of β -lactoglobulin nanofibrils by microwave heating gives a peptide composition different from conventional heating*. Biomacromolecules, 2012. **13**(9): p. 2868-2880.
44. Bolisetty S., Adamcik J. y Mezzenga R. *Snapshots of fibrillation and aggregation kinetics in multistranded amyloid β -lactoglobulin fibrils*. Soft Matter, 2011. **7**(2): p. 493-499.
45. Sugiarto M., Ye A., Taylor M.W. y Singh H. *Milk protein-iron complexes: Inhibition of lipid oxidation in an emulsion*. Dairy Sci. Technol., 2010. **90**(1): p. 87-98.
46. Kehoe J.J., Remondetto G.E., Subirade M., Morris E.R. y Brodkorb A. *Tryptophan-mediated denaturation of β -lactoglobulin A by UV irradiation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(12): p. 4720-4725.
47. Kerkaert B., Mestdagh F., Cucu T., Shrestha K., Camp J. y Meulenaer B. *The impact of photo-induced molecular changes of dairy proteins on their ACE-inhibitory peptides and activity*. Amino Acids, 2012. **43**(2): p. 951-962.
48. Birchal V.S., Passos M.L., Wildhagen G.R.S. y Mujumdar A.S. *The influence of spray dryer operation variables on milk powder quality*. Drying 2004 – Proceedings of the 14th International Drying Symposium, 2004. **A**: p. 389-396.

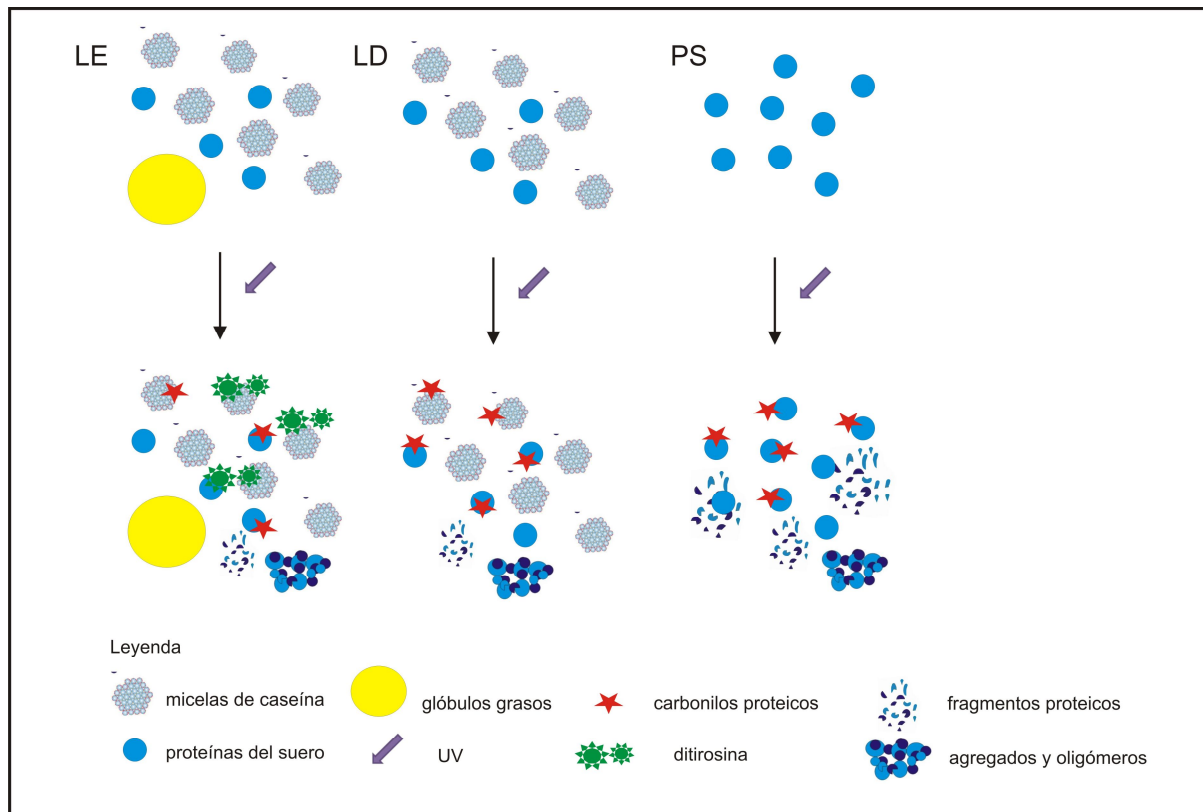
49. Schuck P. *Dehydrated Dairy Products. Milk Powder: Types and Manufacture*, in *Encyclopedia of Dairy Sciences*, John W.F., Editor. 2011, Academic Press: San Diego. p. 108-116.
50. Stapelfeldt H., Nielsen B.R. y Skibsted L.H. *Effect of heat treatment, water activity and storage temperature on the oxidative stability of whole milk powder*. *International Dairy Journal*, 1997. **7**(5): p. 331-339.
51. Kalapathy U., Hettiarachchy N. y Rhee K. *Effect of drying methods on molecular properties and functionalities of disulfide bond-cleaved soy proteins*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1997. **74**(3): p. 195-199.
52. Schaller A. *Lácteos*. Alimentos argentinos, 2010. **48**: p. 1-3.
53. Zivkovic J.V., Sunaric S.M., Trutic N.V., Pavlovic R.M., Kocic G.M., Nikolic G.S. y Jovanovic T.V. *DPPH radical-scavenging activity of pasteurized cow milk*. *Mleko i mlečni proizvodi*, 2009. **20**(1-2): p. 45-47.
54. Zulueta A., Maurizi A., Frígola A., Esteve M.J., Coli R. y Burini G. *Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk*. *International Dairy Journal*, 2009. **19**(6-7): p. 380-385.
55. Besle J.M., Viala D., Martin B., Pradel P., Meunier B., Berdagué J.L., Fraisse D., Lamaison J.L. y Coulon J.B. *Ultraviolet-absorbing compounds in milk are related to forage polyphenols*. *Journal of Dairy Science*, 2010. **93**(7): p. 2846-2856.
56. Balestrieri M., Spagnuolo M.S., Cigliano L., Storti G., Ferrara L., Abrescia P. y Fedele E. *Evaluation of oxidative damage in mozzarella cheese produced from bovine or water buffalo milk*. *Food Chemistry*, 2002. **77**(3): p. 293-299.
57. Singh H. y Creamer L.K. *Denaturation, aggregation and heat stability of milk protein during the manufacture of skim milk powder*. *Journal of Dairy Research*, 1991. **58**(03): p. 269-283.
58. Murrieta-Pazos I., Gaiani C., Galet L., Cuq B., Desobry S. y Scher J. *Comparative study of particle structure evolution during water sorption: Skim and whole milk powders*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011. **87**(1): p. 1-10.
59. Millqvist-Fureby A., Elofsson U. y Bergenståhl B. *Surface composition of spray-dried milk protein-stabilised emulsions in relation to pre-heat treatment of proteins*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2001. **21**(1-3): p. 47-58.
60. Sliwinski E.L., Lavrijsen B.W.M., Vollenbroek J.M., van der Stege H.J., van Boekel M.A.J.S. y Wouters J.T.M. *Effects of spray drying on physicochemical properties of milk protein-stabilised emulsions*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2003. **31**(1-4): p. 219-229.
61. Halliwell B. *Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health?* *Cardiovascular Research*, 2007. **73**(2): p. 341-347.
62. Takeshi I., Taiki M., Tatsuya I., Maiko K., Koji K., Yoshinori U., Mitsugu A., Yoshiyuki A., Takumi F., Toshiyuki W., Toshiyuki K., y Tsutomu N. *Structural characteristics of green tea catechins for formation of protein carbonyl in human serum albumin*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2010. **18**: p. 4892-4896.
63. Wojdyło A., Oszmiański J. y Czemerys R. *Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs*. *Food Chemistry*, 2007. **105**(3): p. 940-949.
64. Thomsen M.K., Lauridsen L., Skibsted L.H. y Risbo J. *Two Types of Radicals in Whole Milk Powder. Effect of Lactose Crystallization, Lipid Oxidation, and Browning Reactions*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. **53**(5): p. 1805-1811.

CONCLUSIÓN

CONCLUSIÓN

Los procesos fotooxidativos de las proteínas de la leche dependen de la matriz en que estas se encuentran (Capítulo 1) y de la estructura de las proteínas nativas (Capítulo 2). Las proteínas cuya estructura terciaria globular compacta y está en una matriz más compleja son más resistentes a la fotooxidación. Estas observaciones explican porque la oxidación de las proteínas de la leche está fuertemente relacionada con la calidad de los distintos tipos de leches comerciales (Capítulo 3).

CAPÍTULO 1



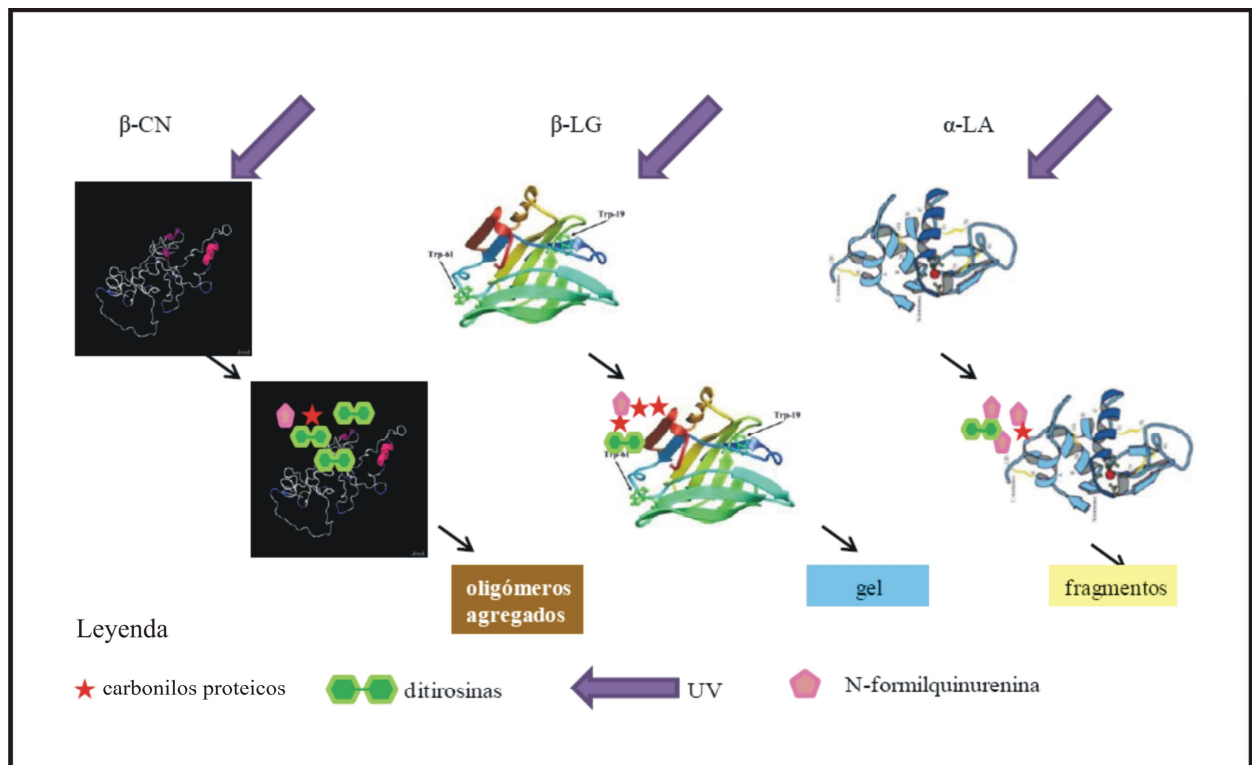
Esquema capítulo 1. Modificaciones oxidativas en leche entera y descremada y en lactosuero luego de ser irradiados por UV. LE: leche entera. LD: leche descremada. PS: lactosuero.

En este esquema del capítulo 1 se puede observar cómo las proteínas de la leche, al ser irradiadas por UV, se carbonilan en mayor medida cuando la matriz se vuelve menos compleja. Se observa como la irradiación UV produce mayor formación de ditirosina en leche entera que en descremada, la formación de agregados y oligómeros, fragmentación y el aumento de la proporción relativa de proteínas del suero. También se muestra que en las proteínas del suero hay mayor fragmentación proteica que en leche entera y descremada.

CAPÍTULO 2

Este esquema muestra los cambios oxidativos en la estructura primaria son distintos para cada una de las tres proteínas estudiadas (β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, y β -caseína). La proteína

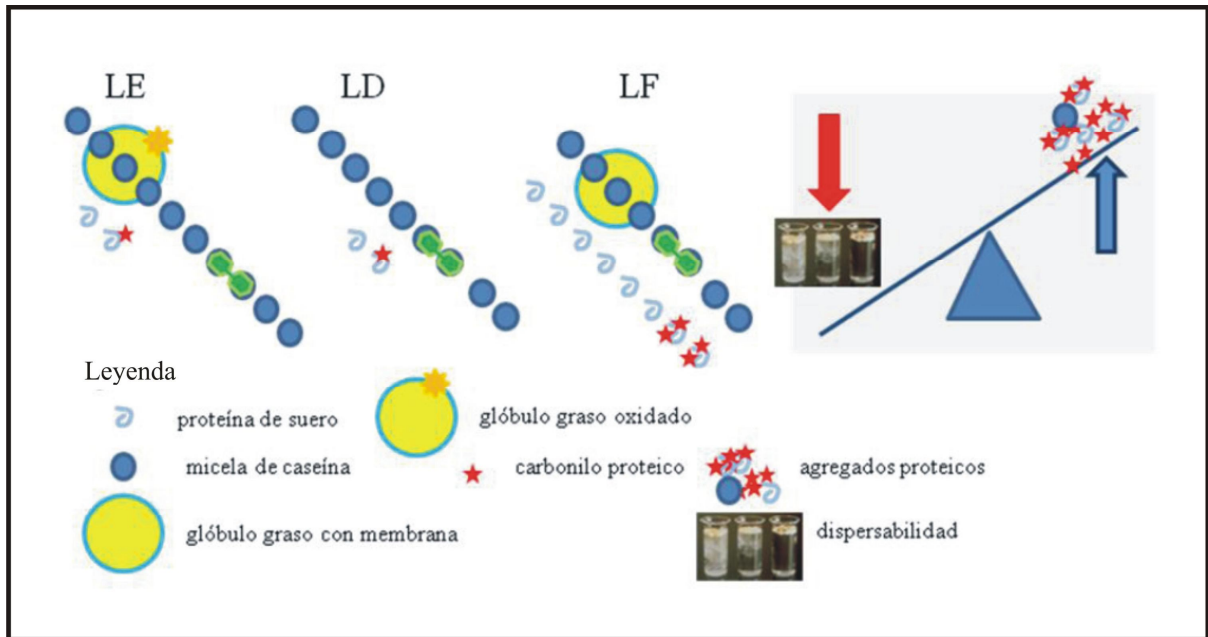
que más se carbonila por irradiación UV es β -lactoglobulina, la que más aumenta en *N*-formilquinurena es α -lactoalbúmina y la que más ditirosina forma en relación a la cantidad inicial es β -caseína (por la gran proporción de tirosina que tiene esta y su estructura terciaria reomórfica). La formación de ditirosinas está relacionada con el aumento de agregados, y no posee relación con la formación de carbonilos proteicos ó *N*-formilquinurena, en las proteínas irradiadas por UV. Bajo ciertas condiciones de oxidación con irradiación UV y peróxido de hidrógeno en presencia o ausencia de hierro o cobre, se favorecen cambios en estructura terciaria de las proteínas que culminan con la aparición de agregados o de geles que pueden tener utilidad industrial. Estos geles no se caracterizan por ser fibrillas de amiloide.



Esquema Capítulo 2. Cambios en la estructura primaria y terciaria de las proteínas de leche aisladas, β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, y β -caseína, por irradiación con luz UV.

CAPITULO 3

En este esquema se muestra que los distintos tipos de leche (entera, descremada y fórmulas infantiles), al poseer matrices químicas diferentes tienen diferencias en el estado oxidativo de sus proteínas. La cantidad relativa de proteína de suero está relacionada de forma positiva con la formación de carbonilos proteicos y de agregados, y de forma negativa con la dispersabilidad.



Esquema capítulo 3. Estado oxidativo de las proteínas de leches en polvo (enteras, descremadas y fórmulas lácteas) en relación con los parámetros de calidad. Se relaciona la formación de grupos carbonilos proteicos y la formación de agregados con la dispersabilidad de los distintos tipos de leche. LE: leche entera. LD: leche descremada. LF: fórmula láctea.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Reactivos y solventes: 2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNPH), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y pepsina porcina (P6887, actividad: 3,260 unidades/mg proteína) fueron compradas en Sigma (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Etanol A.C.S (Cicarelli). N-N'-Metilen-bis-acrilamida y acrilamida de Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Hidrocloruro de guanidina (ultrapuro) de Genbiotech (Buenos Aires, Argentina). Acido tricloroacético (TCA), ácido acético glacial, ácido gálico, acetato de etilo, peróxido de hidrógeno y ácido clorhídrico fueron comprados en Cicarelli (Buenos Aires), Argentina). Thioflavina T3516 (SIGMA-ALDRICH). Azul de bromofenol (Anedra), Azul brillante de Coomassie R250 (Anedra), agarosa (Anedra), agar (Anedra), BHT (Alkemer), ácido gálico monohidrato (Carlo Erba). Fosfato de sodio dibásico, anhidro (Baker). Reactivo de Bradbord (Tetrahedron). Suero de leche en polvo (Todo Droga). Sulfato de cobre (Anedra). Sulfato de hierro (Anedra).

Leches: Muestras de leche comerciales procesadas por secado por spray entera, descremada y fórmulas (SanCor, Sunchales, Argentina). La leche entera fue reconstituida al 13%, como se indica en la etiqueta.

Proteínas aisladas de leche: β -lactoglobulina bovina L0130, α -lactalbúmina bovina Tipo III sin calcio L6010 y β -caseína bovina C6905, compradas en SIGMA.

Leches comerciales utilizadas en el capítulo 3: Se utilizaron 15 leches en polvo comerciales (6 leches enteras (LE), 4 leches descremadas (LD) y 5 fórmulas infantiles (LF), compradas en SanCor Cooperativas Unidas Limitada (Sunchales, Argentina), La Serenísima Mastellone Hermanos S.A. (General Rodríguez, Argentina), Nestlé Argentina S.A. (Villa Nueva, Argentina), y La Sibila (Nogoyá, Argentina).

METODOS

Diseño experimental Capítulo 1

Leche Descremada (LD): en los experimentos con leche entera y descremada del capítulo 1 se obtuvo leche descremada a partir de la leche entera, por medio de la extracción fría de su materia grasa. Se reconstituyó leche en polvo entera (13 g%), se centrifugó a 7500 \times g por 15 min a 4 °C (centrifuga 5804 R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) y luego se filtró a través de lana de vidrio o algodón.

La leche en polvo entera fue reconstituida con agua destilada (13 g%). Muestras de 5 mL de leche entera y descremada, fueron colocadas en placas de Petri de 6-cm de diámetro y expuestas a luz FL, UV o FL y UV simultáneamente, dentro de una cámara (30 cm alto, 50 cm largo, y 20 cm ancho) de 0 a 24 h a 4 °C. Simultáneamente, las muestras control fueron expuestas a las mismas condiciones pero protegidas de la luz con papel de aluminio para

evitar la exposición a la luz. Se irradió con la lámpara UV una tanda de muestras, luego con la lámpara fluorescente, y posteriormente con ambas lámparas juntas.

Sistema de irradiación: La lámpara fluorescente utilizada fue Alic Daylight (15 W/F15T8, 230 V; Alic, Hefei, China), con una intensidad de 2,090 a 2,100 lx, y la lámpara UV fue un tubo Hg UV-C TUV Philips (15 W/G15T8; Philips, Eindhoven, Holland), con una intensidad de $2,34 \times 10^{19}$ quanta/s realizado por actinometría de ferrioxalato. El dispositivo de irradiación se muestra en la Figura 1.

