



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

EFECTO DEL ULTRASONIDO DE ALTA POTENCIA SOBRE AISLADO DE PROTEÍNAS DE SUERO Y SU APLICACIÓN EN YOGUR

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
Maestría en Biotecnología Aplicada

PRESENTA:

Juanita Barajas Flores

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil

Codirector de Tesis

Dr. Genaro Gustavo Amador Espejo



Julio 2018



SIP-13-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 10 de junio del 2016

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA en su sesión ordinaria No. 6 celebrada el día 10 del mes de junio conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

Barajas

Apellido paterno

Flores

Apellido materno

Juanita

Nombre (s)

Con registro:

A	1	6	0	3	9	1
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Maestría en Biotecnología Aplicada

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

Efecto del ultrasonido de alta potencia sobre aislado de proteínas de suero y su aplicación en yogur

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

Análisis de la formación de agregados en leche tratada por termosonicación por técnicas convencionales como por espectroscopia óptica.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:

Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil y Dr. Genaro Amador Espejo

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en: Las instalaciones del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada y en la Facultad de Ingeniería Química de la BUAP.

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

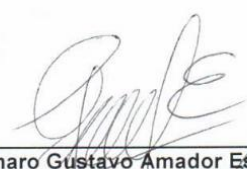
4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

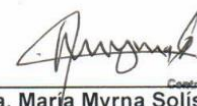

Dr. Raúl J. Delgado Macuil

Aspirante


Ing. Juanita Barajas Flores


Dr. Genaro Gustavo Amador Espejo

Presidente del Colegio


Dra. María Myrna Solís Oba



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada
Unidad Tlaxcala
Dirección



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizabal siendo las 11:00 horas del día 5 del mes de Junio del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA para examinar la tesis titulada:

Efecto del ultrasonido de alta potencia sobre aislado de proteínas de suero y su aplicación en yogur

Presentada por el alumno:

BARAJAS
Apellido paterno

FLORES
Apellido materno

JUANITA
Nombre(s)

Con registro:

A	1	6	0	3	9	1
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGIA APLICADA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Raúl J. Delgado Macuil

Dr. Genaro G. Amador Espejo

Dra. Silvia Luna Suárez

Dr. Abdú Orduña Díaz

Dr. Héctor Ruiz Espinosa

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. María Myrna Solís Oba





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla de lardizábal el día 04 del mes Junio del año 2018, el (la) que suscribe Juanita Barajas Flores alumno (a) del Programa de Maestría en Biotecnología Aplicada con número de registro A160391, adscrito a Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil y cede los derechos del trabajo intitulado Efecto del ultrasonido de alta potencia sobre aislado de proteínas de suero y su aplicación en yogur, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección juaniss9023@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Juanita Barajas Flores

AGRADECIMIENTOS

Primero agradecer a Dios por darme la oportunidad de día a día superarme como persona y profesional, y gracias porque me ha dejado llegar hasta donde estoy, a Él dedico y encomiendo cada uno de mis días y mis triunfos.

Pero esto tampoco sería posible sin el apoyo de mi familia especialmente mis padres, María del Carmen Flores Anguiano y José Ranulfo Pérez Portilla, sin ellos no sería lo que soy, su apoyo ha sido primordial para la culminación de esta etapa de mi vida, mis hermanas, Rosa Isela y María de Jesús, que me han alentado para seguir adelante y mi hermano Martín que, aunque no está cerca es un motor que me ayuda a seguir en momentos difíciles con el propósito de ser mejor y un apoyo para ellos.

Agradezco el apoyo y orientación de mis directores de tesis él Dr. Raúl J. Delgado Macuil y él Dr Genaro G. Amador Espejo, que tuvo como resultado la culminación de mis estudios de posgrado, además la confianza otorgada hacia mi persona y su tiempo dedicado, compartiendo su experiencia y conocimiento.

Mi agradecimiento también para los integrantes de mi comité, Dra. Silvia Luna Suárez, Dr. Abdú Orduña Díaz y él Dr. Héctor Ruíz Espinosa por sus valiosas observaciones y consejos que enriquecieron el presente trabajo de investigación.

Agradezco el apoyo al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional por permitir realizar este proyecto y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada con número de becario 598784, también a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ingeniería Química, y a la Universidad de las Américas Puebla por la oportunidad de permitirme utilizar sus laboratorios para los análisis.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. LECHE.	3
2.1.1. Caseínas.	4
2.1.2. Proteínas séricas.	5
2.2. APLICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	11
2.3. ULTRASONIDO	13
2.3.1. Clasificación del ultrasonido.	14
2.4. APLICACIONES DEL ULTRASONIDO	16
2.5. APLICACIONES DE AGREGADOS PROTEICOS	18
2.6. EL YOGUR	20
III. JUSTIFICACIÓN	22
IV. HIPÓTESIS	22
V. OBJETIVOS	23
5.1. OBJETIVO GENERAL	23
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.	24
6.2. TRATAMIENTOS DE ULTRASONICACIÓN.	24
6.3. ESPECTROMETRÍA DE INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR). ..	26
6.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.	27
6.5. CROMATOGRAFÍA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	28
6.6. SULFHIDRILOS LIBRES	28
6.6.1. Referencia del método.	28
6.6.2. Preparación de la muestra.	29

6.7. DETERMINACIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA.	29
6.8. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM).	30
6.8.1. Preparación de la muestra.	30
6.9. DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FUNCIONALES.	31
6.9.2. Viscosidad en geles.	32
6.10. DETERMINACIÓN DE LA HIDROFOBICIDAD DE SUPERFICIE (H₀).	32
6.11. TURBIDEZ.	33
6.12. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).	33
6.13. DETERMINACIÓN DE POTENCIAL ZETA.	33
6.14. ELABORACIÓN DEL YOGUR	34
6.14.1. Análisis de firmeza de gel	35
6.14.2. Determinación de sinéresis	36
6.14.3. Viscosidad del yogur	36
6.14.4. Análisis estadístico.	36
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
7.1. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER	38
7.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.	48
7.3. CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	53
7.4. CUANTIFICACIÓN DE SULFHIDRILOS LIBRES.	54
7.5. DETERMINACIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA.	55
7.6. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM).	56
7.7. CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (CRA) Y VISCOSIDAD.	58
7.8. DETERMINACIÓN DE LA HIDROFOBICIDAD DE SUPERFICIE DEL 1-ANILINO-8-NAFTALENO SULFONATO (ANS)	59
7.9. TURBIDEZ.	60
7.10. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).	61
7.11. POTENCIAL ZETA	62
7.12. ELABORACIÓN DEL YOGUR	63
7.12.1. Análisis de firmeza de gel	63
7.12.2. % de Sinéresis en muestras de yogur y viscosidad.	64

VIII. CONCLUSIONES	66
IX. LITERATURA CITADA.....	67
X. ANEXOS.....	76
10.1. CURVA ESTÁNDAR DE ESTÁNDAR DE B-LG PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CONCENTRACIÓN CARGADA EN CADA POZO EN EL GEL DE PAGE.....	76
10.2. CURVA ESTÁNDAR DE B-LG TOMADA EN HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE B- LG.....	77

Índice de figuras

Figura 1. Estructura tridimensional de la proteína β -Lactoglobulina (Protein Data Bank). .	6
Figura 2. Estructura tridimensional de la proteína β -lactoglobulina que muestra las posiciones relativas de los cinco residuos Cys y el palmitato enlazado.....	7
Figura 3. Proceso de reacciones de desplazamiento de grupos tiol de la proteína β -lactoglobulina.....	8
Figura 4. Estructura tridimensional de la proteína α -Lactoalbumina	9
Figura 5. Esquema de las inmunoglobulinas G1, secretor A1 y M. Los enlaces disulfuro se designan con guiones. Las porciones variables están sombreadas en negro.	10
Figura 6. Fenómeno de cavitación, expansión, implosión y colapso de la burbuja.....	15
Figura 7. Representación esquemática de la formación de finas partículas de cadena o geles de proteínas globulares durante el calentamiento.	19
Figura 8. Termosonicador.....	25
Figura 9. Equipo de calorimetría diferencial de barrido	33
Figura 10. Diagrama de flujo del yogur.....	35
Figura 11. Texturómetro TA.XT Plus.....	35
Figura 12. Espectros de proteína de suero aislada en solución modelo agua pH7 FI 0.1 M ultrasonificada por 4 min al 3 % y controles.....	39
Figura 13. Espectros de proteína de suero aislada en solución modelo agua pH7 FI 0.1 M ultrasonificada por 6 min al 3 % y controles.....	40
Figura 14. Espectros de proteína de suero aislada en solución modelo agua pH7 FI 0.2 M ultrasonificada por 4 min al 3 % y controles.....	41
Figura 15. Espectros de proteína de suero aislada en solución modelo agua pH7 FI 0.2 M ultrasonificada por 6 min al 3 % y controles.....	42

Figura 16. Espectros de proteína de suero aislada en solución modelo agua a pH4 FI 0.1 M ultrasonicada por 4 min al 3 % y controles.....	43
Figura 17. Espectros de proteína de suero aislada en solución modelo agua pH4 FI 0.1 M ultrasonicada por 6 min al 3 % y controles.....	44
Figura 18. Espectros de proteína de suero aislada en solución modelo agua pH4 FI 0.2 M ultrasonicada por 4 min al 3 % y controles.....	45
Figura 19. Espectros de proteína de suero aislada en solución modelo agua pH4 FI 0.2 M ultrasonicada por 6 min al 3 % y controles.....	46
Figura 20. Gráfica de puntuaciones de tres dimensiones obtenida mediante el análisis de PCA de los espectros de FTIR de los controles y tratamientos de US.....	47
Figura 21. Marcador de peso molecular SDS-PAGE.....	48
Figura 22. Cámara electroforética vertical.....	48
Figura 23. Gel nativo de una dimensión de WPI al 3 % (w/v) en solución modelo agua y controles.....	49
Figura 24. Gel nativo de una dimensión de los tratamientos de ultrasonicación con modificación de pH y fuerza iónica con WPI en solución modelo agua al 3 %.....	50
Figura 25. Gel SDS de una dimensión de WPI al 3 % (w/v) en solución modelo agua y controles.....	51
Figura 26. Gel SDS de una dimensión de los tratamientos de ultrasonicación con modificación de pH y fuerza iónica con WPI en solución modelo agua al 3 %.....	52
Figura 27. Cromatograma de WPI en solución agua al 3 % sin tratamiento y muestras tratadas con ultrasonicación y modificación de pH y FI, (1) Variante B de β -LG y (2) Variante A de β -LG.....	53
Figura 28. Imágenes 3D AFM de muestras preparadas al 3 % de WPI; (a) WPI sin tratamiento, (b) WPI pH4, (c) WPI pH7, (d) WPI 0.1 M, (e) WPI 0.2M, (f) WPI-US 4 min, (g) WPI-US 6 min, (h) pH7-0.1M-4min e (i) pH7-0.1M-6min, con modo de tapping a una velocidad de exploración de 20 Hz.....	56

Figura 29. Imágenes 3D AFM de muestras preparadas al 3 % de WPI con modificación de pH y FI; a) pH7-0.2M-4min, b) pH7-0.2M-6min, c) pH4-0.1M-4min, d) pH4-0.1M-6min, e) pH4-0.2M-4min, f) pH4-0.2M-6min, con modo de tapping a una velocidad de exploración de 20 Hz. 57

Figura 30. Espectros de fluorescencia de ANS de las muestras tratadas y controles..... 59

Figura 31. Turbidez de muestras tratadas y controles..... 60

Figura 32. Comparación de termogramas DSC de muestras control y muestras tratadas.
..... 61

Índice de tablas

Tabla 1. Distribución de las proteínas de leche (Badui, 2006).	4
Tabla 2. Papel de las proteínas en sistemas alimenticios (Fuente: Kinsella, 1985).	13
Tabla 3. leches fermentadas y cultivos característicos (FAO y OMS 2011).	20
Tabla 4. Gel de separación y concentración.	27
Tabla 5. Componentes del buffer de carga.	27
Tabla 6. Formulaciones para elaboración del yogur.	34
Tabla 7. Tratamientos de ultrasonificación, pH y fuerza iónica.	37
Tabla 8. Concentración de sulfhidrilos libres ($\mu\text{mol SH/g}$) de muestras ultrasonificadas....	54
Tabla 9. Tamaño de partícula de muestras tratadas por ultrasonificación 24 kHz y 400 W.	55
Tabla 10. Parámetros de los geles elaborados con WPI al 3 %.....	58
Tabla 11. Efecto del ultrasonido, pH y fuerza iónica sobre el potencial zeta de WPI.	62
Tabla 12. Perfil de textura de diferentes muestras de yogur.	63
Tabla 13. % de sinéresis y viscosidad de muestras de yogur	64