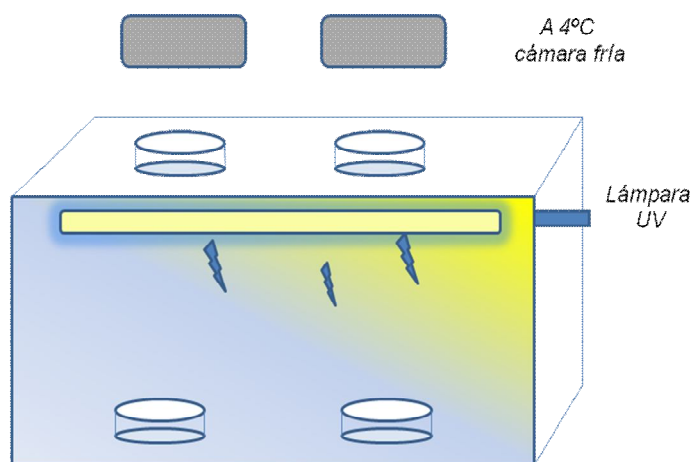


Figura 1. Dispositivo para irradiación por luz UV, fluorescente, o ambas luces juntas. Además de la lámpara UV señalada en el esquema hay una lámpara fluorescente al lado de la de UV-C.

Diseño experimental para experimento de “Inmunoreactividad de proteínas del suero de leche sometido a irradiación UV y a tratamiento térmico”:

Se obtuvo lactosuero deslipidizado por centrifugación en frío de leche entera y coagulación con quimosina. El lactosuero así obtenido fue sometido a distintos tratamientos oxidantes: 1) irradiación UV intermitente por recirculación por bombeo de la muestra dentro de un tubo de cuarzo que contiene en su interior una lámpara UV-C (los tiempos de exposición total a la irradiación fueron 0,6; 1; 1,4; 2,2 y 9,7 minutos) (Figura 2), 2) irradiación UV sin recirculación durante 24 horas, y 3) tratamiento térmico (80 °C, 15 min) (Figura 3).

La inmunoreactividad se determinó por inmunodifusión radial simple utilizando anticuerpos policlonales de conejo anti α -Lactalbúmina (α -La) y anti β -lactoglobulina (β -Lg) policlonales obtenidos en el laboratorio de la Profesora María Dolores Pérez Cabrejas donde realicé una estada de investigación en España en el Área de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza (8 de noviembre a 10 de diciembre de 2008).

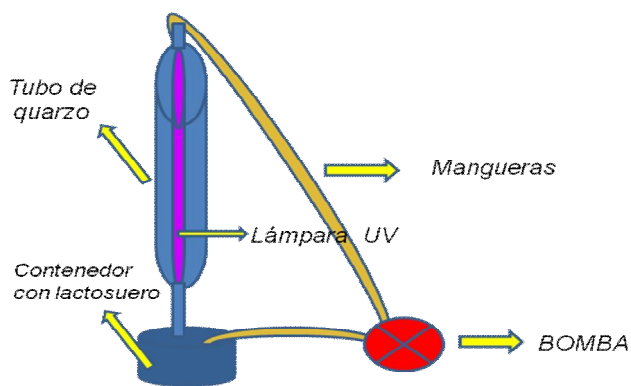


Figura 2. Dispositivo de irradiación por bombeo de la muestra y recirculación dentro de un tubo de cuarzo.

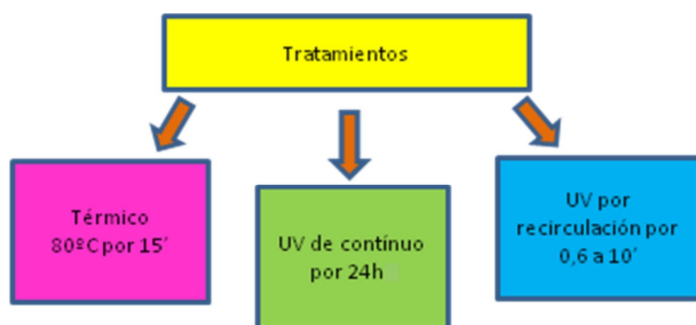


Figura 3. Tratamientos empleados en el suero de leche.

Diseño experimental Capítulo 2. Proteínas aisladas de leche.

Se preparó una solución 2 mg/mL de β -lactoglobulina, α -lactalbúmina y β -caseína en agua miliQ. Se colocó 1 mL de muestra en cubas de cuarzo. Se irradiaron por distintos periodos de tiempo con luz UV o fluorescente. Luego se realizó el experimento en presencia de peróxido de hidrógeno y de metales (hierro y cobre). Se preparó en el momento a utilizar una solución de peróxido de hidrógeno 5%, una de FeSO_4 0,2% y otra de CuSO_4 0,1%. Se colocó 1 mL de muestra de β -LG, β -CN, ó α -LA 2 mg/mL en cubas de 1 mL de cuarzo, y se agregó 20 μL de peróxido de hidrógeno 5 % a la muestra **UV- H_2O_2** , 20 μL peróxido de hidrógeno 5 % y 20 μL FeSO_4 0,2% a la muestra **UV- H_2O_2 Fe**, y 20 μL peróxido de hidrógeno 5%, 20 μL FeSO_4 0,2% y 20 μL CuSO_4 0,1% a la muestra **UV- H_2O_2 Cu**. Luego fueron irradiadas por un periodo de tiempo de 0 a 24 h. Al sacar las muestras del dispositivo de irradiación se paró la reacción con 5 μL EDTA 0,5 M.

Del volumen de muestra irradiado por triplicado se tomaron 150 μL de muestra y se diluyeron en 450 μL de hidrocloreuro de guanidina 6M pH 7 para luego determinar fluorescencia de ditirosina, triptofano y *N*-formilquinurenina. Se tomaron 30 μL de muestra, se diluyeron a la mitad y se agregaron 20 μL de solución tampón (0,02% azul de bromofenol, 10% glicerol, 50 mM Tris pH 6,8 y 2% SDS) para realizar un SDS-PAGE. Se tomaron 500 μL para la determinación de carbonilos proteicos y 125 μL para el estudio de la capacidad

antioxidante. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado y los experimentos por duplicado.

En un segundo experimento se utilizó una concentración de 5 mg/mL de β -LG para determinar la presencia de fibrillas de amiloide o la formación de geles por irradiación con luz UV sola y UV en presencia de peróxido de hidrógeno y metales.

Diseño experimental Capítulo 3: Estudio del estado oxidativo de las proteínas de leches en polvo comerciales.

Las leches en polvo estudiadas se adquirieron en supermercados de la ciudad de Córdoba. Se utilizaron las leches: La Serenisima Entera, La Serenisima con hierro, Nido Entera, Nido Crecimiento, Sancor Entera, Sancor Bebe, Jumbo Entera, Purisima Entera, La Serenisima Descremada, Nidina Infantil, Nan 3, Svelty, Sancor Descremada, Ser Descremada y Vital 3.

Estas leches fueron utilizadas para evaluar el estado oxidativo de las proteínas en los distintos tipos de leche y su relación con los parámetros de calidad utilizados normalmente en la industria láctea. Se evaluó dispersabilidad, color, capacidad antioxidante (inhibición de DPPH y cantidad de polifenoles), perfil de proteínas por SDS-PAGE (formación de oligómeros y agregados, cantidad de caseínas y proteínas del suero), y el estado oxidativo proteico (carbonilos proteicos y ditirosina). Se estudió la correlación entre los distintos parámetros en condiciones iniciales y posteriores al almacenamiento a distintas temperaturas (24°C (WS) y -20°C (CS)).

Determinación de dienos y trienos conjugados: A 60 μ l de muestra se le agregó 3 mL de etanol, se incubó 1 hora a -20° C, se centrifugó a 5000 \times g por 15 minutos y se recuperó el sobrenadante de la fracción lipídica. Se realizó un barrido espectral de 200 a 350 nm al extracto etanólico y se determinó dienos y trienos a 231nm y a 268nm respectivamente [1].

Aminoácidos Aromáticos: Se midió la absorbancia a 280nm por espectrofotometría de absorción UV. Se utilizaron estándares de BSA.

Cuantificación de Proteínas: Se utilizó el método colorimétrico de Bradford [2]. Se utilizaron estándares de BSA.

Análisis fisicoquímicos de leches en polvo comerciales:

Determinación del contenido de grasa se determinó por el método de **Rose-Gottlieb** (AOAC 989.05).

Método Rose-Gottlieb [3]:

A) Se realizó un pre-tratamiento de la muestra de leche en polvo, donde se pesó 1 g de muestra en un tubo de extracción de Rose Glottlieb, se adicionó cuidadosamente 9 mL de agua y mezcló hasta que desaparecieran los grumos. Se adicionó 1 mL de hidróxido de amonio 0,88 M y se mezcló. La muestra se dejó reposar toda la noche a temperatura ambiente. Luego se colocó a peso constante un matraz bola de fondo plano con perlas o piedras de ebullición en la estufa a 100 °C, por aproximadamente 1 h.

B) Extracción de grasa: Se adicionaron 10 mL de etanol, se mezclaron y enfriaron. Se adicionaron 15 mL de éter etílico, se tapó el tubo y agitó por un minuto. Se enfrió, se adicionaron 15 mL de éter de petróleo y se agitó por un minuto. Se dejó reposar por 30-60 min o hasta que la capa etérea se haya separado completamente. Se quitó el tapón, se enjuagó el cuello del matraz con 5 mL de una mezcla de éter etílico:éter de petróleo (1:1). Se insertó el tubo sifón para recuperar el solvente en el matraz bola a peso constante, luego se enjuagó el tubo sifón con solvente recuperando este en el matraz. Se repitió la extracción y lavados 2 veces. Se eliminó el solvente del rotavapor, se secó el matraz por 1h a 100 °C y pesó. Luego se procedió a calcular el contenido de grasa.

Determinación del contenido de proteínas por el método de Kjeldhal (AOAC 930.29) [4].

Determinación del contenido de humedad: secar a 100 °C por 2 h de acuerdo al método recomendado por la AOAC 931.04.

Determinación de la humectabilidad: de acuerdo a las normas Estándar FIL (FIL-IDF 87: 1979).

Almacenamiento de las muestras de leche: Las muestras de leche fueron almacenadas por 9 meses a 24 °C (WS) o a -20 °C (CS) en la oscuridad.

Carbonilos Proteicos en leche en polvo reconstituida: La técnica clásica de Levine fue adaptada a partir de otros trabajos realizados previamente [5-6]. Alícuotas de leche reconstituida (1mg de proteína, ~30µl de leche) fueron incubadas con 10mM de 2,4-DNPH en HCl 2M (1 mL volumen final) por 30 minutos a temperatura ambiente. Las proteínas fueron precipitadas con TCA 10% (concentración final) y recuperadas por centrifugación a $7500 \times g$ por 5' (Micromax RF centrifuga, International Equipment Company, Needham, MA). Los precipitados fueron lavados tres veces con 2 mL de etanol/acetato de etilo 1:1 v/v, y finalmente disueltos en 1 mL de hidrocloreuro de guanidina 6 M pH 2,3. El contenido total de carbonilos se determinó a 370 nm considerando una absortividad molar $\epsilon=2,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ con un espectrofotómetro Mini Spec UV-vis (Shimadzu, Kyoto, Japan). La concentración total de proteínas se determinó a 280 nm. Los resultados fueron expresados como nmoles de grupos carbonilos/mg de proteínas. Los resultados fueron expresados como nanomoles de carbonilos por mg de proteína.

Preparación de las muestras de leche para determinación de fluorescencia emitida por Ditirosina, N-formilquinurenina y Triptofano: La proteína de la leche reconstituida (1mg) fue precipitada por TCA al 10% (5% concentración final) y se centrifugó a $7500 \times g$ por 5' (Micromax RF centrifuge, International Equipment Company, Needham, MA). El precipitado se lavó con etanol/acetato de etilo 1:1 v/v y se resuspendió en 1 mL de clorhidrato de guanidina 6 M pH 7, quedando en solución la proteína de leche.

Cuantificación de Ditirosina y N-Formilquinurenina: Soluciones de proteínas (1mg/mL) fueron analizadas para determinar la presencia de ditirosina (ditirosina) por fluorometría. La cuantificación se realizó utilizando un fluorómetro SLM 4800C (SLM/Aminco, American Instrument Company, Urbana, IL) equipado con una lámpara con arco de xenón usando un

ancho de banda de 8 nm. La formación de ditirosina fue monitoreada por el aumento de fluorescencia usando una longitud de onda de excitación y emisión de 317 y 410 nm, respectivamente, como fue reportado previamente [7-8]. La ditirosina tiene el espectro de emisión característico del estándar auténtico con un máximo a 410nm [9]. *N*-formilquinurenina fue cuantificada utilizando como longitud de onda de excitación y de emisión 325 nm y 435 nm, respectivamente [10]. La expresión de los resultados de ditirosina se realizó como la relación entre la intensidad emitida a 410 nm y 350 nm, la cual fue expresada como Unidades Arbitrarias de Fluorescencia (AFU). Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado.

Polimerización, agregación y proteólisis de proteínas, por SDS-PAGE:

La electroforesis en gel con SDS fue realizada de acuerdo con Jovanovic et al. (2007), usando un gel retenedor al 3% y un gel separador al 15%. Previo a realizar la electroforesis, las muestras de leche fueron diluidas 25 veces en agua milliQ, se les agregó el buffer de muestra Laemmli que contiene 2,5% de β -mercaptoetanol, y hervidas por 5min (Laemmli, 1970). La unidad de electroforesis vertical Mini-Protean III system (BioRad Corp., Richmond, CA) fue utilizada en conjunto con la fuente Bio-Rad Power PAC 3000. El gel fue teñido con 0,25% Coomassie Blue R-250 por 90 min, y desteñido en una solución de metanol:acético:agua (20% metanol, 10% ácido acético). Los geles desteñidos fueron escaneados (Epson Stylus TX115 scanner, Capital Federal, Argentina) y cuantificados por análisis de la densitometría con un programa de análisis de uso gratuito llamado Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Digestibilidad con Pepsina

La digestión con pepsina in vitro se realizó con una relación enzima:sustrato de 1:100 (p/p) usando una solución de pepsina porcina de 7,0 mg/mL (P6887, actividad 3,260 unidades/mg of proteína, Sigma-Aldrich) y muestras de 30 mg/mL proteína. Muestras de 60 μ L fueron colocadas a un microtubo con 225 μ L of 0,1 M HCl y 15 μ L de solución de pepsina. Las muestras fueron incubadas por 0, 15, 30, y 60 min a 37°C. La digestión fue parada con el agregado de 10 mM Tris-0,01% EDTA, pH 9. Las proteínas (20 μ g) fueron separadas por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 15%, teñidas con Coomassie Blue, y cuantificadas por análisis de la densitometría utilizando el programa Image J.

Coagulación inducida por quimosina:

Un ensayo de laboratorio descripto por Melilli et al. (2002) fue utilizado con modificaciones menores. Se agregaron 400 μ L de una solución de calcio al 20% a tubos previamente pesados conteniendo 5 mL de LE. Las muestras fueron colocadas en un baño a 40°C e incubadas por 10 min. Luego, 0,6 mL de quimosina (origen microbiano: *Mucor miehei*, Clerici-Sacco Group, Cadorago, Italy) diluída 1:5.000 en agua destilada desionizada fueron agregadas a cada tubo. Las muestras fueron mezcladas en un vortex por 15 s e incubadas en el baño con agua a 40°C por 30 min. Luego de esto, se esperó a que se forme un coágulo firme y los tubos se centrifugaron (centrifuge 5804 R, Eppendorf AG) a 1,200 \times g por 30 min. El sobrenadante fue cuidadosamente removido, y los tubos colocados a secar boca abajo en

papel absorbente por 1h y luego pesados (coágulo húmedo fresco). Finalmente, los precipitados fueron liofilizados y pesados de nuevo (rendimiento de coágulo seco). El rendimiento de coágulo fresco húmedo y el coágulo seco fueron expresados como porcentaje del peso relativo a la muestra control [11].

Crecimiento de *P. roqueforti*: Se prepararon placas de petri de 6 cm de diámetro con leche oxidada como medio de cultivo. El medio se preparó en frascos donde se colocó 1,2% de agar, 1,3% de leche oxidada por irradiación UVFL por distintos periodos de tiempo. Fueron autoclavados y luego colocados en las placas estériles. Posteriormente se inocularon las placas con 100 μ L de una dilución 1/100 del hongo *P. roqueforti*. Se incubaron a temperatura ambiente por 7 días y luego se fotografiaron. Se determinó el crecimiento por medio de la cuantificación del área donde creció el hongo con el programa Image J. También se realizó la cuantificación del peso seco del hongo luego de filtrar el medio con papel de filtro en un kitasato, con ayuda de una bomba de vacío. Ambas determinaciones dieron valores de porcentaje de crecimiento similares.

Capacidad Secuestradora de Radicales Libres por DPPH

La capacidad de capturar radicales libres del DPPH se monitoreó de acuerdo con el método descrito por Shimada et al. 1992. Las muestras de leche en polvo se prepararon a diferentes concentraciones con agua desionizada y se añadió 0,070 mL de muestra a 0,750 mL de 6×10^{-4} M DPPH en solución etanólica. Se midió la absorbancia a 492 nm en una placa multipocillo con un lector de microplacas RT-2100C (Rayto, Shenzhen, China) después se dejó a la solución permanecer en la oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente (24 ° C). La curva estándar se hizo con nueve concentraciones de ácido gálico. Cada muestra se determinó por triplicado. La actividad capturadora de radicales libres se expresó como el porcentaje de inhibición de los radicales libres de la muestra y se calculó como $[1 - (\text{absorbancia de la muestra} / \text{absorbancia de la muestra blanco})] \times 100$ [12].

Cuantificación del Color

La evaluación del color fue llevada a cabo utilizando un espectrofotómetro (Konica Minolta, modelo CM 600d, Japón) de acuerdo con CIE Lab Scale. Para cada muestra se midieron los parámetros L (brillo), a (-verde a + componente rojo) y b (-azul a + componente amarillo). El seteo del instrumental fue con luz D65 daylight artificial (10° de ángulo estándar). Las determinaciones se realizaron a 25° C y por triplicado.

Análisis del Espectro UV-Visible de las Proteínas

Las proteínas de la leche reconstituida (1 mg de proteína) fueron precipitadas con 10% TCA (concentración final) y recuperado por centrifugación por 5 min a $7.500 \times g$ (Micromax RF centrifuge, International Equipment Company, Needham, MA). El precipitado fue lavado 3 veces con 1 mL de etanol/acetato de etilo 50:50 (v/v), y redisoluto en 1 mL de 6 M

hidrocloruro de guanidina, pH 7. Los datos espectrales fueron obtenidos (200-600 nm) utilizando un espectrofotómetro Mini Spec UV-vis (Shimadzu, Kyoto, Japan). La relación de proteínas de suero a proteínas totales fue calculada utilizando la cuarta derivada del espectro de absorción UV por el método de [13].

Contenido de Fenoles Totales

El contenido de fenoles totales de las muestras de leche fue determinado por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu [14] con algunas modificaciones. Las muestras de leche (0,015 mL) fueron disueltas en 2,5 mL de agua miliQ y mezcladas con 0,100 mL del reactivo para fenoles de Folin-Ciocalteu's 1N y se dejó que reaccionara por 8 min. Luego, se agregaron 0,100 mL de solución 20% w/v Na₂CO₃. Luego de incubar por 75 min las muestras fueron centrifugadas por 30 min a 10000 × g. Los sobrenadantes fueron transferidos dentro de una cubeta de 1,5 mL (1 cm paso óptico) y la absorbancia a 765 nm fue determinada utilizando un espectrofotómetro Mini Spec UV-vis (Shimadzu, Kyoto, Japón). Las concentraciones de los extractos se calcularon utilizando una curva estándar de ácido gálico y los equivalentes se leyeron en la recta generada por regresión lineal y el contenido fenólico total se expresó como miligramos de equivalentes de ácido gálico por 1000 mL de muestra. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

Análisis estadísticos

Las curvas cinéticas y constantes de velocidad de los datos promediados fueron generadas utilizando el programa Simfit (versión 6.0.18, de la Universidad de Manchester, Manchester, Reino Unido; <http://www.simfit.man.ac.uk>). Los datos fueron la media ± SEM de 3 experimentos separados, cada uno determinado por triplicado. La comparación estadística de los modelos de regresión no lineal se realizó mediante una prueba F utilizando las sumas adicionales del principio de los cuadrados. La regresión no lineal por cuadrados mínimos se realizó mediante los programas de Sim-Fit o GraphPad PRISMk 4,02 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los experimentos se realizaron por lo menos por duplicado o triplicado de las muestras. Los datos obtenidos fueron la media ± SDM obtenidos de 3 experimentos separados, cada uno con determinaciones por triplicado. Las diferencias fueron analizadas por un t-test de dos colas. El análisis de correlación se llevó a cabo por el método de los mínimos cuadrados. Los datos fueron analizados utilizando el programa Stat Plus (Berk Carey, de Pacific Grove, CA).