RESUMEN

En este trabajo se determinó el efecto del ultrasonido de alta intensidad sobre aislado de proteínas de suero, modificando el medio en que se encuentra para observar mayor efecto en la estructura de las mismas (desnaturalización) y su posterior agregación. Las soluciones de aislado de proteína de suero (WPI) se prepararon al 3 % a pH7 y pH4 con CaCl_2 en concentraciones de 0.1 M y 0.2 M; posteriormente se aplicó tratamiento de ultrasonido durante 4 y 6 minutos (24 kHz a 400 W), para cada medición se tuvieron muestras control, a las cuales se les modificó el pH, FI o tiempo de ultrasonido. En los resultados por medio de espectroscopia de infrarrojo se observaron cambios espectrales en la región de la amida primaria ($1500\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$), determinando desnaturalización proteica irreversible; estos resultados se pudieron corroborar en electroforesis observando bandas a 37 kDa y <250 kDa debido a la formación de agregados. En HPLC se vio reflejado en la disminución del área bajo la curva, así como la disminución en hidrofobicidad, tamaño de partícula e incremento en sulfhidrilos libres y turbidez. Los geles formados para determinación de CRA y viscosidad, en los tratamientos a pH 7 0.1 M con 4 y 6 minutos de ultrasonificación, mostraron mejores resultados, con respecto a controles y tratamientos a pH 4 0.1 M y 0.2 M con 4 y 6 minutos de ultrasonido, destacando que en algunos controles (WPI, pH7, pH4, US 4 y 6 min) no hubo formación de gel. Estos resultados dieron la pauta para determinar que tratamientos serían los mejores para la elaboración de yogur, siendo los tratamientos pH 7-0.1 M con 4 y 6 min de ultrasonido. Las muestras de yogur en firmeza del gel y % de sinéresis tuvieron diferencia significativa, no así en viscosidad. La muestra de yogur preparada con WPI tratada con pH 7-0.1 M y 4 min de ultrasonido, no presentó diferencia significativa, este análisis se realizó mediante análisis de varianza (una sola vía $p > 0.05$) y prueba Tukey, además el tiempo de coagulación de los yogures Y2 y Y3 (yogur elaborados con WPI tratada pH 7-0.1 M, 0.2 M con 4 y 6 min de ultrasonido), fue menor al del Y1 (WPI sin tratamiento), mostrando un rango de media hora menos, siendo que la cantidad de proteína

tratada fue menor a la concentración de leche en polvo (3 g y 6 g respectivamente). Sin embargo, se necesitan realizar mayor número de pruebas, para determinar que concentración de proteína se debe agregar reemplazando la adición de leche en polvo y obtener así mejores resultados.

ABSTRACT

In this work, the effect of high intensity ultrasound on isolates of whey proteins was determined, modifying the medium in which it is found to observe a greater effect on the structure of the proteins (denaturation) and their subsequent aggregation. Whey protein isolate solutions (WPI) were prepared at 3% at pH7 and pH4 with CaCl₂ at concentrations of 0.1 M and 0.2 M, then ultrasound treatment was applied for 4 and 6 minutes (24 kHz to 400 W), For each measurement, control samples were taken, to which the pH, FI or ultrasound time were modified. In the results by means of infrared spectroscopy, spectral changes were observed in the primary amide region (1500-1700 cm⁻¹), determining irreversible protein denaturation; These results could be corroborated in electrophoresis observing bands at 37 kDa and <250 kDa due to the formation of aggregates, in HPLC was reflected in the decrease of the area under the curve, as well as the decrease in hydrophobicity, particle size and increase in free sulfhydryls and turbidity, the gels formed for determination of CRA and viscosity, in the treatments at pH7-0.1M with 4 and 6 minutes of ultrasonication, showed better results, with respect to controls and treatments at pH 4- 0.1 M and 0.2 M with 4 and 6 minutes of ultrasound, highlighting that in some controls (WPI, pH 7, pH 4, US 4 and 6 min) there was no gel formation. These results gave the guideline to determine which treatments would be the best for the elaboration of yogurt, being the treatments pH 7-0.1M with 4 and 6 min of ultrasound. The samples of yogurt in gel firmness and% syneresis had a significant difference, but not in viscosity, the sample of yogurt prepared with WPI treated with pH7-0.1 M and 4 min of ultrasound, did not have a significant difference, this analysis was carried out using analysis of variance (one-way $p > 0.05$) and Tukey test, in addition the coagulation time of the Y2 and Y3 yoghurts (yoghurt made with treated WPI pH 7-0.1 M, 0.2 M with 4 and 6 minutes of ultrasound), was lower to Y1 (WPI without treatment), showing a range of half an hour less, being that the amount of protein treated was lower than the concentration of milk powder (3 g and 6 g respectively). However, more tests are needed to determine what protein concentration should be added by replacing the milk powder addition and obtain better results.

I. INTRODUCCIÓN

El potencial de las proteínas de la leche como ingredientes de alimentos ha sido un tema popular de investigación durante los últimos 40 años. Esto se debe en parte a la gran funcionalidad que presentan y la gran diversidad de estructuras que existen (Nicolai *et al.*, 2011). Las proteínas lácteas representan el 3.3 % del total en la leche. Para su estudio éstas han sido divididas en dos grandes grupos, de acuerdo con su estado de dispersión: caseínas (75-80%) y séricas (20%) dentro de las cuales, la β -lactoglobulina (β -LG), α -lactalbúmina (α -La), seroalbúmina bovina (BSA) e inmunoglobulinas (Igs), las cuales representan ~60, 20, 10 y 10% del total de proteínas del suero, respectivamente (McSweeney & Fox, 2013).

El lactosuero, que se consideraba un desecho de la producción de queso, actualmente se utiliza para la fabricación de concentrados (WPC) o aislados de proteína (WPI) comerciales (Morr & Ha, 1993). Sin embargo, las proteínas pueden ser afectadas por diversos métodos físicos (temperatura, agentes mecánicos, como agitación, alta presión y ultrasonido) o químicos (cambios de pH, adición de detergentes, disolventes orgánicos y fuerza iónica) provocando la pérdida de su estructura nativa (desnaturalización), ya que en algunos casos esta desnaturalización proteica es deseable para la modificación de propiedades funcionales como son la solubilidad, emulsificación y coagulación, en la producción de subproductos lácteos. Por otro lado, la implementación de tecnologías emergentes en proteínas ha tomado gran importancia en este sentido, como es el caso de la sonicación, logrando una modificación importante en la estructura de aislados de proteínas de suero (WPI por sus siglas en inglés) en solución (Shen *et al.*, 2017), representando una alternativa importante, obteniéndose productos con propiedades fisicoquímicas y sensoriales únicas, a la vez que se mantiene la seguridad del producto (Gallegos, 2015). Su aplicación se ha hecho desde años atrás, pero no fue hasta ahora que ha tenido mayor importancia en la industria alimentaria, hablando principalmente de productos lácteos, siendo las proteínas el punto central de investigación. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar el

efecto del tratamiento de sonicación sobre WPI en sistemas real y modelo (agua y SMUF) y su aplicación en la mejora de las características fisicoquímicas y funcionales de yogur.

II. ANTECEDENTES

2.1. Leche.

La leche es por definición la secreción de las glándulas mamarias de los mamíferos excluyendo el calostro (Badui, 2006). Es considerada un alimento completo debido a su contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos y micronutrientes. (Walstra *et al.*, 2006). El contenido de proteínas en la leche varía por diversos factores, los cuales van desde la alimentación del rumiante, raza, edad y especie. Dichas proteínas se pueden clasificar en caseínas y proteínas de lactosuero; las caseínas son insolubles y termorresistentes al contrario de las proteínas de lactosuero, que son solubles y menos estables a altas temperaturas. Varios estudios están enfocados a determinar la composición, estructura, propiedades físicas, propiedades químicas y cambios que pueden tener las proteínas en los diversos procesos tecnológicos aplicados (Nicolai *et al.*, 2011, Pelegrine & Gasparetto, 2005, Lam & Nickerson, 2014). Lo anterior se debe a que tienen un sabor suave, son bastante estables para el procesamiento y están esencialmente libres de toxinas. Zimmermann-Stein & Ruiz-Espinosa (2010), revisaron algunos de los métodos más importantes de desnaturalización de las proteínas lácteas los cuales tienen el potencial de cambiar las propiedades de la leche, incluyendo solubilidad, emulsificación y coagulación; todas éstas pueden ser iniciadas por varias acciones y agentes. Entre los agentes que causan desnaturalización de proteínas se encuentran, el incremento de temperatura, los cambios de pH, o la adición de detergentes, los disolventes orgánicos, la fuerza iónica, agentes mecánicos, como la agitación, la alta presión y el ultrasonido, entre otros. Posteriormente Shen *et al.*, (2017) desarrollaron un estudio sobre la influencia del tratamiento de sonicación sobre propiedades fisicoquímicas en suspensiones de proteínas de suero, preparadas a partir de un aislado de proteínas de lactosuero (WPI) comercial mediante los cambios en el tamaño de partícula, potencial zeta, hidrofobicidad superficial, contenido de grupos sulfhidrilos libres, turbidez, propiedades reológicas y propiedades emulsionantes.

Las proteínas son los elementos constitutivos esenciales de toda célula viviente y tienen una gran importancia en la leche y sus productos lácteos (Oria, 1991), la proporción y características de las proteínas en la leche se muestran en la Tabla 1. El valor nutricional se debe principalmente al contenido de alta calidad de sus proteínas que se dividen en dos grandes grupos de acuerdo a su estado de dispersión: las caseínas que representan el 80% del total y las proteínas de suero o seroproteínas con el 20% restante (Badui, 2006).

Tabla 1. Distribución de las proteínas de leche (Badui, 2006).

<i>Proteína</i>	<i>Total, de proteínas (%)</i>	<i>Peso molecular kDa</i>	<i>Número de aminoácidos</i>	<i>Punto isoeléctrico</i>
Caseínas	80			
α_{S1}	34	23.6	199	4.1
α_{S2}	8	24.2	207	
β	25	23.9	209	4.5
κ	9	19.0	169	4.1
γ	4			5.8
Proteína de suero	20			
β -lactoglobulina	9	18.2	162	5.3
α -lactoalbúmina	4	14.1	123	5.1
Proteosa peptona	4	4.0-20.0		
inmunoglobulinas	2	1500.0		4.5 - 8-3
Seroalbúmina	1	69.0		4.7

2.1.1. Caseínas.

Las caseínas por definición son las fosfoglicoproteínas que precipitan a pH 4.6 y 20°C, prácticamente todas las moléculas de caseína están asociadas entre sí integrando micelas. Este grupo lo integran α_{S1} -caseína, α_{S2} -caseína, β -caseína, κ -caseína y en menor proporción γ -caseína, se observan en la Tabla 1. Dentro de las caseínas, se encuentra principalmente la κ -caseína; tiene características específicas como su tamaño, que es mucho menor que las demás caseínas (19 kDa); es una proteína heterogénea, contiene 169 residuos de aminoácidos, además

de ser soluble en calcio (Ca) e interactuar con este para estabilizar a las caseínas que no son solubles en Ca, por eso es que tiene una función protectora y estabilizante en la leche. Asimismo, tiene una zona con carga neta positiva entre los aminoácidos 20 y 115 que está muy poco fosforilada, teniendo solamente un grupo fosfato (Badui, 2006). Se encuentra comúnmente como una mezcla de formas proteicas poliméricas, aunque también puede formar pequeños agregados en solución acuosa por asociación de las partes hidrofóbicas de la molécula (Hidalgo, 2010). Es susceptible al proceso de agregación, debido a la hidrólisis enzimática que sufre esta proteína en la elaboración de queso. Este proceso se realiza en presencia de la enzima quimosina o renina, la cual en la primera etapa rompe la κ -caseína en los aminoácidos fenilalanina 105 y metionina 106, ocasionando la reducción del total de la carga negativa y la repulsión estérica, haciendo las micelas susceptibles a la agregación (Lucey, 2011). De la misma forma, el tratamiento con calor a 85-95°C ha sido ampliamente reportado para incrementar gelificación y firmeza en leche acidificada, proceso que tiene gran aplicación en la elaboración de yogures; esto se atribuye a la formación de complejos entre las proteínas del suero. En particular con las proteínas mayoritarias (β -LG y α -LA) y la κ -caseína inducido por la temperatura.

2.1.2. Proteínas séricas.

Por otro lado, las proteínas del suero son proteínas compactas, globulares, con un peso molecular que puede ir desde los 14 hasta 1,000 kDa. Presentan hidrofobicidad relativamente elevada y su estructura exhibe una gran proporción de hélices α ; la distribución de sus cargas es bastante homogénea. La solubilidad disminuye como consecuencia del calentamiento que produce su desnaturalización. La desnaturalización no causa una floculación, sino que las proteínas precipitan sobre las micelas de caseína y se mantienen dispersas (Walstra & Almudí, 2001). β -lactoglobulina (β -LG), α -lactalbúmina (α -LA), seroalbúmina (BSA) e inmunoglobulinas (Igs), las cuales representan ~60, 20, 10 y 10% del total de proteínas del suero, respectivamente, y varias proteínas en menor proporción,

generalmente a niveles traza, muchas de las cuales tienen una función biológica, incluyendo alrededor de 60 enzimas propias (Badui, 2006).

Las proteínas del suero de la leche bovina son generalmente similares a las de otras especies, aunque hay muchas diferencias menores entre especies en cuanto a las secuencias de aminoácidos y sus propiedades. Debido a su relevancia y al objetivo del presente proyecto, la β -LG se describirá a detalle en la siguiente sección. α -LA es una proteína compacta con un peso molecular de 14.2 kDa; su estabilidad se debe a que contiene cuatro puentes disulfuro y no contiene ningún grupo tiol libre; de cualquier modo, uno de sus puentes disulfuro es más sensible a romper, en comparación con los otros tres, debido a una estabilidad inherente menor (Hong & Creamer, 2002). La BSA es una proteína que se fuga de la sangre y no tiene significancia biológica o tecnológica en la leche. La principal Ig en la leche bovina, ovina, caprina y de búfala es la IgG1, la cual es transportada selectivamente de la sangre y está presente en una concentración de alrededor del 10% en el calostro, cuya función es otorgar inmunidad pasiva a las crías de estas especies. Las proteínas en menor proporción incluyen la lactoferrina, proteínas unidas a vitaminas, hormonas y enzimas (Cicvárek *et al.*, 2010).

2.1.1.1. β -Lactoglobulina (β -LG).

La β -LG está presente en la leche de la mayoría de los mamíferos y generalmente representa alrededor del 50% de las proteínas de suero en rumiantes y alrededor del 10% del total de proteína en la leche de vaca (Creamer *et al.*, 2011). Es una proteína pequeña, soluble en soluciones salinas diluidas, como corresponde a una globulina, con 162 residuos de aminoácidos con peso molecular de 18.4 kDa aproximadamente (Figura 1).