ANEXO 1

Códigos de los aminoácidos

Código (1 letra)	Código (3 letras)	Aminoácido
A	Ala	Alanina
R	Arg	Arginina
N	Asn	Asparagina
D	Asp	Aspartato
C	Cys	Cisteína
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
K	Lys	Lisina
M	Met	Metionina
F	Phe	Fenilalanina
P	Pro	Prolina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina
V	Val	Valina

REFERENCIAS

1. Forcato D.O., Carmine M.P., Echeverria G.E., Pecora R.P. y Kivatinitz S.C. *Milk fat content measurement by a simple UV spectrophotometric method: an alternative screening method.* J Dairy Sci, 2005. **88**(2): p. 478-81.
2. Bradford M.M. *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.* Analytical Biochemistry, 1976. **72**: p. 248-254.
3. James C.S. *Analytical Chemistry of Foods.* 1999, Gaithersburg, Maryland. : An Aspen Publication.
4. Kjeldahl J. *En ny metode til kvaelstofbestemmelse i organiske stoffer.* Zeitschrift fur Analytische Chemie, 1883. **22**: p. 366-382.
5. Fenaille F., Parisod V., Visani P., Populaire S., Tabet J.-C. y Guy P.A. *Modifications of milk constituents during processing: A preliminary benchmarking study.* International Dairy Journal, 2006. **16**(7): p. 728-739.
6. Levine R., Garland D., Oliver C., Amici A., Climent I., Lenz A., Ahn B., Shaltiel S. y Stadtman E. *Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins.,* in *Methods in Enzymology.* 1990. p. 464-478.
7. Heinecke J.W., Li W., Francis G.A. y Goldstein J.A. *Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins.* The Journal of Clinical Investigation, 1993. **91**(6): p. 2866-2872.
8. Artola R.L., Conde C.B., Bagatolli L., Pecora R.P., D.Fidelio G. y Kivatinitz S.C. *High density lipoprotein from hypercholesterolemic animals has peroxidized lipids and oligomeric apolipoprotein A-I.* Biochem. Biophys. Res. Commun, 1997. **239**: p. 570-574.
9. Capeillere-Blandin C., Delaveau T. y Descamps-Latscha B. *Structural modifications of human β_2 -microglobulin treated with oxygen-derived radicals.* Biochem J, 1991. **277** (Pt 1): p. 175-82.
10. Fukunaga Y., Katsuragi Y., Izumi T. y Sakiyama F. *Fluorescence Characteristics of Kynurenine and N'-Formylkynurenine, Their Use as Reporters of the Environment of Tryptophan 62 in Hen Egg-White Lysozyme.* J Biochem, 1982. **92**(1): p. 129-141.
11. Hallén E., Lundén A., Allmere T. y Andrén A. *Casein retention in curd and loss of casein into whey at chymosin-induced coagulation of milk.* Vol. 77. 2010. 71-6.
12. Barros L., Ferreira M.-J., Queirós B., Ferreira I.C.F.R. y Baptista P. *Total phenols, ascorbic acid, [beta]-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities.* Food Chemistry, 2007. **103**(2): p. 413-419.
13. Lüthi-Peng Q. y Puhan Z. *Determination of protein and casein in milk by fourth derivative UV spectrophotometry.* Analytica Chimica Acta, 1999. **393**(1-3): p. 227.
14. Singleton V.L. y Rossi J.A., Jr. *Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents.* Am. J. Enol. Vitic., 1965. **16**(3): p. 144-158.

TRABAJOS PUBLICADOS

ALTERACION DEL PERFIL PROTEICO DE LECHE EN POLVO POR ACCIÓN DE LA LUZ ULTRAVIOLETA O FLUORESCENTE

Dana Scheidegger¹, Rolando P. Pecora^{2*}, Paola M. Radici¹, y Silvia C. Kivatinitz¹

1: Departamento de Química Biológica-CIQUIBIC, Facultad de Ciencias Químicas Univ. Nacional de Córdoba, Argentina; e-mail: skivat@fcq.unc.edu.ar

2: Cátedra de Bromatología y Toxicología, Cs. Exactas, Físicas y Nat., Univ. Nacional de Córdoba, Velez Sarsfield 1611, (X5016GCA) Córdoba, Argentina; e-mail: bromatologia@efn.uncor.edu; e Instituto A. P. de Cs. Básicas y Aplicadas, Univ. Nacional de Villa María, (5900) Villa María, Córdoba, Argentina

Palabras claves: leche en polvo, proteínas, oxidación por luz, SDS-PAGE.

Resumen

Muestras de leche irradiadas desde 0 a 48 horas, con luz ultravioleta, fluorescente y ultravioleta + fluorescente, fueron analizadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. Los principales cambios ocurrieron sobre las caseínas, disminuyendo en un 7, 36 y 80 ±5%, a las 24 horas, con luz FL, UV y UV+FL respectivamente. También se observaron agregados, de peso molecular mayor a 70 kDa, en UV y en UV+FL desde las 8 y 4 horas respectivamente, pero no en FL; además se identificaron cambios en la formación de dímeros y en el patrón de degradación, distintos para cada luz.

INTRODUCCIÓN

La leche en polvo es uno de los principales productos lácteos de la cuenca lechera de Córdoba, Argentina. Los costos de almacenaje y transporte de la leche deshidratada son menores que los de la leche entera. La leche es expuesta a la irradiación ultravioleta para aumentar la vida útil post elaboración y a la luz cuando es expuesta en refrigeradores iluminados con lámparas fluorescentes.

La exposición de los alimentos lipoproteicos a la luz de lámparas fluorescentes en las góndolas de los supermercados y en distintos tipos de exhibidores comerciales favorece la formación de productos de oxidación que disminuyen sus cualidades organolépticas [1] [2] y su valor nutricional [2]. Bajo la influencia de la luz en los refrigeradores del supermercado cuando la leche no posee protección contra ésta, la leche pierde en las primeras doce horas casi la mitad de la Riboflavina (Vitamina B2). Además, la leche expuesta a la luz, luego de dos a cuatro horas desarrolla sabor metálico también conocido como “sabor a luz”, causado por una reacción química sobre las proteínas [3].

Diversos agentes favorecen la oxidación proteica: la radiación gama y ultravioleta, los lípidos peroxidados, enzimas oxidoreductasas y algunas drogas [4]. Los procesos oxidativos afectan: la carga, la estructura tridimensional de las proteínas, la actividad enzimática, el valor nutricional y la funcionalidad de las proteínas [5] (por ej. rendimiento quesero se modifica por cambios en las caseínas). Durante la oxidación proteica se produce la formación de enlaces

disulfuro, se forman grupos carbonilos en las cadenas laterales y entrecruzamientos por enlaces ditirosina. Las tirosinas pueden entrecruzarse, clorinarse, nitrosarse, o hidroxilarse. Los triptofanos sufren modificaciones, los aminoácidos alifáticos forman hidroperóxidos y se producen aductos de peroxidación lipídica [4]. También se han informado casos de productos de oxidación formados a partir de la modificación de dos residuos aminoacídicos adyacentes.

El tratamiento térmico durante las operaciones normales del procesamiento industrial de la leche le produce cambios físico-químicos. En estas condiciones se produce la formación de coagregados de caseínas y otras proteínas de la leche [6].

La hipótesis de trabajo es que la oxidación de la leche por irradiación lumínica o ultravioleta altera su perfil proteico. El conocimiento de estos efectos oxidativos durante las distintas etapas de elaboración, ayudará a diseñar mejoras en su industrialización, en las condiciones de envasado y en el almacenaje, resguardando la calidad, e inocuidad de la leche.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizó leche en polvo entera obtenida de un proveedor local (Sancor), al cual se le pidió varias cajas de leche del mismo lote. El dispositivo de oxidación es un paralelepípedo con una altura de 30cm, un largo de 50cm y un ancho de 20cm, que cuenta con una lámpara fluorescente cilíndrica Alic Daylight 15W/F15T8, 230V, fabricada en China, y una lámpara ultravioleta cilíndrica Philips de Hg, UV-C TUV 15W/G15T8, fabricada en Holanda. El dispositivo de oxidación se coloca dentro de una cámara a 4 °C.

Métodos

La leche en polvo fue reconstituída con agua destilada según la recomendación del envase (13 gr%), y se realizaron estudios de oxidación de leche con tres sistemas de luz: a) Ultravioleta (UV), b) Fluorescente (FL), y c) Ultravioleta + Fluorescente (UV+FL). Se irradiaron muestras de 5 ml de leche, en placas de petri de vidrio de 6 cm de diámetro, por distintos periodos de tiempo: 0, 1, 2, 4, 8, 24 y 30, y 48 Hs., a 4°C. Como control se colocaron muestras de leche protegidas de la luz, con papel de aluminio, fuera del dispositivo de oxidación durante el mismo periodo de tiempo, condiciones de temperatura y relación volumen/superficie, en forma simultánea. Las muestras de leche recolectadas, se colocaron en buffer de muestra Laemmli con y sin 2-mercaptoetanol (2-ME), y se las hirvió por 5 minutos. Luego se realizó la separación de las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), con un gel separador al 15%. Se tomaron fotos digitales de los geles y se analizaron por densitometría, con el programa Image J.

RESULTADOS

Se estudió el perfil proteico de la leche en polvo reconstituída, expuesta a las distintas luces, y se encontraron cambios significativos en las cantidades de las proteínas que la componen. Los principales cambios fueron: a) fracción de las caseínas (bandas entre 25 a 35 kDa), b) en la formación de bandas entre 50 a 70 kDa., c) en la formación de agregados de alto peso molecular (mayores a 83 kDa), y d) en el patrón de fragmentación (Figura 1).

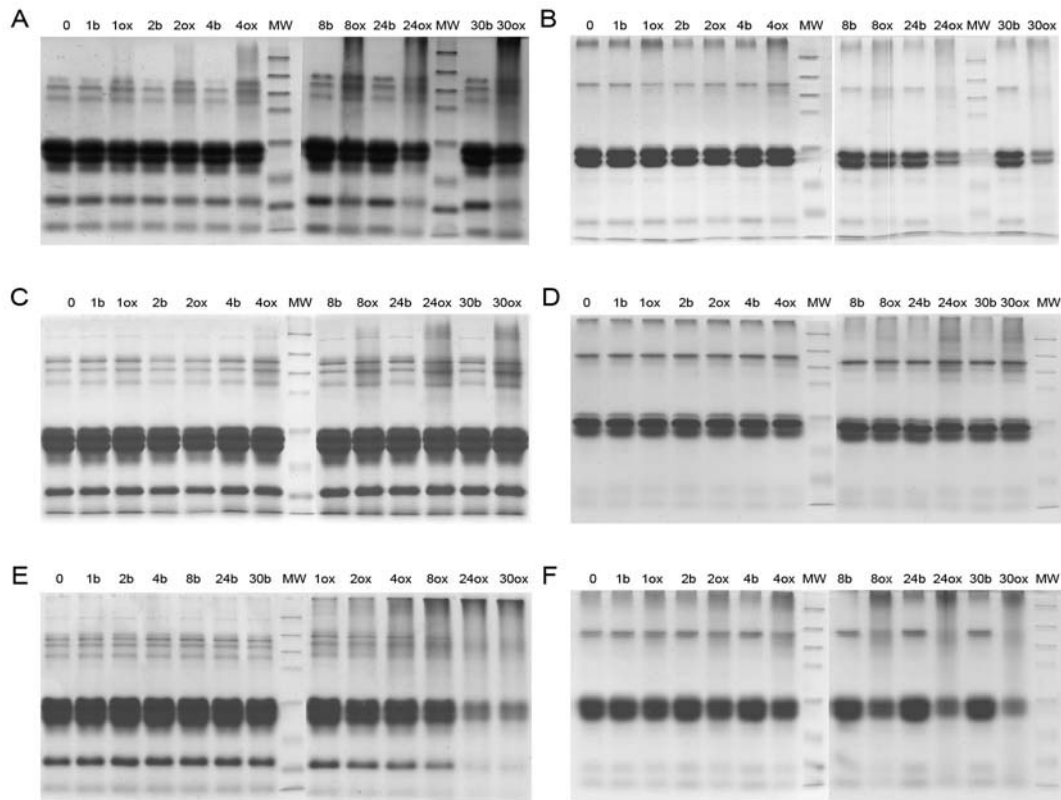


Figura 1. Perfiles proteicos de muestras de leche en polvo entera reconstituida expuestas a UV (A), a luz FL (C), a luz UV+FL (E) obtenidos por SDS-PAGE en condiciones reductoras. Los paneles (B), (D) y (F) corresponden a las muestras (A), (C) y (E) resueltas en condiciones no reductoras, respectivamente. MW: marcador de peso molecular (las bandas corresponden a proteínas de 175, 83, 62, 47.5, 32.5, 25, 16.5, y 6.5 kDa respectivamente). T0: tiempo cero, T1, una hora, T2, dos horas, T4, cuatro horas, T8, ocho horas, T24, veinticuatro horas, T30, treinta horas. b: control (sin exposición a irradiación), ox: expuestas por los tiempos indicados a las condiciones de irradiación señaladas.

a) Cambios en la cantidad de caseínas

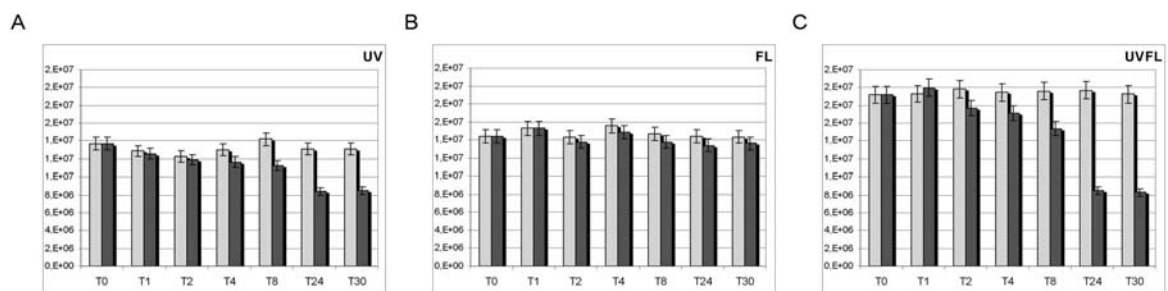


Figura 2. Cantidad de caseínas (píxeles), determinadas por densitometría de las bandas entre 25 y 35 kDa de la Figura 1 en función del tiempo (horas). (A) LE expuesta a luz UV. (B) LE expuesta a luz FL. (C) LE expuesta a luz UV+FL simultáneamente. Barras blancas: LE control. Barras grises: LE expuesta a la luz.

Las caseínas de las muestras irradiadas con luz UV mostraron una disminución significativa de $10 \pm 5\%$ a las 4 hs, y $36 \pm 5\%$ a las 24 hs de exposición. La disminución fue notoriamente menor y no significativa en las muestras irradiadas con luz FL. Cuando las muestras fueron sometidas a las dos radiaciones (UVFL) el efecto fue sinérgico. Ya a las 2hs se observó una disminución significativa del $11 \pm 5\%$, a tiempos mayores las reducciones fueron $12 \pm 5\%$, $21 \pm 5\%$ y $57\% \pm 5\%$, a las 2, 4, 8 y 24 hs respectivamente. (Figura 2 y Figura 1A, C y E).

b) Cambios en las bandas proteicas de 50 a 70 KDa

Se observó la aparición de agregados de entre 50 kDa-70 kDa que fueron resistentes a la reducción por 2-ME (Figura 3.A y B). En condiciones no reductoras (Figura 3B), se observó un aumento del contenido de proteína de las tres bandas comprendidas en este intervalo de pesos moleculares, que incrementó en función del tiempo de exposición hasta las 4 hs. A tiempos de exposición mayores cada una de las bandas presentó un comportamiento distinto pero en términos generales todas disminuyeron después de las 24 hs. En condiciones reductoras (Figura 3A), se observó también aumento cada vez mayor hasta las 4 hs, luego un descenso a las 8 hs., y por último, una disminución de las tres bandas, desde las 24 hs. Estos datos muestran que la formación de estas bandas no se debió a enlaces disulfuros ya que las diferencias más grandes se observaron en condiciones reductoras. La mismas tendencias en los cambios se observaron con FL pero en menor medida (Figura 1 C y D). En leches expuestas a UVFL la aparición de estas bandas se superpone con la fragmentación desde tiempos cortos, por lo cual se observa primero un aumento hasta las 4 hs y luego una disminución.

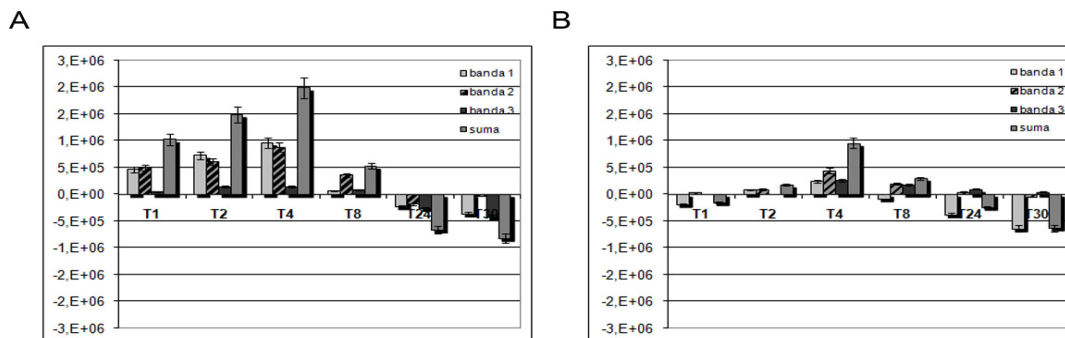


Figura 3. Formación de bandas de peso molecular entre 50 a 70 kDa. Cantidad de proteína de la muestra expuesta a la luz UV menos la cantidad de proteína del control (píxeles), en función del tiempo de exposición (1, 2, 4, 24 y 30 horas), de las tres bandas 1, 2 y 3 (de menor a mayor peso molecular) de la Figura 1 A y B. Las barras corresponden a las bandas 1, 2, 3, y a la suma de estas. (A) Condiciones reductoras. (B) condiciones no reductoras.

c) Formación de agregados de alto peso molecular

La cantidad de proteína que formaba agregados de alto peso molecular se dividió en dos grupos: los agregados de más de 83 kDa, que entraban en el gel separador, y los de tamaño superior a 175kDa, que no entraban en éste, y quedaban retenidos en el gel superior.

Agregados de más de 83 kDa: Se observó en condiciones reductoras (Figura 4 A, C y E), un aumento de estos agregados en función del tiempo de exposición que se inició más tempranamente en las muestras expuestas a UV, pero que alcanzó el mismo nivel que con FL. Al exponer las LE a UVFL, se observó un aumento más rápido y una mayor formación de agregados, resistentes a la acción del 2-ME. Los agregados presentes en condiciones no reductoras mostraron diferencias que no fueron tan marcadas respecto de los controles como en condiciones reductoras (Figura 4 B, D y F). La exposición a UV y UVFL mostró la formación de agregados desde 1 hr, y a FL después de las 24 hs. Estos datos muestran que la leche en polvo de consumo tiene agregados de más de 83kDa debidos a la formación de puentes disulfuro, y que su exposición a la luz favorece la formación de agregados formados por enlaces covalentes que no son por puente disulfuro.