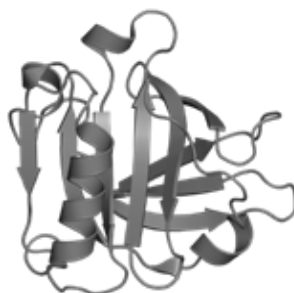


Figura 1. Estructura tridimensional de la proteína β -Lactoglobulina (Protein Data Bank).

La primera estructura tridimensional de resolución media de β -LG a 2.8 Å fue descrita por Papiz *et al.* (1986). La estructura ha sido posteriormente refinada considerablemente por Brownlow *et al.* (1997) y Jayat *et al.* (2004), que informaron una resolución de 1.8 Å y 1.95 Å, respectivamente. La estructura de la β -LG nativa (Figura 2) tiene nueve hebras que se pliegan en dos láminas β : la lámina 1 contiene las hebras B, C y D, y parte de la hebra A (A1). La lámina 2 contiene las hebras D, E, F, G y H, parte de la hebra A (A2) y la hebra I. De estas láminas, un lado de la lámina 1 es hidrófobo y el otro lado es hidrófilo. La lámina 2 es también hidrófoba en un lado y hace frente al lado hidrofóbico de la lámina 1, creando así una cavidad muy hidrófoba, que sin embargo está llena de agua. También hay otra región hidrófoba en el lado de la lámina 2, donde la hélice de tres vueltas se encuentra encima de él y a lo largo de los filamentos F, G y H. La β -LG tiene dos enlaces disulfuro y una cisteína libre (CysH). La α -hélice cubre el residuo CysH, siempre que permanezca repleto contra el exterior del cáliz.

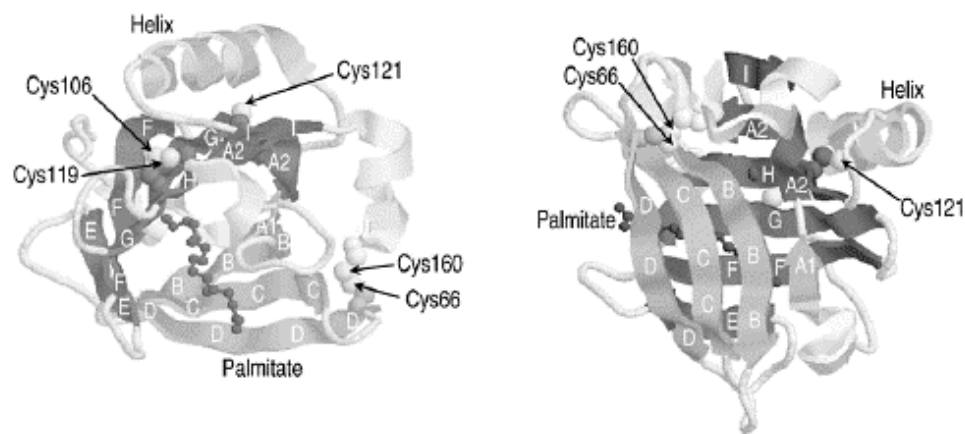


Figura 2. Estructura tridimensional de la proteína β -lactoglobulina que muestra las posiciones relativas de los cinco residuos Cys y el palmitato enlazado. (Considine *et al.*, 2007)

La β -LG es muy susceptible a diferentes condiciones de desnaturalización, como son, calor, presión, urea, etc. En cuyas condiciones expone estos residuos de cisteína (Cys) e inicia una cadena de reacciones que implican intercambio SH / S-S (Figura 3).

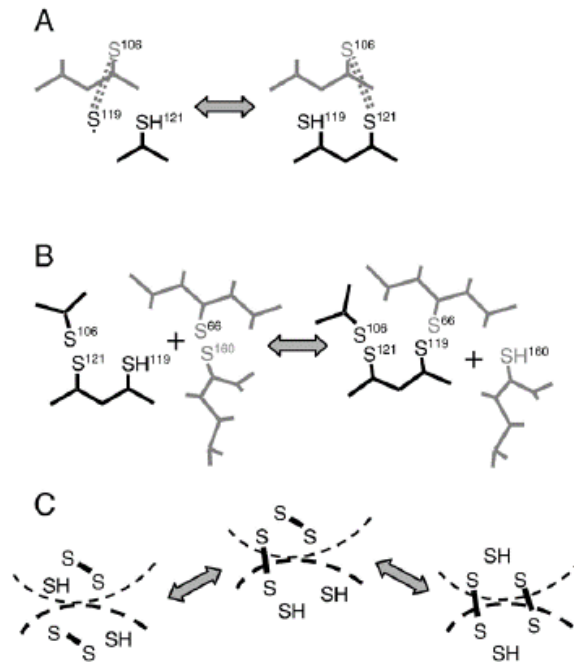


Figura 3. Proceso de reacciones de desplazamiento de grupos tiol de la proteína β -lactoglobulina.

2.1.1.2. α -lactoalbumina (α -LA).

Tiene importancia por su funcionalidad debido a que se utiliza en alimentos como agente emulsionante y agente gelificante, propiedad que surge por la capacidad para desnaturalizar y agregar. Esta proteína es cuantitativamente la segunda más importante, se encuentra en leche bovina y en leche humana. Tiene función en la biosíntesis de lactosa, su estructura primaria está formada por 123 residuos de aminoácidos de cadena ramificada y esencial con un peso molecular de 14 kDa, dentro de su cadena polipeptídica se encuentran ocho cisteínas conectadas por cuatro enlaces disulfuro intramoleculares y fuertemente unidos a un ion Ca^{+2} . Su estructura secundaria está compuesta por 4 α -hélices y una lámina β y posee una estructura terciaria de tipo globular (Figura 4), posee una alta solubilidad en agua,

además de ser relativamente estable al calor cuando se encuentra unida a calcio en comparación con otras proteínas de leche (Muro *et al.*, 2010, Brew, 2011).

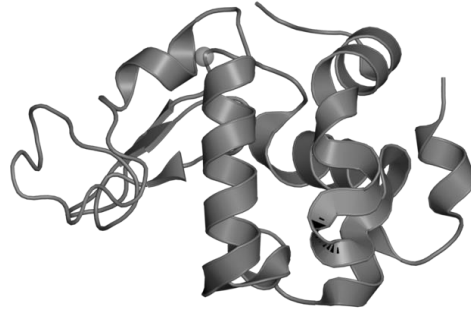


Figura 4. Estructura tridimensional de la proteína α -Lactoalbumina (Walstra *et al.*, 2006).

2.1.1.3. Albumina sérica (BSA).

La albúmina de suero bovino (BSA) del suero de leche es una proteína globular grande (66.43 kDa). Es una proteína secundaria que presumiblemente gana entrada a la leche por "filtración" del suero sanguíneo (Walstra *et al.*, 2006). La proteína consiste en una única cadena polipeptídica que contiene aproximadamente 582 residuos de aminoácidos con 17 enlaces disulfuro intracatenarios y un grupo tiol libre en el residuo 34 (Considine *et al.*, 2007). Aunque no se conoce la estructura cristalina tridimensional precisa de BSA, la distribución de enlaces disulfuro y la ubicación de residuos específicos en toda la cadena polipeptídica sugiere que la molécula de albúmina se pliega para formar tres dominios estructurales y nueve subdominios (Gelamo *et al.*, 2000; Gelamo & Tabak, 2002).