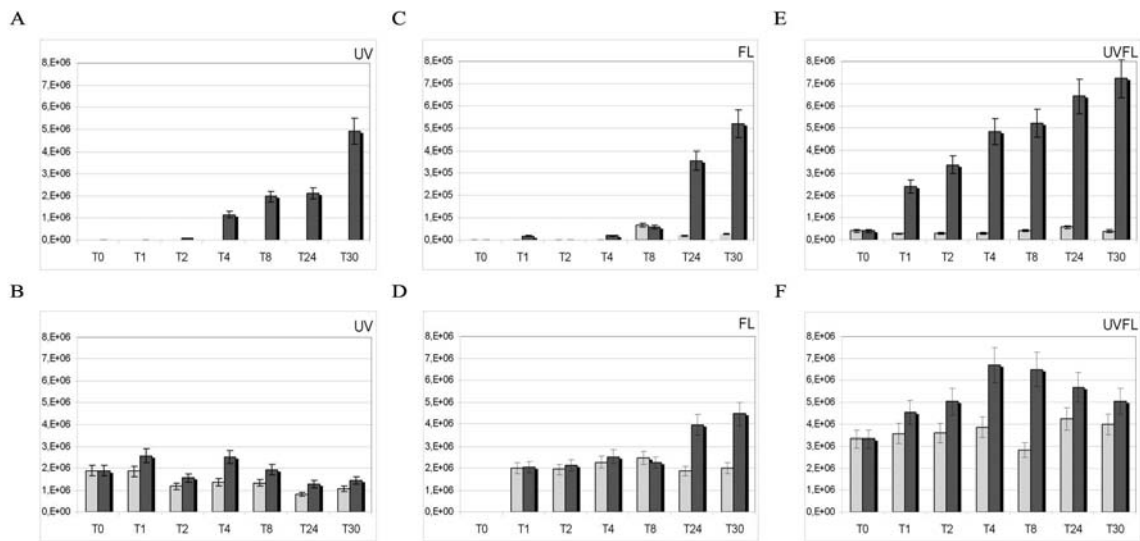


Figura 4. Formación de agregados de peso molecular mayor a 83 kDa. Cantidad de proteína (pixeles), en función del tiempo de exposición a la luz (horas), obtenida por densitometría de las bandas mayores a 83 kDa de la figura 1. Barras blancas: LE control. Barras grises: LE expuesta a la luz.

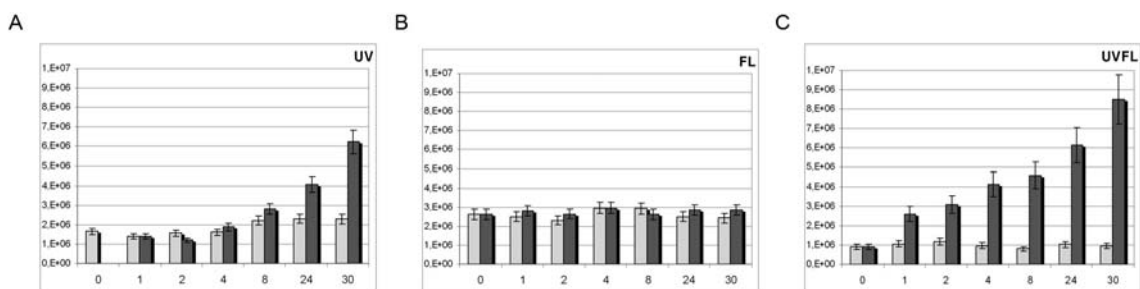


Figura 5. Formación de agregados de peso molecular mayor a 175 kDa que no entran al gel separador y quedan retenidas en el gel superior. Análisis densitométrico de la cantidad de proteína (pixeles), en función del tiempo (horas) de exposición a la luz UV (A), FL (B) ó UV+FL (C) correspondientes a la proteína retenida en el gel superior de la figura 1 en condiciones reductoras. Barras blancas: LE control. Barras grises: LE expuesta a la luz.

Agregados mayores a 175 kDa: Al estudiar los agregados de más de 175kDa se observó un aumento a partir de las 8 hs en LE expuesta a UV, y en UVFL a partir de 1 hr, sin embargo no se formaron agregados en LE expuesta a FL (Figura 5). En condiciones no reductoras se observa la presencia de estos agregados en las muestras control y expuestas a la luz.

d) Perfil de fragmentación

Luego de las 8 hs se evidenció una fragmentación generalizada de las proteínas de la leche expuesta al UV, se observaron bandas difusas en todo el carril que no estaban presentes a tiempos menores y que podrían provenir de la fragmentación de las caseínas (ver punto a) y de las bandas de 50 a 70 kDa después de las 24 hr cuando la proteólisis es el cambio predominante (ver punto b). Cuando se expuso la leche a FL, se observó disminución en todas las bandas proteicas y un aumento de bandas de peso molecular entre 50 y 175 KDa. Al exponer a UVFL se observó un efecto sumatorio: gran cantidad de aductos de 50 a 175kDa y fragmentación generalizada.

CONCLUSIONES

La irradiación de leche, sobre todo en longitudes de onda UV, produce alteraciones en todo el perfil proteico afectando la fracción de caseínas principalmente. Se esta estudiando como estos cambios afectan el rendimiento quesero.

REFERENCIAS

- [1]H.Kim, J.Hardy, G.Novak, J.P. Ramet, F.Weber “Off-tastes in raw and reconstituted milk”. *Food and Agriculture Organization of The United Nations Rome*, (1983).
- [2]Guerrero-Beltrán JA and Barbosa-Cánovas GV. “Advantages and Limitations on Processing Foods by UV Light”. *Food Sci. and Tech. Int.* Vol 10(3), pp. 137-147, Jun (2004).
- [3]F. Mestdagh, B. De Meulenaer, J. De Clippeleer, F. Devlieghere, and A. Huyghebaert “Protective Influence of Several Packaging Materials on Light Oxidation of Milk”. *J. Dairy Sci.* Vol 88, pp.499–510, (2005).
- [4]Emily Shacter “Quantification and significance of protein oxidation in biological samples” *Drug Metab. Rev.*, Vol 32(3&4), pp. 307–326, (2000).
- [5]Viljanen K. Thesis: “Protein oxidation and protein-lipid interactions in different food models in the presence of berry phenolics” University of Helsinki. October 7th (2005).
- [6]Snezana Jovanovic, Miroljub Barac, Ognjen Macej, Tanja Vucic, Caslav Lacnjevac. “SDS-PAGE Analysis of Soluble Proteins in Reconstituted Milk Exposed to Different Heat Treatments”. *Sensors*, Vol 7, pp. 371-383, (2007).



Protein oxidative changes in whole and skim milk after ultraviolet or fluorescent light exposure

D. Scheidegger,* R. P. Pecora,†† P. M. Radici,* and S. C. Kivatinitz*¹

*Departamento de Química Biológica-CIQUIBIC, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

†Cátedra de Bromatología y Toxicología, Departamento de Química Industrial y Aplicada, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

‡Instituto A. P. de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Nacional de Villa María, Villa María, Córdoba, Argentina

ABSTRACT

We investigated how protein changes occur, at the primary or higher structural levels, when proteins are exposed to UV or fluorescent (FL) light while in the complex matrix, milk. Whole milk (WM) or skim milk (SM) samples were exposed to FL or UV light from 0 to 24 h at 4°C. Protein oxidation was evaluated by the formation of protein carbonyls (PC), dityrosine bond (DiTyr), and changes in molecular weight (protein fragmentation and polymerization). Oxidative changes in AA residues were measured by PC. Dityrosine and N⁷-formylkynurenine (NFK), a carbonylation derivative of Trp, were measured by fluorometry. Protein carbonyls increased as a function of irradiation time for both WM and SM. The initial rate for PC formation by exposure to FL light (0.25 or 0.27 nmol/h for WM and SM, respectively) was slower than that following exposure to UV light (1.95 or 1.20 nmol/h, respectively). The time course of NFK formation resembled that of PC. After 24 h of UV exposure, SM had significantly higher levels of NFK than did WM. In contrast, WM samples irradiated with UV had higher levels of DiTyr than did SM samples, indicating different molecular pathways. The formation of intra- or intermolecular DiTyr bonds could be indicative of changes in the tertiary structure or oligomerization of proteins. The existence of NFK suggests the occurrence of protein fragmentation. Thus, proteolysis and oligomerization were analyzed by sodium dodecyl sulfate-PAGE. After 24 h of exposing WM to UV or FL light, all the proteins were affected by both types of light, as evidenced by loss of material in most of the bands. Aggregates were produced only by UV irradiation. Hydrolysis by pepsin and enzyme-induced coagulation by rennet were performed to evaluate altered biological properties of the oxidized proteins. No effect on pepsin digestion or rennet coagulation was found in irradiated SM or WM. The oxidative status

of proteins in milk and dairy products is of interest to the dairy industry and consumers. These findings provide knowledge that could be useful in determining the optimal lighting conditions in the dairy industry in general and in cheese making in particular.

Key words: milk protein, protein oxidation, light exposure

INTRODUCTION

The oxidative status of milk and dairy products is of interest to the dairy industry and consumers. Oxidation of milk can result in off-flavors, making the oxidized milk unacceptable to consumers and causing a decrease in the nutritional quality (Dunckley et al., 1962; Dimick and Kilara, 1983; Marsili, 1999). Both UV and visible light wavelengths contribute to the development of aroma compounds in milk (Rosenthal, 1992; Bosset et al., 1993). Singlet oxygen, created during the cascade of photochemical reactions, reacts with lipids, proteins, and vitamin compounds to initiate formation of oxidation products with unpleasant off-flavors (Hansen and Skibsted, 2000; Davies, 2003). Free radicals, generated by autooxidation reactions, are unstable and contribute further to the accumulation of secondary metabolites with effects on flavor and aroma.

Exposure of milk to light can take place at several stages from the time of milking until it is consumed. Previous works (Dimick and Kilara, 1983) report that light-induced protein oxidation in dairy products proceeds quickly and is detected after only a short exposure to light. Sandmeier (1996) noted that the reaction had no induction time.

Photooxidation affects the primary structure of proteins, producing changes in individual amino acids as carbonyl formation, and loss of aromatic amino acids has been described for several complex food matrices (Viljanen et al., 2005). Formation of protein carbonyls (PC) has been shown to be one of the salient changes in oxidized proteins and the concentration of PC is highly indicative of protein oxidation (Fenaille et al., 2006). Kynurenine and N⁷-formylkynurenine (NFK), a

Received July 8, 2010.

Accepted July 25, 2010.

¹Corresponding author: skivat@dqf.fcq.unc.edu.ar

carbonylation product of Trp, have been used as reporters of hen lysozyme denaturation by thermal treatment (Fukunaga et al., 1982).

The aromatic amino acids Trp, Tyr, and Phe have absorption maxima at wavelengths around 280 to 290 nm (Wetlaufer, 1962). Direct photochemical changes to protein are restricted to high-energy UV light because they have very limited absorption at wavelengths longer than 310 nm (Mortensen et al., 2004). Some earlier investigations on the effects of light on milk dealt with sensory aspects and the ability of milk to clot when renneted (Wishner, 1964; White and Bulthaus, 1982). Photooxidation of His residues causes κ -CN and whole CN to lose their ability to clot when renneted (Hill and Wake, 1969). In those works, the causes of the deleterious aromas were assigned mainly to the oxidation of lipid and riboflavin. Catalytic photoaggregation and photodegradation of purified α -LA, β -LG, and acid whey proteins isolated from homogenized milk have been described (Gilmore and Dimick, 1979). More recently, the effect of irradiation on individual isolated protein oxidation has been studied. Oxidative changes involving Trp residues and formation of dityrosines (**DiTyr**) have been noted (Dalsgaard et al., 2008), along with decreased accessibility of chymosin to oxidized caseins (Dalsgaard and Larsen, 2009).

The formation of protein polymers between whey proteins and casein components has been described for thermal-treated milk (Singh et al., 1996). Denaturation of β -LG seems to be the key phenomenon that initiates polymer formation (Anema, 2000) and has been proposed as a marker of heat processed milk (Chen et al., 2005). Heat induces a conformational change that results in the exposure of a reactive thiol group, which forms disulfide bonds with other cysteine-containing proteins such as BSA, or with proteins having disulfide bridges, such as α -LA, κ -CN, and α_{S2} -CN (Roefs and de Kruif, 1994; Vasbinder et al., 2001). Heat treatment of milk results in a complex mixture of native whey proteins and denatured whey proteins present as whey protein aggregates, CN-whey protein aggregates, and whey protein-coated CN micelles (Vasbinder et al., 2003).

Therefore, this study aimed to investigate the changes introduced into milk proteins at the primary or higher structural levels by UV or fluorescent (**FL**) light oxidation while in their natural complex matrix—whole milk (**WM**) or skim milk (**SM**). Oxidation was determined by the formation of PC and DiTyr, and by alteration in the molecular weights of proteins to detect polymerization and proteolysis. In addition, we assayed hydrolysis by pepsin and clotting by rennet because it has been demonstrated that photooxidation influences hydrolysis by proteases. The relationship between our

observations and milk quality preservation is discussed. These findings provide knowledge that could aid in determining optimal lighting conditions in the dairy industry in general and in cheese making in particular.

MATERIALS AND METHODS

Materials

2,4-Dinitrophenylhydrazin (**DNPH**) and pepsin (P6887, activity: 3,260 units/mg protein) were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). N,N'-Methylene-bis-acrylamide and acrylamide were from Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Guanidine hydrochloride (ultrapure) was from Genbiotech (Capital Federal, Argentina), TCA, glacial acetic acid, ethyl acetate, ethyl alcohol, and hydrochloride acid were from Cicarelli (San Lorenzo, Argentina). All of these products are of analytical grade.

Milk Samples

Commercially processed spray-dried WM was used (SanCor, Sunchales, Argentina). Whole milk powder was reconstituted to 13% total solids as indicated on the label. To obtain SM, reconstituted WM was defatted by centrifugation at $7,500 \times g$ for 15 min at 4°C (centrifuge 5804 R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) and then filtered through glass wool.

Experimental Design

Samples of 5 mL (WM or SM) were poured into 6-cm-diameter Petri dishes and exposed to FL or UV light inside a chamber (30 cm high, 50 cm long, and 20 cm wide) from 0 to 24 h at 4°C. Simultaneously, control samples were exposed to the same conditions but were wrapped in aluminum foil to avoid exposure to light.

The FL lamp was an Alic Daylight (15 W/F15T8, 230 V; Alic, Hefei, China), with an intensity of 2,090 to 2,100 lx, and the UV lamp was an Hg UV-C TUV Philips tube (15 W/G15T8; Philips, Eindhoven, Holland), with an intensity of 2.34×10^{19} quanta/s as assessed by ferrioxalate actinometry.

Protein Quantification

Protein concentration was determined by UV spectroscopy at 280 nm or by following the Bradford method (Bradford, 1976) using BSA as standard.

Measurement of Dityrosine and NFK

Protein solutions (1 mg/mL) were analyzed for the presence of dityrosine (DiTyr) by fluorometry, and

measurements were performed using an SLM 4800C fluorometer (SLM/Aminco, American Instrument Company, Urbana, IL) equipped with a xenon-arc lamp using an 8-nm bandwidth. Formation of DiTyr was monitored by the increase in fluorescence using excitation and emission wavelengths of 325 and 410 nm, respectively, as reported previously (Heinecke et al., 1993; Artola et al., 1997). Dityrosine has a characteristic emission spectrum of authentic standard with a maximum at 410 nm (Capeillère-Blandin et al., 1991). N-Formylkynurenine was measured using an excitation wavelength of 325 nm and an emission wavelength of 435 nm (Fukunaga et al., 1982).

Measurement of Protein Carbonyls

The methodology was adapted from Levine et al. (1990) as previously reported (Fenaille et al., 2006). An aliquot of aqueous milk solution (2 mg of protein) was incubated with 10 mM DNPH in 2 M HCl (1 mL volume), for 30 min at room temperature. Milk proteins were precipitated with 10% (wt/vol) TCA (final concentration) and recovered by centrifugation for 5 min at $7,500 \times g$ (Micromax RF centrifuge, International Equipment Company, Needham, MA). Protein pellets were washed 3 times with 1 mL of ethanol/ethyl acetate 50:50 (vol/vol) to remove free DNPH reagent and redissolved in 1 mL of 6 M guanidine hydrochloride, pH 2.3. Protein carbonyls were determined by UV spectrophotometry at 370 nm using an extinction coefficient of $2.2 \times 10^4 M^{-1}cm^{-1}$, with a Mini Spec UV-vis spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Results were expressed as nanomoles of carbonyl per milligram of protein.

SDS-PAGE

Sodium dodecyl sulfate-PAGE was performed according to Jovanovic et al. (2007), using a 3% polyacrylamide stacking gel and a 15% separating gel. Before electrophoresis, milk samples were diluted 25 times in distilled deionized water, mixed with Laemmli sample buffer containing 2.5% β -mercaptoethanol, and boiled for 5 min (Laemmli, 1970). The vertical electrophoresis unit Mini-Protean III system (BioRad Corp., Richmond, CA) was used in conjunction with the Bio-Rad Power PAC 3000 power supply. The gel was stained with 0.25% Coomassie Blue R-250 for 90 min, and destained in the methanol:acetic acid solution (20% methanol, 10% acetic acid). Destained gels were scanned (Epson Stylus TX115 scanner, Capital Federal, Argentina) and quantified by densitometry analysis free software Image

J (National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Pepsin Digestion

In vitro pepsin digestion was performed at an enzyme to substrate ratio of 1:100 (wt/wt) using a porcine pepsin solution of 7.0 mg/mL (P6887, activity of 3,260 units/mg of protein; Sigma-Aldrich) and samples of 30 mg/mL protein. Samples (60 μ L) were added to a microtube with 225 μ L of 0.1 M HCl and 15 μ L of pepsin solution. The samples were incubated for 0, 15, 30, and 60 min at 37°C. Digestion was stopped with the addition of 10 mM Tris-0.01% EDTA, pH 9. Proteins (20 μ g) were resolved by SDS-PAGE in a 15% polyacrylamide gel, Coomassie stained, and quantified by densitometry analysis using the Image J software.

Enzyme-Induced Coagulation

A laboratory assay described by Melilli et al. (2002) was used with minor modifications. Calcium (400 μ L of 20% wt/vol solution) was added to preweighed tubes containing 5 mL of WM. Samples were placed into a water bath at 40°C and incubated for 10 min. Then, 0.6 mL of chymosin (microbial origin: *Mucor miehei*, Clerici-Sacco Group, Cadorago, Italy) diluted 1:5,000 in distilled water was added to each tube. Samples were mixed on a vortex for 15 s and incubated in a water bath at 40°C for 30 min. After this time, a firm coagulum was formed. Tubes were centrifuged (centrifuge 5804 R, Eppendorf AG) at $1,200 \times g$ for 30 min. The supernatant was carefully removed, and the tubes were placed upside down on absorbent paper for 1 h and then weighed (fresh curd yield). Finally, pellets were subjected to lyophilization and weighed again (dry curd yield). Fresh curd yield and dry curd yield were expressed as percentage of weight relative to control sample weight (Hallén et al., 2010).

Statistical Analysis

Kinetic curves and rate constants of the averaged data were generated by using SimFit software (version 6.0.18, University of Manchester, Manchester, UK; <http://www.simfit.man.ac.uk>). Data points were the mean \pm SEM of 3 separate experiments, each with triplicate determinations. Statistical comparison of nonlinear regression models was performed by an *F*-test using the extra sums of squares principle. Nonlinear least squares regression was done using programs SimFit or GraphPad PRISMk 4.02 (GraphPad Software,

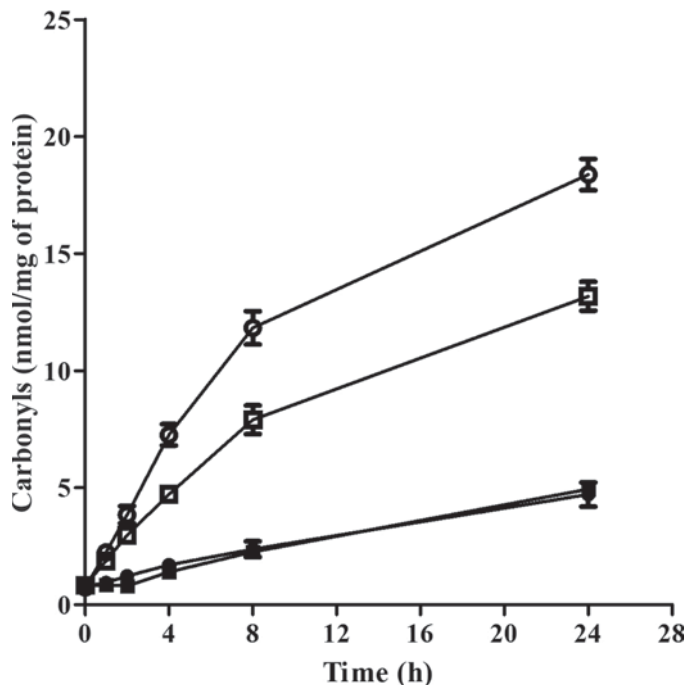


Figure 1. Kinetics of protein carbonyl generation by UV or fluorescent photooxidation. Protein carbonyls were determined in milk exposed to UV or fluorescent (FL) light by the colorimetric method of Levine et al. (1990), as a function of time of exposure to radiation. ■ = whole milk (WM) exposed to FL light; ● = skim milk (SM) exposed to FL light; □ = WM exposed to UV light; ○ = SM exposed to UV light. Results were expressed as nanomoles of carbonyls per milligram of protein and represent the average \pm SEM of triplicate experiments.