Más tarde, Murayama & Tomida (2004) exploraron la estructura inducida por el calor y la conformación de BSA monomérica mediante espectroscopía FTIR. Estos autores informaron que la formación intermolecular de BSA en láminas es irreversible al calentar a más de 70 ° C.

2.1.1.4. Inmunoglobulinas (Ig).

Son anticuerpos sintetizados en respuesta a la estimulación por antígenos específicos que ocurren en la sangre. Las inmunoglobulinas son moléculas glicoproteínas grandes de composición heterogénea, incluso dentro de una subclase. Esto no es sorpresa considerando que están formadas por diferentes células secretoras que cada una puede producir diferentes cadenas peptídicas. Además, se forma específicamente una parte de la molécula para neutralizar un antígeno particular, que se conoce como porción hipervariable. Se distinguen varias clases de inmunoglobulinas, incluyendo G (gammaglobulinas), A y M (macroglobulinas), que se producen en la leche (Figura 5).

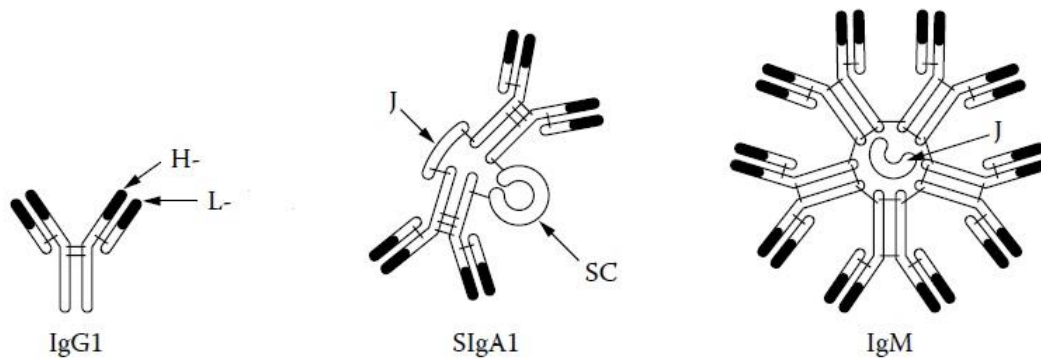


Figura 5. Esquema de las inmunoglobulinas G1, secretor A1 y M. Los enlaces disulfuro se designan con guiones. Las porciones variables están sombreadas en negro (Walstra *et al.*, 2006).

2.1.1.5. Peptona proteasa (PP).

Se define como no sensible al calor, no se precipita a pH 4.6 y se precipita con ácido tricloroacético al 12%. Esta fracción es muy diferente de las otras proteínas séricas. Tres diferentes productos de degradación de la β -caseína (el complemento de las γ -caseínas) explican en gran medida la fracción. También contiene una glicoproteína (llamada PP3) que es un constituyente de membrana de glóbulos grasos, y presumiblemente hay rastros de otras proteínas. Claramente, a pH neutro,

una parte considerable de la peptona proteasa está presente en las micelas de caseína, de modo que el suero de queso de cuajo no contiene en absoluto toda la peptona proteasa, pero sí el suero obtenido por acidificación de la leche (Walstra *et al.*, 2006).

2.1.1.6. Lactoferrina (Lf).

La lactoferrina (Lf) está presente en la leche bovina a una razón entre 0.02 y 0.35 g / litro, mientras que hay cantidades considerablemente mayores (aproximadamente 2-5 g/ litro) en la leche humana. La lactoferrina es una glicoproteína única con una masa molecular aproximada de 80,000 Da, que posee dos grupos de carbohidratos unidos (Reiter, 1985). Lf está involucrada en el transporte de hierro o el metabolismo en circunstancias normales. De hecho, la proteína solo tiene una carga ligera de hierro (III) en la leche, lo que le permite desempeñar un papel bacteriostático importante secuestrando hierro (III) a pesar de que las bacterias producen agentes secuestrantes de hierro (sideróforos) que tienen afinidad por el hierro (III) muchos órdenes de magnitud mayor que la de Lf (Strom *et al.*, 2000, 2002).

2.2. Aplicación de las proteínas en la industria alimentaria

Las propiedades funcionales permiten el uso de las proteínas como ingredientes en alimentos, aunque generalmente se incorporan en mezclas complejas. Las características sensoriales resultan más importantes para el consumidor que el valor nutricional, el que frecuentemente se altera para lograr buenas cualidades sensoriales, como textura, sabor, color y apariencia, las que a su vez son el resultado de interacciones complejas entre los ingredientes. La forma más común de comercializar estas fuentes proteicas es la producción de concentrados de proteínas de suero (WPC) o aislados de proteínas de suero (WPI). Para la obtención de este último, se somete el lactosuero a un proceso de adsorción por intercambio iónico en agitación. El pH del suero se ajusta para proporcionar la carga adecuada sobre la molécula de proteína, se hace pasar a través del intercambiador de iones

para adsorber las moléculas de proteína y el suero desproteínizado se eluye del reactor. El pH se reajusta para desorber las proteínas, las proteínas desorbidas se eluyen del intercambiador de iones, se concentran por Ultrafiltración y se secan por aspersion. El producto resultante contiene 90% o más de proteína (Morr & Ha, 1993). Tienen diversas aplicaciones como ingredientes y aditivos alimentarios y cuyas propiedades dependen del número y tipo de proteínas presentes, así como de su pureza. Como ejemplo se puede señalar el caso de los productos de panadería, donde la viscosidad y la capacidad de formar pastas se relacionan justamente con las propiedades de las proteínas del gluten de trigo. Así mismo, las características de textura y succulencia de los productos cárnicos son dependientes de las proteínas musculares (actina, miosina, actinmiosina y proteínas de la carne solubles en agua). La textura y las propiedades de cuajado de los productos lácteos se deben a la estructura coloidal de las micelas de caseína; y la estructura de algunos pasteles y las propiedades espumantes de algunos postres o productos de confitería dependen de las propiedades de espumado y gelificación de las proteínas de la clara de huevo. Los comportamientos aquí descritos, se deben a la estructura tridimensional de las moléculas que componen el alimento (Badui, 2006). En la Tabla 2 se enlista el papel funcional de varias proteínas en diferentes alimentos.

Tabla 2. Papel de las proteínas en sistemas alimenticios (Fuente: Kinsella, 1985).

<i>Función</i>	<i>Propiedad Físico/Química</i>	<i>Alimento</i>	<i>Tipo de proteína</i>
Capacidad de dispersión	Hidrofilicidad, carga neta.	Bebidas.	Proteínas del suero. Proteínas aisladas de ajonjolí.
Gelificación	Atrapamiento de agua, formación de redes.	Cárnicos, geles, pasteles, panadería, quesos.	Proteínas musculares, proteínas del huevo y de la leche.
Adhesión-cohesión	Hidrofobicidad, interacciones iónicas y puentes de hidrógeno.	Cárnicos, salchichas, pastas y panificación.	Proteínas musculares. proteínas del huevo, proteínas del suero.
Emulsificación y espumado	Hidrofobicidad, hidrofilicidad, flexibilidad y rigidez, tamaño, estructura. Adsorción interfacial y formación de películas	Mayonesas, aderezos. Merengues, helados y productos batidos	Proteínas musculares, huevo, leche y de soya. Aislados proteicos y ajonjolí, soya, leche y huevo.
Capacidad de ligar grasa y sabores.	Interacciones hidrofóbicas, atrapamiento	Productos de panadería bajos en grasa, donas.	Proteínas lácteas, proteínas de huevo, gluten y proteínas de cereales.

2.3. Ultrasonido

El ultrasonido (US) es una forma de energía que viaja en forma de ondas de sonido iguales o mayores a 20,000 vibraciones por segundo (Hoover, 2000). En fechas recientes se ha dado un incremento importante en la aplicación del US aplicado al control de calidad de los alimentos (Robles & Ochoa, 2012) y se vislumbran nuevas aplicaciones en el procesamiento de productos. Esta tecnología emergente se

aplica con la finalidad de impartir efectos positivos en el procesamiento de alimentos (Patist & Bates, 2008, Pérez, 2014), tales como la mejora en la transferencia de masa, conservación, la asistencia de los tratamientos térmicos y de manipulación de alimentos, así como análisis de la textura (Knoorr *et al.*, 2011).

2.3.1. Clasificación del ultrasonido.

Las aplicaciones del US pueden clasificarse de acuerdo a su intensidad y al rango de frecuencia utilizado. El US de baja intensidad utiliza frecuencias mayores a 100 kHz e intensidades por debajo de 1 W/cm^2 , no causan alteraciones físicas ni químicas en el material sobre el cual actúan, por lo cual son conocidas como técnicas no destructivas o de diagnóstico; su aplicación más común es en el campo médico, pero ha sido empleado en el campo de la ingeniería de alimentos como método analítico para obtener información importante acerca de las propiedades fisicoquímicas y el estado físico de los alimentos en el área de control de calidad (Kuldiloke *et al.*, 2002).

El US de alta intensidad se aplica con frecuencias entre 20 y 100 kHz e intensidades mayores a 1 W/cm^2 y produciendo cambios fisicoquímicos en el producto evaluado; sus aplicaciones se basan en el efecto físico, mecánico y químico que las ondas transmitidas causan al alimento. Ha sido empleado en diferentes campos como la conservación de alimentos, por sus efectos en la inactivación microbiana y enzimática (Bermúdez *et al.*, 2011). Cuando es aplicado a un medio líquido, las microburbujas del líquido sufren el fenómeno de cavitación (Figura 6), en el cual se generan miles de burbujas con ciclos de expansión y compresión de forma alterna, originando microcorrientes con aumentos focalizados de temperatura y presión, responsables de su acción antimicrobiana. Estas burbujas incrementan su tamaño mediante la difusión rectificada y la coalescencia. En la difusión rectificada el transporte de masa a través de la pared de la burbuja ocurre mediante ciclos de rarefacción y compresión. En la rarefacción los gases se difunden hacia el interior de la burbuja y en la fase de compresión los gases se dirigen al exterior de la burbuja (Pérez, 2014). Debido a que el proceso de rarefacción es lento y el área superficial disponible para el transporte de masa es grande, la cantidad de gas que se

transfiere hacia la burbuja durante la fase de expansión es mayor que aquella transferida hacia afuera durante la compresión. Como consecuencia, la burbuja comienza a crecer hasta alcanzar un tamaño crítico después del cual implosionan en uno de los ciclos de compresión. Asimismo, aquellas burbujas formadas por coalescencia forman burbujas más grandes al tamaño de la resonancia, acumulándose en nodos y conduciendo a un cambio en el volumen del líquido (Ashokkumar *et al.*, 2007). Además, las burbujas generadas por la cavitación pueden ser clasificadas como estables y transitorias. (Cullen *et al.*, 2012). En la cavitación estable, el crecimiento de las burbujas se mantiene en equilibrio durante los ciclos de compresión y rarefacción, originando nubes de burbujas. En la cavitación transitoria, las burbujas tienen un periodo de existencia muy corto, en ocasiones menor a un ciclo y se caracterizan por un colapso violento. Generalmente, el colapso de las burbujas es un proceso adiabático que genera altas temperaturas al interior de la burbuja conocidas como puntos calientes. Este calor es transitorio y localizado lo cual conlleva a un aumento de temperatura global de alrededor de 5 °C (Hurtado, 2013)

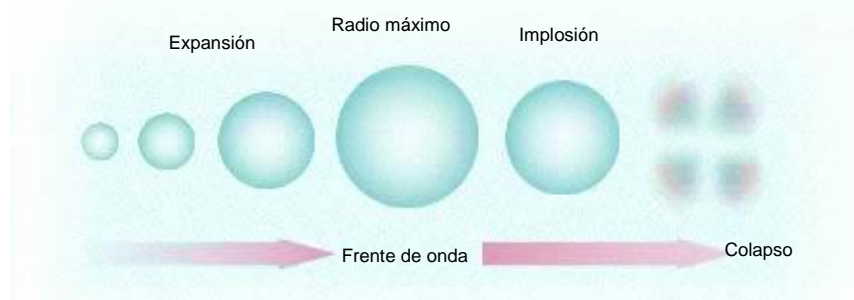


Figura 6. Fenómeno de cavitación, expansión, implosión y colapso de la burbuja (Pérez, 2014).

La cavitación ultrasónica depende de parámetros como el tipo de equipo, temperatura de proceso, presión externa, solvente empleado, frecuencia e intensidad de la onda. La amplitud y la frecuencia de la onda son parámetros de diseño que pueden ser elegidos por el usuario, sin embargo su longitud de onda, la velocidad de propagación y su coeficiente de atenuación (cociente entre energía absorbida y la energía que incide en una sustancia) son parámetros dependientes de las propiedades del material en el que se propaga (Salazar *et al.*, 2012). El

fenómeno de cavitación también ocurre en el US de baja intensidad, sin embargo, los ciclos de compresión ocurren tan rápido que las microburbujas no colapsan, por lo tanto, sus efectos no son tan severos (Salazar *et al.*, 2012). A bajas frecuencias, la cavitación transitoria es menor, no obstante, las burbujas tienen grandes dimensiones por lo que los efectos físicos ocasionados por las mismas son mayores que los químicos (Pingret *et al.*, 2013). Una burbuja a 20 kHz existe por sólo pocas oscilaciones, sin embargo, si es expuesta a 515 kHz tiene un límite de 5000 oscilaciones (Rae *et al.*, 2005).