San Diego, CA). Experiments were performed at least in replicates of triplicate samples.

RESULTS AND DISCUSSION

Changes in the Primary Structure of Proteins

Changes in amino acid residues were measured by formation of carbonyl groups, DiTyr bonds, and a carbonylation derivative of Trp, NFK. It was observed that PC increased as a function of irradiation time for WM and SM (Figure 1). When WM or SM samples

were irradiated with UV light, PC increased following a first-order kinetic reaction; the monomolecular model gave the best fit (Table 1). Interestingly, the initial rate of PC formation was higher for SM than for WM. The kinetic parameters of PC formation following exposure to FL light were indistinguishable for WM and SM, likely indicating that lipids were not involved in the mechanism. Under FL irradiation, the curves fit better with the logistic model, indicating the existence of a latency delay in the onset of the reaction. The initial rate for PC formation by FL light was several times slower than that following UV light irradiation.

Few reports exist on the formation of PC by photooxidation or thermal treatments used in dairy product processing (Scaloni et al., 2002). It has been reported that isolated caseins developed an increase in carbonyl content because of the oxidation of Try, His, and Met after photooxidation by FL exposure (Dalsgaard et al., 2007). Moreover, PC formation in milk during processing had been studied and no correlation could be observed for lipid or protein oxidation (Fenaille et al., 2006). It is interesting to note that carbonyl formation by UV irradiation was different for whole and defatted milk, indicating that lipids conferred higher stability to oxidative photooxidation (Figure 1, Table 1). This observation could help to explain why, although lipid and protein oxidation can occur simultaneously and show synergistic effects, it is difficult to state whether lipid or protein species are more sensitive toward oxidation (Fenaille et al., 2006). Our results may provide an explanation for the lack of correlation observed in gas chromatography of volatile compounds originated from lipid and nonfat dry milk off-flavors determined by sensory analysis and suggests that protein carbonyl moieties could contribute to off-flavors without being detected by the chemical technique employed (Karagül-Yüceer et al., 2004).

Fluorescence spectra analysis allowed us to discern the oxidation of Tyr and Try to DiTyr and NFK, respectively. We observed that both AA oxidation products increased rapidly (until 8 h) in milks irradiated with UV or FL light; the extent of formation of DiTyr

Table 1. Kinetic parameters of protein carbonyl generation¹

Light	Sample	Initial rate (nmol/h)	Asymptote (nmol)	Constant	Best fit model	r ²
UV	Whole milk	1.20	15.3 \pm 2.5		Monomolecular	0.998
UV	Skim milk	1.95	21.2 \pm 0.5		Monomolecular	0.997
FL	Whole milk	0.25	5.2 \pm 0.1	0.200 \pm 0.010	Logistic	0.996
FL	Skim milk	0.27	4.80 \pm 0.06	0.233 \pm 0.009	Logistic	0.995

¹Analysis of UV or FL (fluorescence)-irradiated whole milk or skim milk was performed using Simfit from data depicted in Figure 1. The \pm refers to standard errors based on the curve fitting using the monomolecular or logistic models. These equations were chosen because they provided the best fit (based on the pattern of residuals and the lowest residual sum of squares).

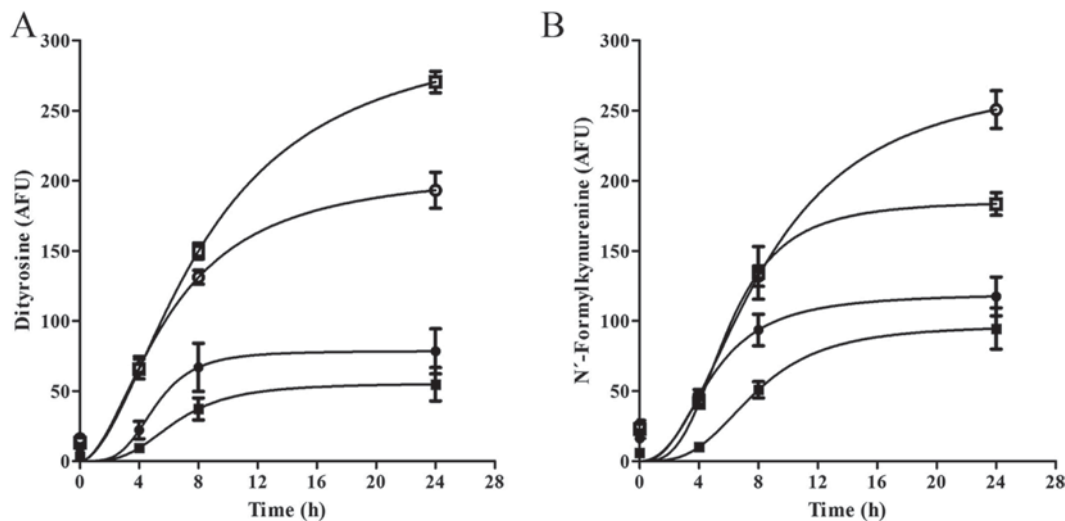


Figure 2. Kinetics of (A) dityrosine and (B) *N'*-formylkynurenine (NFK) formation by UV or fluorescent (FL) light exposure. Dityrosine and NFK were determined by fluorescence spectroscopy in an aliquot of 1 mg/mL of milk protein from milk exposed to UV or FL light, as a function of time. Excitation and emission were performed at 315 nm and 410 nm, respectively, for dityrosine, and 325 nm and 435 nm, respectively, for NFK. ■ = whole milk (WM) exposed to FL light; ● = skim milk (SM) exposed to FL light; □ = WM exposed to UV light; and ○ = SM exposed to UV light. Results were expressed as arbitrary fluorescence units (AFU) of the sample minus AFU of control and represent the mean \pm SEM of triplicates. One representative experiment of 3 different experiments is shown.

or NFK was higher under UV irradiation than with FL light exposure (Figure 2, panel A and B). After 24 h of UV irradiation, WM had higher levels of DiTyr and lower levels of NFK than did SM. At this time, no significant differences could be observed between SM and WM exposed to FL irradiation. Under similar illumination conditions (2,000 lx at 4°C for 24 h), Havemose et al. (2006) were unable to find differences in DiTyr formation for 2 types of milk with different fatty acid compositions. The time course of NFK formation resembled that of PC (Figure 1 and Figure 2, panel B), corroborating the findings in CN exposed to FL light (Dalsgaard and Larsen, 2009). After 24 h of UV exposure, SM had significantly higher levels of NFK compared with WM (251 ± 23 and 183 ± 14 , respectively; $P < 0.04$). Contrastingly, significantly higher levels of DiTyr were found in WM than in SM (270 ± 13 and 193 ± 22 , respectively; $P < 0.02$) indicating, most probably, different molecular pathways of formation.

The formation of DiTyr in photooxidized milk suggests that changes in the tertiary structure or oligomerization of proteins can occur and the existence of Trp derivatives could be indicative of protein cleavage.

Proteolysis and Aggregation

To determine proteolysis and oligomerization, we analyzed the electrophoretic mobility of milk proteins. Milk proteins were resolved by electrophoresis under reducing and denaturing conditions. After 24 h of expo-

sure of WM to UV or FL light, all the resolved proteins were affected by both types of illumination; loss of substance in most of the bands could be observed after 8 h of exposure (Figure 3). The decrease in total protein recovery after 24 h of irradiation could be attributed to proteolysis and it was greater for UV than for FL light exposure (Figure 3). The level of aggregates was not affected by FL irradiation but increased steeply following UV light exposure to reach more than twice the initial value after 24 h. The occurrence of aggregates in UV-exposed milk could explain the greater loss of protein under these irradiation conditions. The occurrence of aggregates by UV exposure (Figure 3) is also in accordance with the occurrence of higher levels of DiTyr bond formation (Figure 2, panel A). These results identify a new covalent bond involved in milk protein oligomerization because, until now, oligomer formation was thought to be the result of the disulfide interaction among κ -CN, β -LG, and α -LA in both heat-treated milk (Carbonaro et al., 1998; Nabhan et al., 2004; Jovanovic et al., 2007) and in fluorescent or sun-irradiated milk for periods longer than 90 h (Gilmore and Dimick, 1979).

The time course of decrease in CN closely followed that of total protein. This result was expected because CN is the most abundant protein in milk (about 70–80%). The most affected protein was α -LA, irrespective of the type of irradiation; only 30% remained after 24 h of FL irradiation and it was undetectable after the same period of UV exposure.

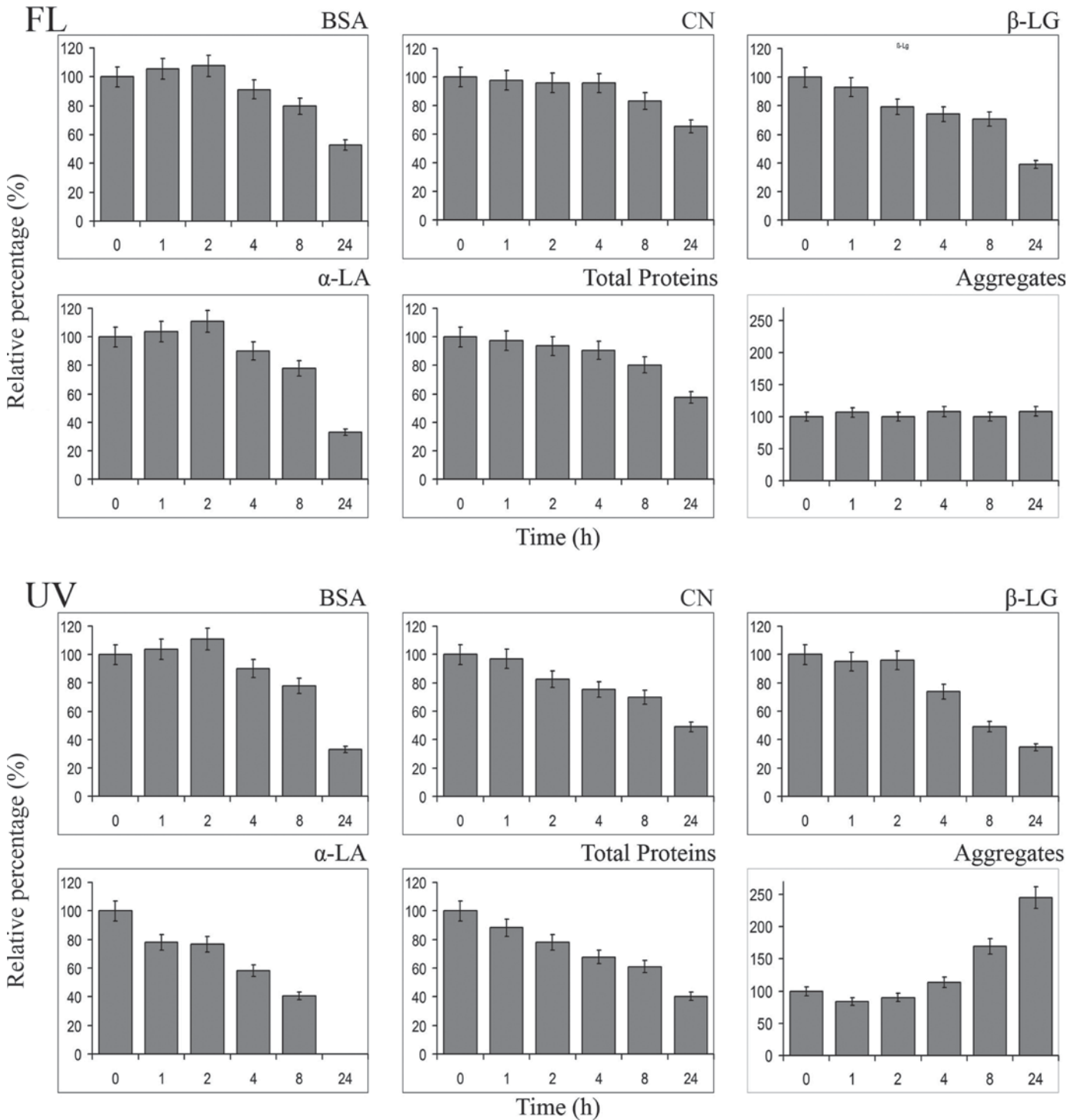


Figure 3. Kinetics of individual milk protein levels by (FL) fluorescent or UV photooxidation. Milk samples were exposed for the indicated time to light. Proteins were resolved and quantified by densitometry analysis of the SDS-PAGE. Results of statistical analyses were performed on the densitometric analysis of the digitalized gel images. Each band represents an average \pm SEM of 3 measurements of independent SDS-PAGE experiments. Results are expressed as the average percentage ratio of pixels of a band in relation to the corresponding ones of the band from the unexposed sample. Aggregates in whole milk (WM) exposed to different types of light were measured as a relative percentage of time zero, which was 100% (without light exposure), as a function of time. Data were taken from the densitometry analysis of the proteins retained in the stacking gel used in the SDS-PAGE with 2-mercaptoethanol.

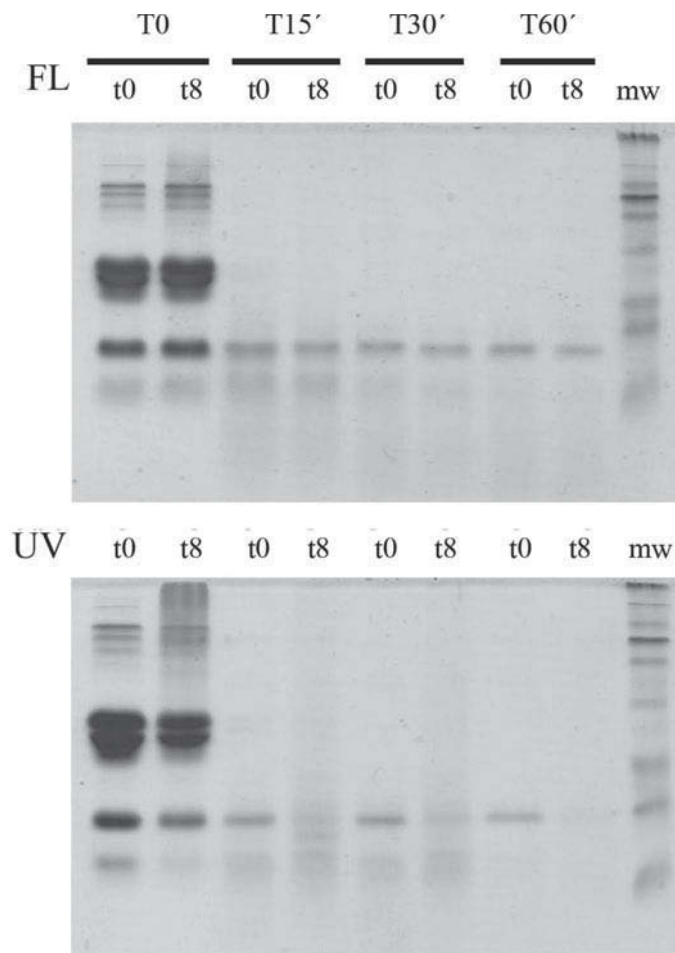


Figure 4. Effect of fluorescent (FL) or UV irradiation on pepsin digestion. Proteins of irradiated milk samples were extensively digested by pepsin. Proteins of digested milk samples were resolved by SDS-PAGE under reducing conditions. Samples were exposed to light for 0 h or 8 h (t0 or t8, respectively), and digested with pepsin for 0, 15, 30, or 60 min (T0, T15', T30', and T60', respectively).

Table 2 shows that the relationship between casein and whey protein increased after FL or UV irradiation. These data could be of immunological importance because the balance between caseins and whey proteins is thought to determine allergenicity (Lara-Villoslada et

al., 2005). Our results are not in agreement with those found when using isolated milk proteins subjected to FL irradiation because caseins are more labile toward oxidation than are the more compact globular whey proteins (Dalsgaard et al., 2007), but are in agreement with the concept that the behavior of isolated components is difficult to relate to that of the whole original mix (Mazzocchi, 2008).

It has been previously suggested that the accessibility of whey proteins to proteolytic enzymes depends on the extent of aggregation because the in vitro digestibility of total whey extracts proteins is progressively impaired as a function of the intensity of the heat treatment (Carbonaro et al., 1997, 1998). Aggregation of proteins suggests that proteolysis by digestive enzymes (pepsin and chymosin) could be hampered, thus reducing some functional properties of milk. Therefore, the final experiment was designed to evaluate pepsin digestion and clotting of WM after exposure to UV and FL.

Enzymatic Proteolysis of Milk Exposed to Different Types of Light

Proteins of milk subjected to pepsin digestion after being exposed to UV or fluorescence irradiation for 8 h were cleaved as easily as those in unexposed milk. After 15 min of enzymatic activity, the remaining undigested protein was less than 2% of the initial content (Figure 4).

Light exposure did not affect the partition of milk proteins in the curd: the retention of protein in the dried pellet obtained after chymosin incubation was similar to that of the unexposed sample (Figure 5). The small decrease in dry mass observed after 24 h of UV exposure could be related to proteolysis at this time ($100 \pm 2\%$ and $95 \pm 2\%$ for control and UV, respectively; $P < 0.03$). The increase in water retention in the curd of WM exposed to UV (Figure 5) could be due to hydrophobicity changes of casein molecules as observed in CN exposed to FL light (Dalsgaard et al., 2008) or aggregation of whey proteins subjected to thermal treatment (Carbonaro et al., 1998).

Table 2. Ratio of casein to whole whey protein after fluorescent (FL) or UV exposure¹

Light	Exposure time (h)			Significance ($P \leq$)	
	0	4	24	0–4 h	0–24 h
FL	2.1 ± 0.1	2.5 ± 0.2	3.3 ± 0.3	0.02	0.02
UV	2.2 ± 0.1	3.4 ± 0.3	5.5 ± 0.4	0.01	0.002

¹Milk samples were exposed in triplicate to FL or UV light for 0, 4, or 24 h. Milk proteins were resolved and quantified by densitometry analysis of SDS-PAGE under reducing conditions. Results are expressed as the average \pm SEM of the relationship: CN/(whey proteins). Individual bands were determined by the densitometric analysis of digitalized gel images using Image J software. Differences between FL and UV were significant after 4 h ($P \leq 0.02$) and 24 h ($P \leq 0.01$).

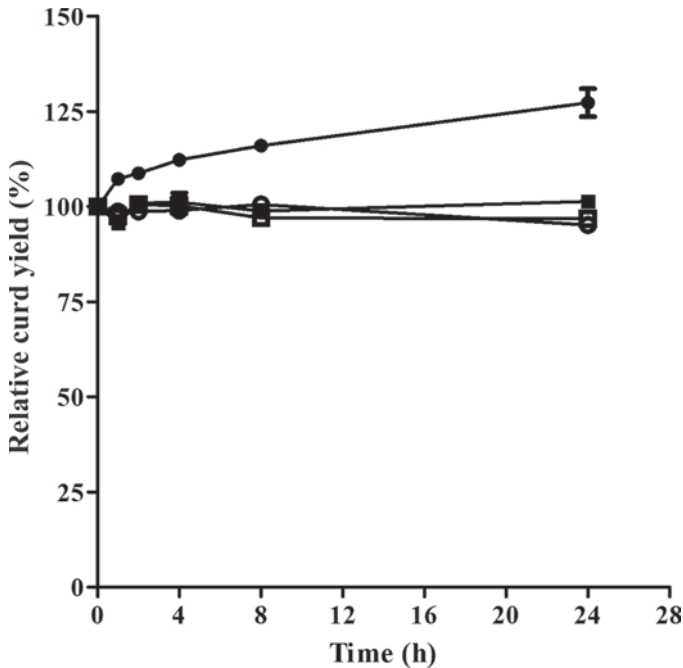


Figure 5. Effect of fluorescent (FL) or UV irradiation on milk-clotting capacity. ● and ■ = fresh curd yield from whole milk (WM) exposed to UV light and to FL light, respectively; ○ and □ = lyophilized yield from WM exposed to UV light and to FL light, respectively. Results were expressed as the percentage mean \pm SEM of triplicates, considering 100% the yield of the corresponding unexposed sample.

CONCLUSIONS

We report the protein oxidation of whole or skimmed reconstituted milk under irradiation with UV or FL light. All chemical parameters tested showed oxidative effects by both types of lights. One important finding was that the appearance of carbonyl moieties was detected as early as after 1 h of UV and 4 h of FL lighting, suggesting carbonyl analysis as a putative candidate for protein oxidation testing. Another relevant finding was that FL irradiation for a 4-h period produced several changes in addition to carbonyl formation, such as the appearance of dityrosine bonds and the alteration of whey to casein balance. The results of enzymatic proteolysis (pepsin and chymosin) suggest that the aggregation and cleavage of proteins produced by light exposure would not affect enzymatic proteolysis for cheese making. The latter finding is relevant for dairy industry, particularly for cheese manufacturers, because it is possible that milk could be exposed to fluorescent light for periods longer than 4 h from the time of milking until it reaches consumers. Our results are the first report of a detailed study of protein photooxidation in complete whole or skim milk, and they show that some of the features described for the isolated proteins are similar to what happens to total milk, but other distinctive reactions occurred only in the complex matrix.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Carlos Argaraña and José Carlos Prospero Romano for critical reading of the manuscript and María Rita Afonso for English correction. Grant support was from SeCyT, Universidad Nacional de Córdoba; Instituto de Investigación del Rectorado, Universidad Nacional de Villa María. DS is recipient of CONICET-MinCyT-Córdoba scholarship as a student of the doctoral career.

REFERENCES

- Anema, S. G. 2000. Effect of milk concentration on the irreversible thermal denaturation and disulfide aggregation of β -lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* 48:4168–4175.
- Artola, R. L., C. B. Conde, L. Bagatoli, R. P. Pecora, G. D. Fidelity, and S. C. Kivatinitz. 1997. High density lipoprotein from hypercholesterolemic animals has peroxidized lipids and oligomeric apolipoprotein A-I: Its putative role in atherogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239:570–574.
- Bosset, J. O., P. U. Gallmann, and R. Sieber. 1993. Influence de la translucidité de l'emballage sur la conservation du lait et des produits laitiers un article de revue. *Lait* 73:3–49.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
- Capeillère-Blandin, C., T. Delaveau, and B. Descamps-Latscha. 1991. Structural modifications of human β 2-microglobulin treated with oxygen-derived radicals. *Biochem. J.* 277:175–182.
- Carbonaro, M., F. Bonomi, S. Iametti, M. Cappelloni, and E. Carnovale. 1998. Aggregation of proteins in whey from raw and heat-processed milk: Formation of soluble macroaggregates and nutritional consequences. *Lebensm. Wiss. Technol.* 31:522–529.
- Carbonaro, M., M. Capelloni, S. Sabbadini, and E. Carnovale. 1997. Disulfide reactivity and in vitro protein digestibility of different thermal-treated milk samples and whey proteins. *J. Agric. Food Chem.* 45:95–100.
- Chen, W. L., M. T. Hwang, C. Y. Liau, J. C. Ho, K. C. Hong, and S. J. T. Mao. 2005. β -lactoglobulin is a thermal marker in processed milk as studied by electrophoresis and circular dichroic spectra. *J. Dairy Sci.* 88:1618–1630.
- Dalsgaard, T. K., C. W. Heegaard, and L. B. Larsen. 2008. Plasmin digestion of photo-oxidized milk proteins. *J. Dairy Sci.* 91:2175–2183.
- Dalsgaard, T. K., and L. B. Larsen. 2009. Effect of photo-oxidation of major milk proteins on protein structure and hydrolysis by chymosin. *Int. Dairy J.* 19:362–371.
- Dalsgaard, T. K., D. Otzen, J. H. Nielsen, and L. B. Larsen. 2007. Changes in Structure of Milk Proteins upon Photo-oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 55:10968–10976.
- Davies, M. J. 2003. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305:761–770.
- Dimick, P. S., and A. Kilara. 1983. Photo-oxidative changes in milk proteins and amino acids. Pages 289–299 in *Role of Milk Proteins in Human Nutrition*. W. Kaufmann, ed. The Mann Publ., Verlag, Gelsenkirchen-Buer, Germany.
- Dunkley, W. L., D. J. Frankel, and R. M. Pangborn. 1962. Effects of fluorescent light on flavor, ascorbic acid, and riboflavin in milk. *Food Technol.* 16:112–118.
- Fenaille, F., V. Parisod, P. Visani, S. Populaire, J.-C. Tabet, and P. A. Guy. 2006. Modifications of milk constituents during processing: A preliminary benchmarking study. *Int. Dairy J.* 16:728–739.
- Fukunaga, Y., Y. Katsuragi, T. Izumi, and F. Sakiyama. 1982. Fluorescence characteristics of kynurenine and N¹-formylkynurenine, their use as reporters of the environment of tryptophan 62 in hen egg-white lysozyme. *J. Biochem.* 92:129–141.

- Gilmore, T. M., and P. S. Dimick. 1979. Photochemical changes in major whey proteins of cow's milk. *J. Dairy Sci.* 62:189–194.
- Hallén, E., A. Lundén, T. Allmere, and A. André. 2010. Casein retention in curd and loss of casein into whey at chymosin-induced coagulation of milk. *J. Dairy Res.* 77:71–76.
- Hansen, E., and L. H. Skibsted. 2000. Light-induced oxidative changes in a model dairy spread. Wavelength dependence of quantum yields. *J. Agric. Food Chem.* 48:3090–3094.
- Havemose, M. S., M. R. Weisbjerg, W. L. P. Bredie, H. D. Poulsen, and J. H. Nielsen. 2006. Oxidative stability of milk influenced by fatty acids, antioxidants, and copper derived from feed. *J. Dairy Sci.* 89:1970–1980.
- Heinecke, J. W., W. Li, G. A. Francis, and J. A. Goldstein. 1993. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins. *J. Clin. Invest.* 91:2866–2872.
- Hill, R. J., and R. G. Wake. 1969. Amphiphile nature of K-casein as the basis for its micelle stabilizing property. *Nature* 221:635–639.
- Jovanovic, S., M. Barac, O. Macej, T. Vucic, and C. Lacnjevac. 2007. SDS-PAGE analysis of soluble proteins in reconstituted milk exposed to different heat treatments. *Sensors.* 7:371–383.
- Karagül-Yüceer, Y., M. A. Drake, and K. R. Cadwallader. 2004. Evaluation of the character impact odorants in skim milk powder by sensory studies on model mixtures. *J. Sens. Stud.* 19:1–14.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Lara-Villoslada, F., M. Olivares, and J. Xaus. 2005. The balance between caseins and whey proteins in cow's milk determines its allergenicity. *J. Dairy Sci.* 88:1654–1660.
- Levine, R. L., D. Garland, C. N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A.-G. Lenz, B.-W. Ahn, S. Shattiel, and E. R. Stadtman. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186:464–478.
- Marsili, R. T. 1999. Comparison of solid phase micro-extraction and dynamic headspace method for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of light-induced lipid oxidation products in milk. *J. Chromatogr. Sci.* 37:17–23.
- Mazzocchi, F. 2008. Complexity in biology. Exceeding the limits of reductionism and determinism using complexity theory. *EMBO Rep.* 9:10–14.
- Melilli, C., J. M. Lynch, S. Carpino, D. M. Barbano, G. Licitra, and A. Cappa. 2002. An empirical method for prediction of cheese yield. *J. Dairy Sci.* 85:2699–2704.
- Mortensen, G., G. Bertelsen, B. K. Mortensen, and H. Stapelfeldt. 2004. Light-induced changes in packaged cheeses—A review. *Int. Dairy J.* 14:85–102.
- Nabhan, M. A., J. M. Girardet, S. Campagna, J. L. Gaillard, and Y. Le Roux. 2004. Isolation and characterization of copolymers of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, κ -casein, and α_{S1} -casein generated by pressurization and thermal treatment of raw milk. *J. Dairy Sci.* 87:3614–3622.
- Roefs, S. P. F. M., and K. G. de Kruif. 1994. A model for the denaturation and aggregation of β -lactoglobulin. *Eur. J. Biochem.* 226:883–889.
- Rosenthal, I. 1992. Ultraviolet-visible radiation. Pages 54–104 in *Electromagnetic Radiations in Food Science*. Ed. Advanced Series in Agricultural Sciences; Vol. 19. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Sandmeier, D. 1996. Brought into the light. Changes in foods under the influence of light. *Lebensmitteltechnik* 28:41–45.
- Scaloni, A., V. Perillo, P. Franco, E. Fedele, R. Froio, L. Ferrara, and P. Bergamo. 2002. Characterization of heat-induced lactosylation products in caseins by immunoenzymatic and mass spectrometric methodologies. *Biochim. Biophys. Acta* 1598:30–39.
- Singh, H., M. S. Roberts, P. A. Munro, and C. T. Teo. 1996. Acid-induced dissociation of casein micelles in milk: Effect of heat treatment. *J. Dairy Sci.* 79:1340–1346.
- Vasbinder, A. J., A. C. Alting, and K. G. De Kruif. 2003. Quantification of heat-induced casein-whey protein interactions in milk and its relation to gelation kinetics. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 31:115–123.
- Vasbinder, A. J., P. J. J. M. van Mil, A. Bot, and C. G. de Kruif. 2001. Acid-induced gelation of heat-treated milk studied by diffusing wave spectroscopy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 21:245–250.
- Viljanen, K., P. Kylli, E. M. Hubbermann, K. Schwarz, and M. Heinonen. 2005. Anthocyanin antioxidant activity and partition behavior in whey protein emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 53:2022–2027.
- Wetlaufer, D. B. 1962. Ultraviolet spectra of proteins and aminoacids. *Adv. Protein Chem.* 17:303–390.
- White, C. H., and M. Bulthaus. 1982. Light activated flavor in milk. *J. Dairy Sci.* 65:489–494.
- Wishner, L. A. 1964. Light induced oxidations in milk. *J. Dairy Sci.* 47:216–222.



Evaluation of milk powder quality by protein oxidative modifications¹

Dana Scheidegger,* Paola M. Radici,* Víctor A. Vergara-Roig,† Noelia S. Bosio,* Silvia F. Pesce,‡
Rolando P. Pecora,§# José C. P. Romano,# and Silvia C. Kivatinitz*²

*Departamento de Química Biológica (CIQUIBIC), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina [AU1: Provide postal code.]

†Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Catamarca, 4700 San Fernando del Valle de Catamarca, Catamarca, Argentina

‡Centro de Química Aplicada (CEQUIMAP), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina

§Departamento de Química Industrial y Aplicada, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina

#Instituto A. P. de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Nacional de Villa María, Villa María, Córdoba, Argentina

[AU2: Provide postal code.]

ABSTRACT

The objective of the present research was to evaluate commercially available milk powders according to their protein oxidative modifications and antioxidant capacity, and to evaluate if these characteristics are related to physical quality parameters such as dispersibility or stability during storage. Fifteen commercially processed spray-dried milk powders were evaluated: 6 whole milk powders (WMP), 4 skim milk powders (SMP), and 5 infant formula powders (IFP). Protein oxidative status was measured as protein carbonyl (PC) content, dityrosine content, and extent of protein polymerization. The level of PC was slightly lower in SMP than in WMP, whereas IFP had more than twice as much PC as WMP (2.8 ± 0.4 , 2.1 ± 0.2 , and 6.5 ± 1.3 nmol/mg of protein for WMP, SMP, and IFP, respectively). No differences were detected in dityrosine accumulation. Although all the possible pairs of parameters were tested for correlations, we found that 4 parameters were linked: PC, whey content, protein aggregate level, and dispersibility. After 9 mo of storage at -20°C or room temperature, all milk samples were analyzed to evaluate changes in protein oxidative status (PC, dityrosine, and protein integrity) and related parameters. Compared with the initial condition, PC increased in all tested samples after 9 mo of storage at -20°C or at room temperature. Stored milk powders had increased PC and decreased dispersibility compared with prestorage levels. Our results highlight the importance of protein oxidative status in milk powder and its relationship to

other related quality parameters, such as protein integrity and dispersibility. Our findings suggest that the understanding of such relationships could contribute to develop quality differentiation between different types of milk powders [AU3: What does this last statement mean?].

Key words: milk protein, protein oxidation, milk powder, infant formula

INTRODUCTION

Milk off-flavor has often been attributed to lipid oxidation (Biolatto et al., 2007; Lloyd et al., 2009) or to the Maillard reaction with consequent advanced glycation end products (Birlouez-Aragon et al., 2004). However, proteins, peptides, and amino acids are also susceptible to oxidative changes caused by free radicals that are manifested to a greater or lesser degree in different types of milk, depending on the quantity and type of lipids, prooxidants, antioxidants, and storage conditions (Davies, 2005; Fenaille et al., 2006; Scheidegger et al., 2010). Milk protein solubility in water could be closely related to oxidative status because oxidation enhances protein interactions and aggregation (Scheidegger et al., 2010), which lessen milk powder solubility (Thomas et al., 2004). Oligomerization and proteolysis were found in thermal treated milk (Carbonaro et al., 1998; Jovanovic et al., 2007) and UV-irradiated dairy powders (Scheidegger et al., 2010). Milk powder quality parameters are mostly related to solubility (e.g., wet-tability, dispersibility, and undissolved particles). These parameters are closely related to manufacturing process and storage conditions. Dairy powders are subject to oxidation during manufacturing because of the high temperatures used (Stapelfeldt et al., 1997), and spray-drying technology can induce changes in proteins that influence hydrophobicity, solubility, and denaturation

Received May 26, 2012.

Accepted February 4, 2013.

¹In commemoration of the 50th anniversary of the Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

²Corresponding author: skivatinitz@gmail.com

(Singh and Creamer, 1991; Kalapathy et al., 1997; Kurozawa et al., 2009). In the case of infant formula powder (IFP), relationships between the oxidative status of proteins and quality parameters are more difficult to predict because IFP are prepared by mixing milk, whey proteins (that have been subjected to different thermal treatments and dehydration procedures), lipids, and (sometimes) nucleotides (Fenaille et al., 2006).

The changes that occur during storage of milk powders include protein polymerization and a decrease in solubility, with temperature and relative humidity being the predominant factors involved (Stapelfeldt et al., 1997; Gaiani et al., 2007).

The literature is sparse regarding protein oxidative alterations in milk, and the oxidative status of proteins from milk powder has not been reported because oxidative modifications have been mainly focused on lipids. For example, antioxidants used in milk powders have been evaluated for their capacity to inhibit peroxidation and prevent off-flavor development (Romeu-Nadal et al., 2007; Matumoto-Pintro et al., 2011) but not on protein oxidative modifications such as protein carbonyl (PC) or dityrosine bond formation.

Protein carbonyl [AU4: Protein carbonyl formation?] is a consequence of the oxidation of some AA residues (mainly lysine, arginine, and proline residues), and PC can be produced via oxidative cleavage of the peptide backbone via the α -amidation pathway or cleavage associated with the oxidation of glutamyl residues (Stadtman and Levine, 2000). Carbonyl derivatives can also be formed as a consequence of secondary reactions of some AA side chains with lipid oxidation products, such as 4-hydroxy-2-nonenal (Stadtman and Levine, 2000). The formation of PC is highly indicative of milk protein oxidation (Fenaille et al., 2006). Moreover, it has been shown that PC and dityrosine levels increase as a consequence of thermal treatments or photo-oxidation in milk samples exposed to UV or fluorescent light (Scaloni et al., 2002; Scheidegger et al., 2010), whereas isolated milk proteins show significant variability in sensitivity to photo-oxidation (Dalsgaard et al., 2007).

The goal of this study was to test the relationships between protein oxidative modifications and antioxidant capacity with physical quality parameters of milk powders such as dispersibility or stability during storage. The understanding of such relationships could contribute to develop quality differentiation between different types of milk powders.

MATERIALS AND METHODS

Guanidine hydrochloride (ultrapure) was obtained from Genbiotech (Buenos Aires, Argentina). Trichloro-

acetic acid, glacial acetic acid, gallic acid, ethyl acetate, ethyl alcohol, and hydrochloric acid were purchased from Cicarelli (Buenos Aires, Argentina). Acrylamide, 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). *N,N'*-Methylenebis-acrylamide and acrylamide were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). All products were of analytical grade.

Dairy Powders

Fifteen commercially processed spray-dried milk and formula powders were studied. Milks were purchased from SanCor Cooperativas Unidas Limitada (Sunchales, Argentina), La Serenísima Mastellone Hermanos S.A. (General Rodríguez, Argentina), Nestlé Argentina S.A. (Villa Nueva, Argentina), and La Sibila (Nogoyá, Argentina). Table 1 shows the physicochemical characteristics of the individual samples. Fat content was determined by the Rose-Gottlieb method (AOAC International, XXXX[AU5: Here and below, please add the appropriate AOAC publication to the Refs list and add year here]; method 989.05), protein content by the Kjeldahl method (AOAC International, XXXX; method 930.29), moisture by drying at 100°C for 2 h according to AOAC International (XXXX; method 931.04), and wettability and dispersibility according to FIL Standard (FIL-IDF 87:1979[AU6: Add FIL-IDF publication to the Refs list]). Milk powders samples were stored at 24°C (warm storage, WS) or -20°C (cold storage, CS) for 9 mo in the dark.

Color Measurement

Evaluation of color was carried out using a spectrophotometer (model CM 600d, Konica Minolta, Tokyo, Japan) according to the CIE Lab Scale. For each sample, L (brightness), a (- green to + red component) and b (- blue to + yellow component) parameters were measured for all samples. The instrumental settings were a D65 artificial daylight (10° standard angle). Each reported color value was the mean of 3 determinations at 25°C.

Protein UV-Visible Spectral Analyses

Proteins from reconstituted milk (1 mg of protein) were precipitated with 10% (wt/vol) TCA (final concentration) and recovered by centrifugation for 5 min at $7,500 \times g$ (Micromax RF centrifuge, International Equipment Company, Needham, MA). Protein pellets were washed 3 times with 1 mL of ethanol:ethyl acetate 50:50 (vol/vol), and redissolved in 1 mL of 6

Table 1. Composition and quality parameters¹[AU18: What is %p/p (unit)?]

Item ²	Sample						Mean ± SD
	1	2	3	4	5	6	
Whole milk powder							
Fat (%p/p)	23 ± 1	24 ± 1	25 ± 1	25 ± 1	25 ± 1	25 ± 1	25 ± 0.8
Protein (%p/p)	27 ± 1	29 ± 1	28 ± 1	25 ± 1	26 ± 1	27 ± 1	27 ± 1
Humidity (%p/p)	2.7 ± 0.1	2.4 ± 0.1	3.2 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.3 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.4
WP (%)	33 ± 2	34 ± 2	31 ± 2	33 ± 2	34 ± 2	35 ± 2	33.6 ± 0.5
Dispersibility (%p/p)	89 ± 3	91 ± 3	90 ± 3	95 ± 4	85 ± 3	88 ± 4	90 ± 3
Color (b)	17.1 ± 0.4	19 ± 1	18 ± 1	19 ± 1	19 ± 1	17 ± 1	18.2 ± 0.7
Aggregates (%)	2.3 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.3 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.0 ± 0.4
Oligomers (%)	2.0 ± 0.1	2.9 ± 0.1	2.7 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.4 ± 0.1	2 ± 1
PC (nmol/mg of protein)	2.7 ± 0.2	3.5 ± 0.3	2.3 ± 0.2	2.7 ± 0.2	2.8 ± 0.2	3.0 ± 0.3	2.8 ± 0.4
Dityrosine (AFU/mg of protein)	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1
Polyphenols (mg/L)	9 ± 1	8.1 ± 0.2	8.7 ± 0.3	9.8 ± 0.5	7.7 ± 0.3	8.8 ± 0.9	8.6 ± 0.7
Inhibition of DPPH (%)	82 ± 4	77 ± 3	73 ± 3	94 ± 9	97 ± 9	99 ± 3	87 ± 11
Skim milk powder							
Fat (%p/p)	1.00 ± 0.04	1.10 ± 0.04	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04			1.1 ± 0.1
Protein (%p/p)	37 ± 1	35 ± 1	33 ± 1	37 ± 1			35.8 ± 1.8
Humidity (%p/p)	3.7 ± 0.1	4.8 ± 0.2	3.3 ± 0.1	3.2 ± 0.1			3.8 ± 0.7
WP (%)	38.0 ± 2.7	36.3 ± 2.5	36.9 ± 2.6	36.7 ± 2.6			37.0 ± 0.7
Dispersibility (%p/p)	90 ± 4	84 ± 3	85 ± 3	90 ± 4			87 ± 3
Color (b)	17.6 ± 1.5	18.9 ± 0.5	17.9 ± 1.3	17.6 ± 0.5			18.0 ± 0.6
Aggregates (%)	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.2 ± 0.1			1.9 ± 0.5
Oligomers (%)	1.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.6 ± 0.1	2.1 ± 0.1			1.7 ± 0.4
PC (nmol/mg of protein)	2.0 ± 0.1	2.3 ± 0.2	2.10 ± 0.2	1.8 ± 0.1			2.1 ± 0.2
Dityrosine (AFU/mg of protein)	1.0 ± 0.1	0.84 ± 0.08	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1			1.0 ± 0.1
Polyphenols (mg/L)	8.6 ± 0.5	7.1 ± 0.3	7.3 ± 0.6	6.6 ± 0.2			7.4 ± 0.9
Inhibition of DPPH (%)	108 ± 3	104 ± 4	102 ± 4	114 ± 5			107 ± 5
Infant formula powder							
Fat (%p/p)	18.2 ± 0.7	22.1 ± 0.9	20.3 ± 0.8	17.8 ± 0.7	19.6 ± 0.8		19.6 ± 2.0
Protein (%p/p)	21.3 ± 0.9	18.2 ± 0.7	19.3 ± 0.8	16.6 ± 0.7	14.3 ± 0.6		18.9 ± 2.0
Humidity (%p/p)	3.6 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.8 ± 0.1		2.6 ± 0.7
WP (%)	42.7 ± 2.9	36.6 ± 2.6	37.8 ± 2.6	48.1 ± 3.4	53.4 ± 3.7		44 ± 4
Dispersibility (%p/p)	83 ± 3	74 ± 3	82 ± 3	83 ± 3	74 ± 3		80.7 ± 4.5
Color (b)	17.0 ± 1.0	17.8 ± 1.7	20.0 ± 0.8	16.3 ± 0.8	15.0 ± 1.2		17.8 ± 1.6
Aggregates (%)	3.7 ± 0.4	3.7 ± 0.4	4.1 ± 0.4	3.5 ± 0.4	6.2 ± 0.5		4.2 ± 1.1
Oligomers (%)	2.2 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.4 ± 0.1	1.8 ± 0.1		2.0 ± 0.3
PC (nmol/mg of protein)	7.7 ± 0.4	6.2 ± 0.3	4.9 ± 0.4	7.3 ± 0.4	8.4 ± 0.3		6.5 ± 1.3
Dityrosine (AFU/mg of protein)	1.4 ± 0.1	0.81 ± 0.06	0.88 ± 0.05	1.00 ± 0.09	1.11 ± 0.08		1.0 ± 0.3
Polyphenols (mg/L)	10.5 ± 0.9	10.4 ± 1.0	7.9 ± 0.3	11.7 ± 1.3	8.8 ± 0.6		9.9 ± 1.5
Inhibition of DPPH (%)	139 ± 9	58.3 ± 1.5	100 ± 8	158 ± 2	85 ± 3		19.6 ± 2.0

¹Fifteen commercially processed spray-dried milk powders were studied: 6 whole milk, 4 skim milk, and 5 infant formula powder samples. Each determination was carried out in quadruplicate, and significant differences were analyzed by a paired *t*-test.

²WP = whey protein; PC = protein carbonyl; AFU = arbitrary fluorescence units; DPPH = 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

M guanidine hydrochloride, pH 7. Spectral data were obtained (200–600 nm) using a Mini Spec UV-visible spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). The ratio of whey protein to total milk protein was calculated using the UV fourth-derivative absorption spectroscopy method (Lüthi-Peng and Puhon, 1999).

Determination of PC

The procedure was adapted from previously reported methods (Levine et al., 1990; Fenaille et al., 2006). An aliquot of aqueous milk solution (1 mg of protein) was incubated with 10 mM DNPH in 2 M HCl (1 mL volume), for 30 min at room temperature[AU7: Please specify actual temperature]. Milk proteins were pre-

cipitated with 10% (wt/vol) TCA (final concentration) and recovered by centrifugation for 5 min at 7,500 × *g* (Micromax RF centrifuge, International Equipment Company). Protein pellets were washed 3 times with 1 mL of ethanol:ethyl acetate 50:50 (vol/vol) to remove free DNPH reagent and redissolved in 1 mL of 6 M guanidine hydrochloride, pH 2.3. Protein carbonyls were determined by UV spectrophotometry[AU8: What is epsilon?] ($\epsilon_{370 \text{ nm}} = 2.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), with a Mini Spec UV-vis spectrophotometer (Shimadzu). Results were expressed as nanomoles of carbonyl per milligram of protein. Each determination was carried out in quadruplicate.

Dityrosine Quantification

Protein (1 mg) from reconstituted milk was precipitated with 10% (wt/vol) TCA (final concentration) and recovered by centrifugation for 5 min at $7,500 \times g$ (Micromax RF centrifuge, International Equipment Company). Protein pellets were redissolved in 1 mL of 6 M guanidine hydrochloride pH 7. Protein solutions were analyzed for the presence of dityrosine by fluorometry, and measurements were made using an SLM 4800C fluorometer (SLM/Aminco, American Instrument Company, Urbana, IL) equipped with a xenon-arc lamp using an 8-nm bandwidth. Formation of dityrosine was monitored by the increase in fluorescence using excitation and emission wavelengths of 315 and 410 nm, respectively, as reported previously (Scheidegger et al., 2010). Dityrosine has a characteristic emission spectrum of authentic standard with a maximum at 410 nm (Capeillere-Blandin et al., 1991). Dityrosine was calculated from the ratio of emission intensities 410 nm and 350 nm, and expressed as arbitrary fluorescence units. Each determination was carried out in quadruplicate.

Total Phenolic Content

Total phenolic content of milk samples was determined according to Folin-Ciocalteu spectrophotometric method (Singleton and Rossi, 1965) with some modifications. Milk samples (0.015 mL) were diluted to 2.5 mL with deionized water and mixed with 0.100 mL of 1 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent and allowed to react for 8 min. Then, 0.100 mL of 20% (wt/vol) Na_2CO_3 solution was added. After incubation for 75 min, samples were centrifuged for 30 min at $10,000 \times g$ [AU9: Temperature of incubation and centrifugation?]. The supernatants were transferred into a 1.5-mL cuvette (1-cm path length), and absorbance at 765 nm was determined using a Mini Spec UV-vis spectrophotometer (Shimadzu). Extract concentrations were calculated using a gallic acid standard curve, equivalents were read off the straight line generated by linear regression, and the total phenolic content was expressed as milligrams of gallic acid equivalents per 1,000 mL of sample. The experiment was carried out in triplicate.

DPPH Radical Scavenging Capacity

The capacity to scavenge the free radical DPPH was monitored according to a previously described method (Shimada et al., 1992). Milk powder samples were prepared at different concentrations with deionized water, and 0.070 mL of sample was added to 0.750 mL of 6×10^{-4} M ethanolic solution of DPPH. The absorbance at 492 nm was measured in a multiwell plate using an

RT-2100C microplate reader (Rayto, Shenzhen, China) after the solution had been allowed to stand in the dark for 30 min at room temperature (24°C). The standard curve was made with 9 concentrations of gallic acid. Each sample was assessed in triplicate. Radical scavenging activity was expressed as the inhibition percentage of free radical by the sample and was calculated as $[1 - (\text{test sample absorbance}/\text{blank sample absorbance})] \times 100$ (Barros et al., 2007).

Protein Polymerization and Proteolysis

Polymerization and proteolysis were evaluated by PAGE under reducing conditions; SDS-PAGE was performed according to the established method for milk proteins (Jovanovic et al., 2007), using a 3% polyacrylamide stacking gel and a 15% separating gel. Before electrophoresis, milk samples were diluted 25 times in distilled deionized water, mixed with Laemmli sample buffer containing 2.5% β -mercaptoethanol, and boiled for 5 min (Laemmli, 1970). The vertical electrophoresis unit Mini-Protean III system (BioRad Corp., Richmond, CA) was used in conjunction with the Bio-Rad Power PAC 3000 power supply. The gel was stained with 0.25% Coomassie Blue R-250 for 90 min, and destained in the methanol:acetic acid solution. Destained gels were scanned (Epson Stylus TX115 scanner, Capital Federal, Argentina) and quantified by densitometry analysis using the free software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Statistical Analyses

Data points were the mean \pm standard deviations of 3 separate experiments, each with triplicate determinations. Differences were tested by 2-tailed *t*-test. Correlation analysis was carried out by the least-squares method. Data were analyzed using the Stat Plus software (Berk Carey, Pacific Grove, CA).

RESULTS AND DISCUSSION

Composition and Quality Parameters

The composition and physical properties of each sample of milk powder are shown in Table 1. The fat, protein, and moisture contents were as expected from the manufacturers' labels and were within the standard range.

Two methods were used to quantify the ratio of whey protein (WP) in total protein: SDS-PAGE and UV fourth-derivative absorption spectroscopy. The ratio of whey to total protein for whole milk powder (WMP) was $33.6 \pm 0.5\%$, for skim milk powder (SMP) was

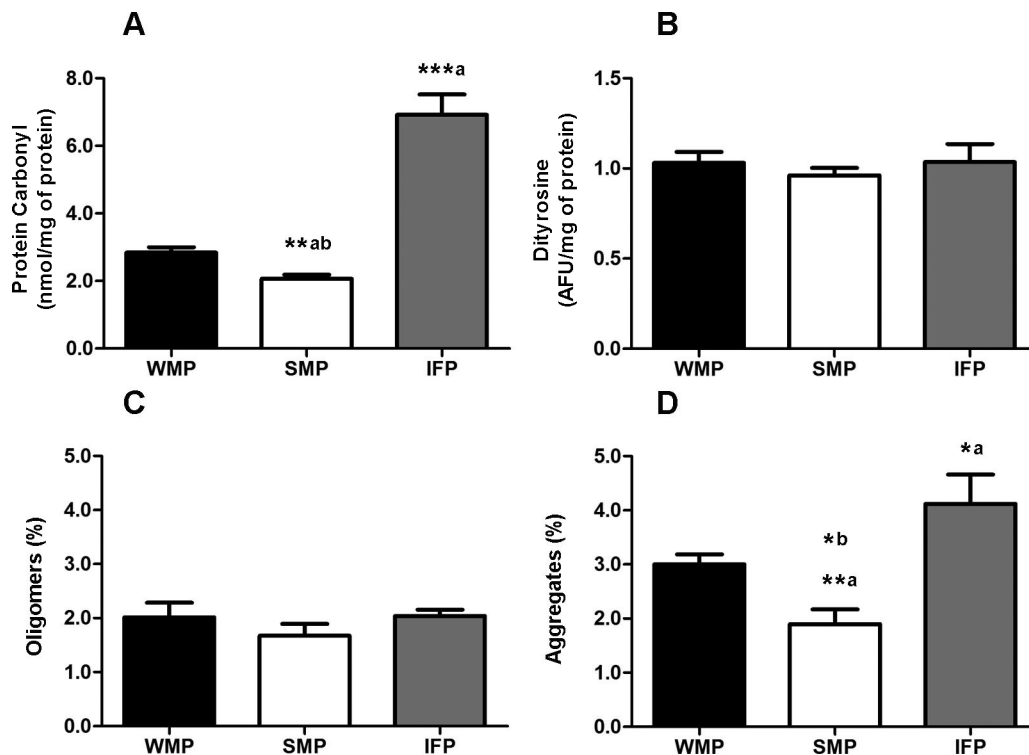


Figure 1. Protein oxidative status of whole (WMP, $n = 6$), skim (SMP, $n = 4$), and infant formula (IFP, $n = 5$) milk powders: (A) protein carbonyls, (B) dityrosine, (C) protein oligomers, and (D) protein aggregates. Protein carbonyl levels were determined by the colorimetric method of Levine et al. (1990); results were expressed as nanomoles of protein carbonyl per milligram of protein. Dityrosine was determined by fluorescence spectroscopy; results were expressed as arbitrary fluorescence units (AFU) and normalized by protein content. Protein oligomer and aggregate contents were obtained from the densitometry analysis of the SDS-PAGE under reducing conditions; oligomers (molecular weights between 80 and 175 kDa) and aggregates (protein that did not penetrate in the staining gel) were expressed as a percentage of total protein. Analysis of variance and a *t*-test were used to determine the differences between groups: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; ^aSMP or IFP versus WMP; ^bIFP versus SMP. Each determination was carried out in quadruplicate.

$37.0 \pm 0.7\%$ (WMP vs. SMP; $P < 0.002$), and for IFP was $44 \pm 4\%$ (WMP vs. IFP; $P < 0.007$), as determined by the UV fourth-derivative absorption spectroscopy method. These data correlated well with those obtained with SDS-PAGE ($P < 0.002$; data not shown). This observation is concordant with the fact that different dairy powder formulas have added whey protein in different proportions.

Dispersibility was significantly lower ($P < 0.0025$) for IFP than for WMP or SMP (80.7 ± 4.5 , 90 ± 3 , and 87 ± 3 , respectively; $P < 0.03$ for IFP vs. WMP and IFP vs. SMP). No difference in color could be detected.

Protein Oxidative Status

Protein oxidative status was measured as contents of PC and dityrosine and extent of protein polymerization. Significant differences were found in the PC content for the 3 types of milk powders. The level of PC (Table 1, Figure 1A) was slightly lower in SMP than in WMP, whereas IFP had more than twice as much PC as WMP (2.8 ± 0.4 , 2.1 ± 0.2 , and 6.5 ± 1.3 nmol/

mg of protein for WMP, SMP, and IFP, respectively; $P \leq 0.009$ for SMP vs. WMP; $P \leq 0.0001$ for IFP vs. WMP). No differences between the 3 milk powder types were detected when oxidation was measured as accumulation of dityrosine (Table 1, Figure 1B).

The elevated PC levels of the IFP group were in line with previous findings. For example, higher carbonyl values for IFP than for liquid milk samples had been reported (Fenaille et al., 2006). In raw and thermal-treated milk, protein-bound carbonyl content correlates positively with the severity of the heat treatment (Scaloni et al., 2002), so higher levels of PC in IFP could indicate stronger thermal conditions for IFP processing compared with that used for WMP or SMP. Differences in PC without dityrosine formation have been observed in other dairy products evaluated for oxidative damage. When Mozzarella cheese was evaluated for oxidative damage variation, PC content was altered without an observed alteration in dityrosine (Balestrieri et al., 2002).

The extent of protein polymerization was analyzed by SDS-PAGE. The levels of aggregates and oligomers

were evaluated in the 3 types of powders (Figure 1C and 1D). The formation of oligomers (molecular weight >80 and <175 kDa) was also evaluated. The SMP samples showed the lowest content of oligomers ($1.7 \pm 0.4\%$) although the difference was not significant (Table 1, Figure 1C). The percentage of aggregates (protein that did not enter in the stacking gel) was significantly different between all the groups ($P \leq 0.05$; Table 1, Figure 1D).

Antioxidant Capacity

Two conventional methods for determining the antioxidant activity of foods are measurements of phenolic content and radical scavenging activity. The presence of polyphenols in milk depends on the diet of the animal and may have a bioactive effect on milk component conservation (Besle et al., 2010). The radical scavenging activity of milk has been related to total lipid content, polyphenol levels, and caseins and whey proteins (Zivkovic et al., 2009; Zulueta et al., 2009).

The evaluation of polyphenols showed that great variability existed between the levels determined for each group (Table 1, Figure 2 A and B). The SMP had a lower content of polyphenol than the WMP or IFP (SMP vs. WMP, $P \leq 0.04$; SMP vs. IFP, $P \leq 0.03$).

Radical scavenging capacity was significantly different for WMP compared with the blank (87 ± 11 vs. $100 \pm 5\%$; $P \leq 0.04$). The SMP had no radical scavenging capacity, as measured by the DPPH procedure. The IFP samples also displayed no radical scavenging ca-

capacity when analyzed as a group, as a result of great variability of individual samples. These results did not indicate a relationship between polyphenol content and radical scavenging capacity of MP.

Relationships of Protein Oxidation and Antioxidant Capacity with Composition and Quality Parameters

Multiple correlation analyses were used to determine if parameters were associated. When all possible pairs of variables were tested for correlations, we found that 4 were correlated: PC, WP, aggregates, and dispersibility (Table 2). The best correlations were found for PC with WP and for WP with dispersibility. It is interesting to note that these correlations comprised all 15 samples, so we could hypothesize that the PC content and dispersibility were governed by the content of WP, independently of the type of milk powder considered. This finding is in line with other reports because milk WP are known to be more susceptible to oxidative modifications than caseins, particularly β -lactoglobulin (Singh and Creamer, 1991; Scheidegger et al., 2010). Consequently, samples of milk powder with higher proportions of WP would display higher values of PC. The direct correlation between WP content and total carbonyl content ($P < 0.002$, Table 2), suggests that, on a total protein basis, WP were contributing to total carbonyl level more than casein. Support for this presumption is given by the higher content of whey proteins in IFP than in WMP and SMP (Table 1).

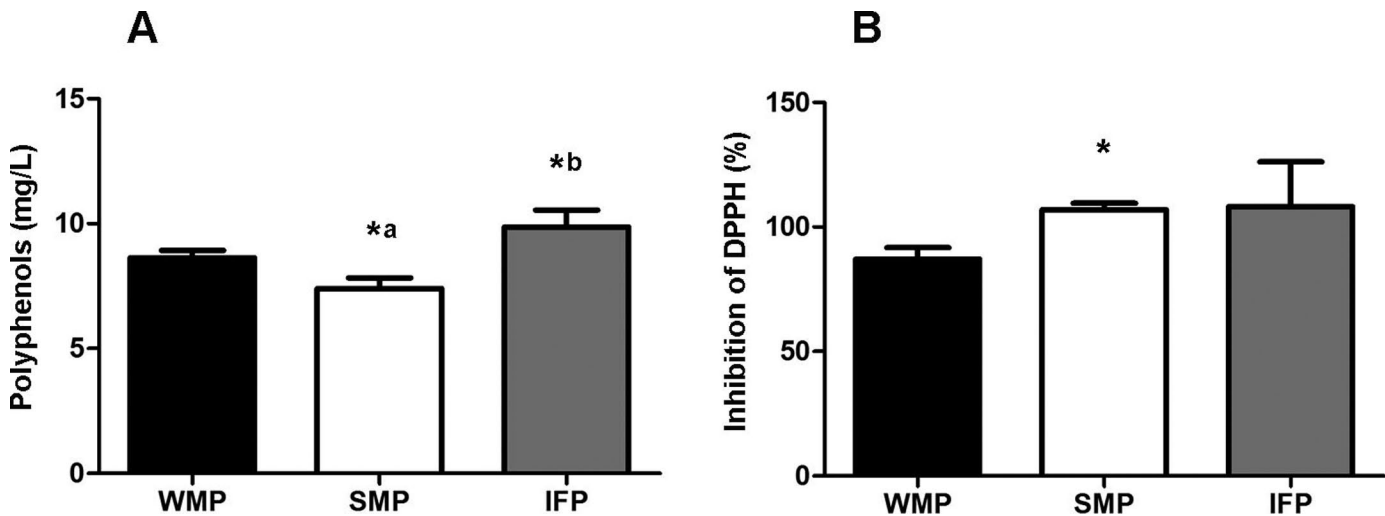


Figure 2. Antioxidant capacity of whole (WMP, $n = 6$), skim (SMP, $n = 4$), and infant formula (IFP, $n = 5$) milk powders: (A) polyphenol content, and (B) radical scavenging capacity. Polyphenols were determined by a colorimetric technique and expressed as milligrams of gallic acid equivalents per 1,000 mL of sample. Radical scavenging capacity was measured as the percentage inhibition of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical formation (values higher than 100% indicate pro-oxidant activity). Analysis of variance and a *t*-test were used to determine the differences between groups: * $P < 0.05$, ^aSMP or IFP versus WMP; ^bIFP versus SMP. Each determination was carried out in quadruplicate.

Table 2. Relationships of protein oxidation and antioxidant capacity with composition and quality parameters

Item ¹	Statistical parameter ²				
	a	b	P-value	r	n
PC vs. WP	2.1 ± 0.4	29 ± 2	0.0002	0.59	15
PC vs. aggregates	0.4 ± 0.1	1.6 ± 0.4	0.002	0.73	15
PC vs. dispersibility	-1.9 ± 0.5	93 ± 2	0.002	-0.71	15
PC vs. polyphenols	0.4 ± 0.1	7.1 ± 0.5	0.003	0.71	15
WP vs. aggregates	3.0 ± 1.1	28 ± 4	0.020	-0.61	15
WP vs. dispersibility	-0.6 ± 0.2	110 ± 8	0.0010	-0.64	15
WP vs. color (b)	-0.15 ± 0.04	23 ± 1	0.002	-0.74	15
Aggregates vs. dispersibility	-3.1 ± 1.1	95 ± 4	0.016	-0.74	15

¹PC = protein carbonyl; WP = whey protein.

²a = slope, b = y-coordinate axis interception (y-intercept when x = 0.0), n = number of samples.

The level of aggregates in the samples was negatively correlated with dispersibility ($P = 0.016$, $r = -0.74$; Table 2). The reconstitution rate of milk powders depends on the succession of different steps: wettability, sinkability, dispersibility, and finally, solubility (Murrieta-Pazos et al., 2011). The presence of denatured proteins is detrimental to wettability (Millqvist-Fureby et al., 2001; Sliwinski et al., 2003); therefore, the finding that milk powders with higher contents of PC, aggregates, and WP were more difficult to disperse could indicate higher levels of denatured protein.

We also observed a significant correlation for PC as a function of total polyphenol content ($P < 0.003$, $r = 0.71$; Table 2). Polyphenolic compounds have powerful antioxidant effects in vitro in many test systems, but can act as pro-oxidants in others (Halliwell, 2007). It has been reported that tea catechins contribute to the formation of protein carbonyl in human serum albumin (Ishii et al., 2010). The relationship between polyphenol content and carbonyl content of milk proteins has not been addressed yet, although the direct correlation between protein carbonyl content and the polyphenol content in milk powders [AU10: In the current study?] suggests that mechanisms similar to those operating in the case of human serum albumin and polyphenols could be operating. Also, there are no reports in the literature that relate radical scavenging activity and polyphenol content, probably because this relationship is null, as we found in the current analysis. In an extensive study with edible plants, the relationship between phenolic content and radical scavenging activity was found in only some species (Wojdylo et al., 2007 [AU11: Add to Refs]). Those authors concluded that the correlation was found only when phenolic compounds were the major contributors to antioxidant capacity. Milk contains several antioxidant factors: naturally occurring vitamins (i.e., E and C), β -carotene, enzymatic systems, serum albumin, and lactoferrin, which act as chelating agents, an iron-binding glycoprotein,

as well as free radical scavenging activity by amino acids [AU12: Please check this list. Where does the list of several antioxidant factors end? Some seem to be factors (substances), whereas others are processes?], such as tyrosine and cysteine (Pihlanto, 2006); thus, polyphenolics may not be the main contributors to antioxidant capacity.

Finally, the negative correlation [AU13: Positive correlation noted here?] between color (b) and WP ($P < 0.002$, $r = 0.74$; Table 2) could be due to the higher content of late-stage Maillard products in milk powders with lower WP content (Thomsen et al., 2005).

Effect of Storage Conditions on Protein Oxidative Status, Dispersibility, and Color

All milk samples were analyzed after 9 mo of storage at -20°C (CS) or room temperature (WS) to evaluate changes in protein oxidative status (PC, dityrosine, and protein integrity) as well the closely related parameters dispersibility and color. Figure 3 shows the changes observed. The content of PC was one of the most affected parameters: values observed after 9 mo were almost twice the initial values (Figure 3, panel A). The content of PC increased compared with the initial values in all tested samples (WMP and SMP: $P \leq 0.05$ for CS and $P \leq 0.01$ for WS; IFP: $P \leq 0.001$ for CS and WS).

Dityrosine formation did not increase significantly after 9 mo, regardless of storage conditions, when compared by groups for the same type of milk powder (6, 4, or 5 pairs for WMP, SMP, and IFP, respectively; Figure 3, panel B). In contrast, when the 15 samples were analyzed as pairs before and after storage, a significant difference was found ($P = 0.0292$ and $P = 0.0186$ for CS and WS, respectively).

Stored milk powders had decreased dispersibility compared with initial values (WMP and IFP: $P \leq 0.01$ for CS; IFP: $P < 0.05$ for WS; SMP: $P < 0.05$ for CS, $P < 0.01$ for WS; Figure 3, panel C). The evaluation of

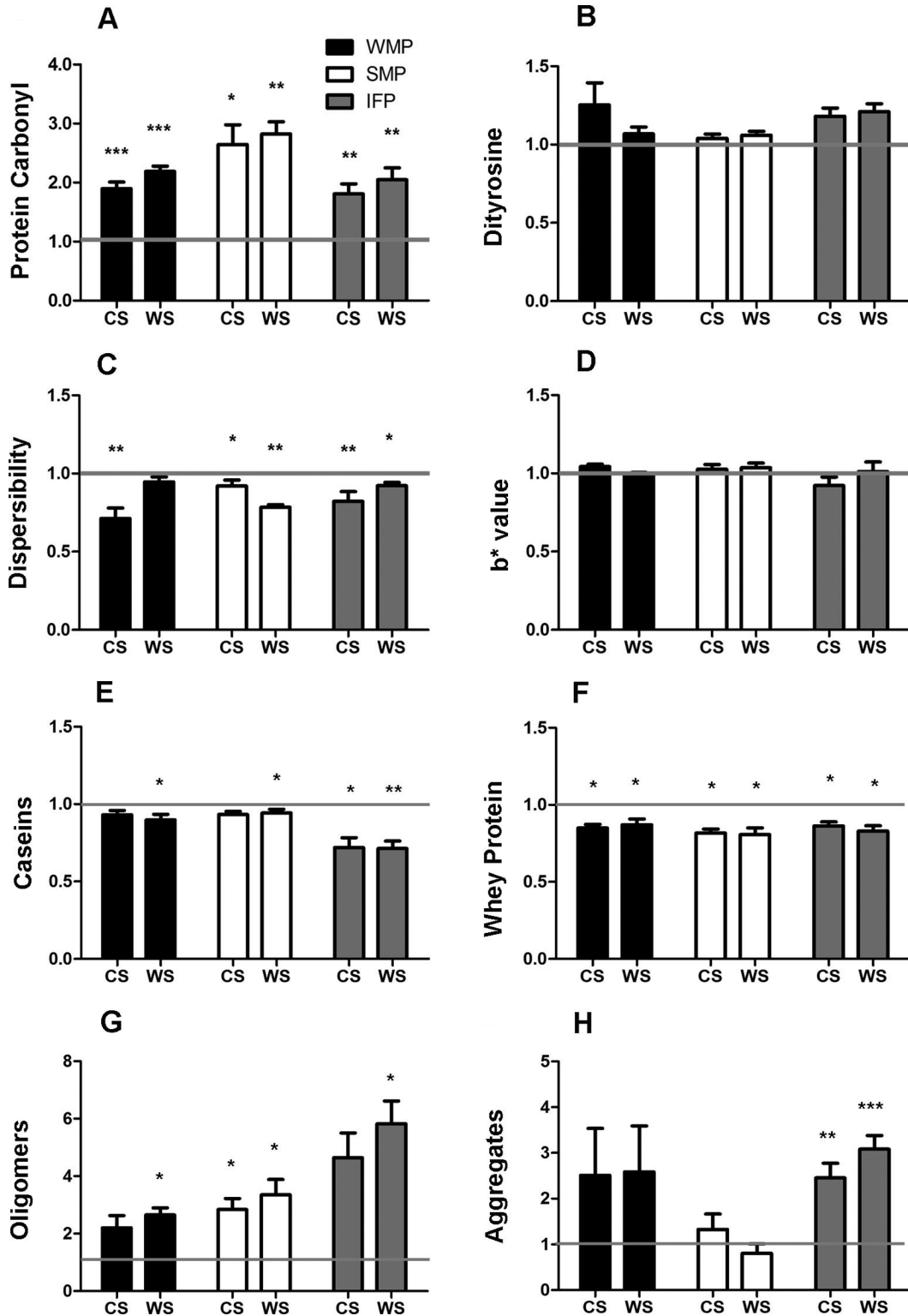


Figure 3. Effect of storage conditions on protein carbonyls, dispersibility, color, and protein integrity: (A) protein carbonyl, (B) dityrosine, (C) dispersibility, (D) color, (E) casein, (F) whey protein, (G) protein oligomers, and (H) protein aggregates. Milk powder samples were stored at 24°C (warm storage, WS) or -20°C (cold storage, CS) for 9 mo in the dark. Chemical analyses were performed as indicated in Figures 1 and 2 for initial conditions. Results were expressed as a ratio relative to the initial condition that was equal to 1 for each group (horizontal line). WMP = whole milk powder, SMP = skim milk powder, and IFP = infant formula powder. Analysis of variance and a *t*-test were used to determine the differences between groups: **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001. Each SDS-PAGE gel was performed twice as independent experiments.

the 15 samples as 2 paired groups using Student's *t*-test showed that the reduction was 17% after CS and 9% after WS ($P = 0.0002$ and $P = 0.0007$, respectively).

We observed no changes in color when samples were grouped by type of milk powder (Figure 3, panel D), or when all 15 samples were subjected to paired *t*-test.

When analysis was performed with samples grouped by milk powder type, the amount of casein evaluated by SDS-PAGE was decreased only in IFP after storage ($P = 0.0192$ and $P = 0.0072$ for CS and WS, respectively; Figure 3, panel E). When a paired *t*-test was conducted with all the samples, we observed a decrease (mean of differences about 13%: $P = 0.002$ for CS and $P = 0.0008$ for WS).

Whey protein decreased for all 3 groups ($P < 0.05$) after CS or WS (Figure 3, panel F). Paired Student's *t*-test (initial value vs. after storage for each sample) demonstrated that the reduction of all the samples grouped by storage condition was about 16% (mean of differences: 15.5 and 16.8, $P < 0.0001$, for CS and WS respectively).

We observed a significant increase in oligomers after CS only in SMP ($P < 0.05$). All samples maintained at room temperature had increased levels of oligomers ($P < 0.05$). Applying Student's *t*-test to a comparison of the whole population demonstrated that oligomer formation increased after CS (211%) and WS (282%; $P = 0.0023$ and 0.0009 , respectively).

Formation of aggregates increased significantly only for IFP after CS or WS ($P < 0.05$; Figure 3, panel H). When all the milk powder samples were analyzed together, we found a significant increase (mean increases of 133% and 167% after CS or WS compared with initial values, respectively; $P < 0.05$).

To test if initial conditions influenced the deterioration process after 9 mo of CS or WS, we performed a correlation analysis. We observed that the only parameter with a significant correlation was PC ($P < 0.0001$, $r > 0.84$).

After 9 mo of storage, all tested parameters changed, indicating that milk powder quality had diminished regardless of type of powder and storage conditions. Differences in PC were the most significant changes observed, and PC content was the only parameter that showed a correlation, indicating that the initial level influenced the increase after storage[**AU14: Check the latter part of this statement**]. Moreover, because PC was strongly correlated with dispersibility and aggregate formation (Table 2), the reduced proficiency[**AU15: What do you mean by proficiency?**] of powders in these parameters was predictable.

CONCLUSIONS

We concluded that milk powders of local origin had a low level of protein oxidative status and that SMP were less oxidized but had less antioxidant capacity than WMP. Finally, IFP presented a broad spectrum of oxidative status and anti- and pro-oxidant capacity. The most important finding was that 4 of the tested parameters were closely linked: PC, WP, aggregates, and dispersibility. Thus, all 4 determinations (PC, WP, aggregates, and dispersibility) could be used as complementary tests to evaluate dairy powder quality. Our results indicated that a chemical oxidative characteristic (PC) was related to physical quality parameters such as dispersibility or stability during storage and that specific processing strategies and storage conditions must be applied to different milk powders depending on initial WP and PC levels.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank María Rita Afonso de Romano and David Speroni for English correction and Carlos Argaraña for critical reading of the manuscript. Grant support was from SeCyT, Universidad Nacional de Córdoba; Instituto de Investigación de la Universidad Nacional de Villa María. DS is recipient of CONICET-MinCyT-Córdoba scholarship as a student of the doctoral career[**AU16: Please add affiliations and locations for all individuals acknowledged here and add locations (city and country) for all organizations acknowledged**].

REFERENCES

- Balestrieri, M., M. S. Spagnuolo, L. Cigliano, G. Storti, L. Ferrara, P. Abrescia, and E. Fedele. 2002. Evaluation of oxidative damage in mozzarella cheese produced from bovine or water buffalo milk. *Food Chem.* 77:293–299.
- Barros, L., M.-J. Ferreira, B. Queirós, I. C. F. R. Ferreira, and P. Baptista. 2007. Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chem.* 103:413–419.
- Besle, J. M., D. Viala, B. Martin, P. Pradel, B. Meunier, J. L. Berdagué, D. Fraisse, J. L. Lamaison, and J. B. Coulon. 2010. Ultraviolet-absorbing compounds in milk are related to forage polyphenols. *J. Dairy Sci.* 93:2846–2856.
- Biolatto, A., G. Grigioni, M. Irurueta, A. M. Sancho, M. Taverna, and N. Pensel. 2007. Seasonal variation in the odour characteristics of whole milk powder. *Food Chem.* 103:960–967.
- Birlouez-Aragón, I., M. Pischetsrieder, J. Leclère, F. J. Morales, K. Hasenkopf, R. Kientsch-Engel, C. J. Ducauze, and D. Rutledge. 2004. Assessment of protein glycation markers in infant formulas. *Food Chem.* 87:253–259.
- Capeillere-Blandin, C., T. Delaveau, and B. Descamps-Latscha. 1991. Structural modifications of human beta 2 microglobulin treated with oxygen-derived radicals. *Biochem. J.* 277:175–182.
- Carbonaro, M., F. Bonomi, S. Iametti, M. Cappelloni, and E. Carnovale. 1998. Aggregation of proteins in whey from raw and heat-processed milk: Formation of soluble macroaggregates and nutritional consequences. *Lebensw. Wiss. Technol.* 31:522–529.

- Dalsgaard, T. K., D. Otzen, J. H. Nielsen, and L. B. Larsen. 2007. Changes in structures of milk proteins upon photo-oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 55:10968–10976.
- Davies, M. J. 2005. The oxidative environment and protein damage. *Biochim. Biophys. Acta* 1703:93–109.
- Fenaille, F., V. Parisod, P. Visani, S. Populaire, J.-C. Tabet, and P. A. Guy. 2006. Modifications of milk constituents during processing: A preliminary benchmarking study. *Int. Dairy J.* 16:728–739.
- Gaiani, C., J. Scher, J. J. Ehrhardt, M. Linder, P. Schuck, S. Desobry, and S. Banon. 2007. Relationships between dairy powder surface composition and wetting properties during storage: Importance of residual lipids. *J. Agric. Food Chem.* 55:6561–6567.
- Halliwell, B. 2007. Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovasc. Res.* 73:341–347.
- Ishii, T., T. Mori, T. Ichikawa, M. Kaku, K. Kusaka, Y. Uekusa, M. Akagawa, Y. Aihara, T. Furuta, T. Wakimoto, T. Kan, and T. Nakayama. 2010. Structural characteristics of green tea catechins for formation of protein carbonyl in human serum albumin. *Bioorg. Med. Chem.* 18:4892–4896.
- Jovanovic, S., M. Barac, O. Macej, T. Vucic, and C. Lacnjevac. 2007. SDS-PAGE analysis of soluble proteins in reconstituted milk exposed to different heat treatments. *Sensors (Basel)* 7:371–383.
- Kalpathy, U., N. Hettiarachchy, and K. Rhee. 1997. Effect of drying methods on molecular properties and functionalities of disulfide bond-cleaved soy proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74:195–199.
- Kurozawa, L. E., K. J. Park, and M. D. Hubinger. 2009. Effect of carrier agents on the physicochemical properties of a spray dried chicken meat protein hydrolysate. *J. Food Eng.* 94:326–333.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Levine, R. L., D. Garland, C. Oliver, A. Amici, I. Climent, A. Lenz, B. Ahn, S. Shaltiel, and E. Stadtman. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186:464–478.
- Lloyd, M. A., M. A. Drake, and P. D. Gerard. 2009. Flavor variability and flavor stability of U.S.-produced whole milk powder. *J. Food Sci.* 74:S334–S343.
- Lüthi-Peng, Q., and Z. Puhán. 1999. Determination of protein and casein in milk by fourth derivative UV spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta* 393:227. **[AU17: Please provide the last page number if article is longer than one page.]**
- Matumoto-Pintro, P. T., H. V. Petit, H. J. Giroux, C. Côrtes, N. Gagnon, and M. Britten. 2011. Effect of flaxseed lignans added to milk or fed to cows on oxidative degradation of dairy beverages enriched with polyunsaturated fatty acids. *J. Dairy Res.* 78:111–117.
- Millqvist-Fureby, A., U. Elofsson, and B. Bergenståhl. 2001. Surface composition of spray-dried milk protein-stabilised emulsions in relation to pre-heat treatment of proteins. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 21:47–58.
- Murrieta-Pazos, I., C. Gaiani, L. Galet, B. Cuq, S. Desobry, and J. Scher. 2011. Comparative study of particle structure evolution during water sorption: Skim and whole milk powders. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 87:1–10.
- Pihlanto, A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int. Dairy J.* 16:1306–1314.
- Romeu-Nadal, M., J. L. Chávez-Servín, A. I. Castellote, M. Rivero, and M. C. López-Sabater. 2007. Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder formulas. *Food Chem.* 100:756–763.
- Scaloni, A., V. Perillo, P. Franco, E. Fedele, R. Froio, L. Ferrara, and P. Bergamo. 2002. Characterization of heat-induced lactosylation products in caseins by immunoenzymatic and mass spectrometric methodologies. *Biochim. Biophys. Acta* 1598:30–39.
- Scheidegger, D., R. P. Pecora, P. M. Radici, and S. C. Kivatinitz. 2010. Protein oxidative changes in whole and skim milk after ultraviolet or fluorescent light exposure. *J. Dairy Sci.* 93:5101–5109.
- Shimada, K., K. Fujikawa, K. Yahara, and T. Nakamura. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 40:945–948.
- Singh, H., and L. K. Creamer. 1991. Denaturation, aggregation and heat stability of milk protein during the manufacture of skim milk powder. *J. Dairy Res.* 58:269–283.
- Singleton, V. L., and J. A. Rossi Jr.. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16:144–158.
- Sliwinski, E. L., B. W. M. Lavrijsen, J. M. Vollenbroek, H. J. Van Der Stege, M. A. J. S. Van Boekel, and J. T. M. Wouters. 2003. Effects of spray drying on physicochemical properties of milk protein-stabilised emulsions. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 31:219–229.
- Stadtman, E. R., and R. L. Levine. 2000. Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899:191–208.
- Stapelheldt, H., B. R. Nielsen, and L. H. Skibsted. 1997. Effect of heat treatment, water activity and storage temperature on the oxidative stability of whole milk powder. *Int. Dairy J.* 7:331–339.
- Thomas, M. E. C., J. Scher, S. Desobry-Banon, and S. Desobry. 2004. Milk powders ageing: Effect on physical and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44:297–322.
- Thomsen, M. K., L. Lauridsen, L. H. Skibsted, and J. Risbo. 2005. Two types of radicals in whole milk powder: Effect of lactose crystallization, lipid oxidation, and browning reactions. *J. Agric. Food Chem.* 53:1805–1811.
- Zivkovic, J. V., S. M. Sunaric, N. V. Trutic, R. M. Pavlovic, G. M. Kocic, G. S. Nikolic, and T. V. Jovanovic. 2009. DPPH radical-scavenging activity of pasteurized cow milk. *Mleko i mlečni proizvodi* 20:45–47.
- Zulueta, A., A. Maurizi, A. Frígola, M. J. Esteve, R. Coli, and G. Burini. 2009. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. *Int. Dairy J.* 19:380–385.