2.4. Aplicaciones del ultrasonido

Aunque el ultrasonido se ha utilizado durante años en investigación y diagnóstico, se han logrado avances importantes en el sector alimentario, catalogando el ultrasonido como tecnología emergente, Patist & Bates en el 2008, menciona en su trabajo las aplicaciones del ultrasonido, como la emulsificación, homogeneización, extracción, reducción del tamaño de partícula y alteración de la viscosidad, concluyen que el considerable interés en ultrasonidos de alta potencia se debe a sus prometedores efectos en el procesamiento y conservación de alimentos, como mayores rendimientos de productos, menores tiempos de procesamiento, menores costos de operación y mantenimiento, mejor sabor, textura, sabor y color. Como una de las tecnologías de alimentos más avanzadas, se puede aplicar no solo para mejorar la calidad y la seguridad de los alimentos procesados, sino que también ofrece el potencial para desarrollar nuevos productos con una funcionalidad única. Ashokkumar *et al.* (2009) reportan algunas de las investigaciones en el procesamiento de lácteos, junto con descubrimientos sobre el uso del ultrasonido para modificar la funcionalidad de las proteínas lácteas, sugiriendo que los efectos físicos generados en condiciones de cavitación son la causa principal de las mejoras de la eficiencia o las modificaciones de la propiedad funcional observadas en los sistemas lecheros. En ese mismo año Ashokkumar *et al.* (2009) demostraron que el ultrasonido puede alterar significativamente la solubilidad en agua, la distribución del tamaño de partícula, la viscosidad, la resistencia del gel y la sinéresis de las

suspensiones de proteína de suero. Se mejoró notablemente la claridad de las soluciones de WPC al 5% mediante sonicación de 10- 60 min a 20 kHz y 31 W, disminuyendo el tamaño de partícula, aumentando en la capacidad de retención de agua, la fuerza de los geles así como la viscosidad, concluyendo que el procesamiento por ultrasonido puede ser efectivo para manipular y mejorar las propiedades funcionales de varios ingredientes lácteos.

O'Sullivan *et al.*, (2014), reportan el efecto del tratamiento con ultrasonido sobre las propiedades estructurales, físicas y emulsionantes de las proteínas lácteas, observando que el tratamiento redujo el tamaño y el volumen hidrodinámico de las proteínas, mientras que no se pudo medir reducción en el peso molecular. Liu *et al.*, (2014), reportan un estudio que mostró que la ultrasonicación tiene potencial para ser utilizada como una intervención manipuladora para las propiedades de unión de la leche en la fabricación de queso. El ultrasonido de alta energía se ha utilizado en los últimos años, como una alternativa para mejorar las propiedades funcionales de las proteínas, se establece como una técnica prometedora en tecnología de alimentos con un bajo impacto en el medio ambiente, convirtiéndola en una tecnología verde, (Barraza *et al.*, 2016), centran su atención en trabajos con la aplicación de ultrasonido de alta intensidad en alimentos; sus efectos en las propiedades funcionales de las proteínas; y cómo diferentes condiciones tales como la frecuencia, el tiempo, la amplitud, la temperatura y la concentración afectan las propiedades funcionales de las proteínas. Shen *et al.* (2016), reportan los efectos del ultrasonido de alta intensidad sobre las propiedades de gelificación inducidas por ácido de geles de proteína de suero, mostrando resultados en reducción de tamaño, concentración de sulfhidrilos libres, aumento en la capacidad de retención de agua, mayor firmeza y resistencia del gel. Por otra parte, Shen *et al.* (2017), reportan los resultados sobre el efecto del ultrasonido de alta intensidad en propiedades fisicoquímica y emulsionantes de aislado de proteína de suero (WPI) térmicamente agregadas, siendo este el objetivo de su trabajo, mostrando que el tratamiento de ultrasonido redujo el tamaño de partícula significativamente y una distribución de tamaño más amplia en comparación con aquellos preparados por agregación pre-térmica tratada sin tratamiento o por ultrasonido.

2.5. Aplicaciones de agregados proteicos

Las proteínas al sufrir una desnaturalización por efecto de tratamientos (físicos o químicos), dejan a exposición grupos sulfhidrilos libres que pueden reaccionar con enlaces disulfuro, iniciando el proceso de agregación. El control de la agregación de las proteínas lácteas, trae beneficios hacia la mejora o desarrollo de nuevos productos con propiedades únicas. El tamaño de los agregados proteicos puede ser controlado por el pH, el tipo y la cantidad de sal añadida, la temperatura de calentamiento y la concentración de proteína. Las proteínas de leche se han estudiado extensamente y han encontrado aplicaciones en una amplia variedad de productos. Dentro de las aplicaciones que se pueden mencionar, en el sector alimentario se encuentra como espumantes, gelificantes, emulsiones y encapsulantes. Estas propiedades pueden orientarse en productos específicos como yogur, queso, helado o algún otro producto derivado de la leche. Dependiendo del tipo de agregado formado (forma y tamaño), pueden mejorar algunas propiedades del producto. En este sentido, se han hecho estudios sobre la posible formación de estos agregados y sus aplicaciones, principalmente de β -LG- β -LG ya que proporciona mayores beneficios en productos como helados, quesos o yogur (Nicolai *et al.*, 2011); aunque hasta la fecha aún no está claro si un tipo de agregado es más útil que el otro para mejorar la formación y estabilización de emulsiones y espumas, como puede observarse en la Figura 7 (Nicolai & Duran, 2013).

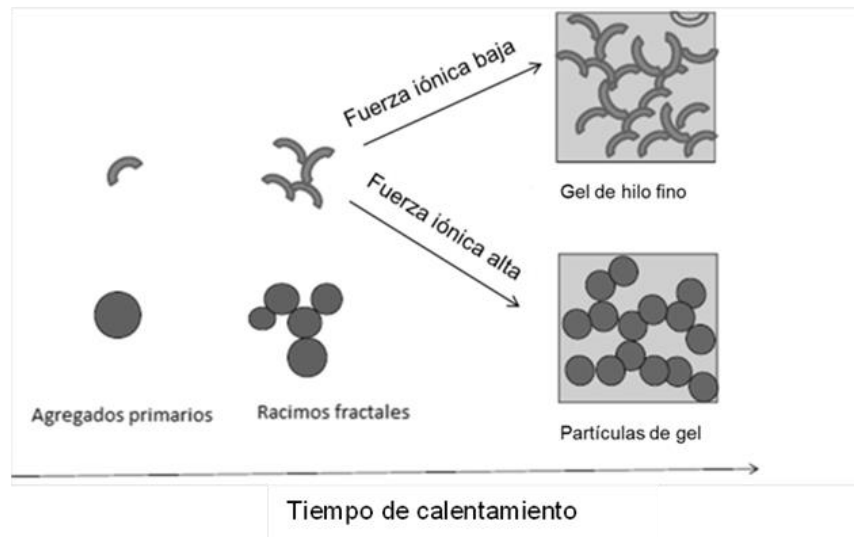


Figura 7. Representación esquemática de la formación de finas partículas de cadena o geles de proteínas globulares durante el calentamiento (Nicolai & Duran, 2013).

El tratamiento térmico es el más utilizado para lograr un control en la desnaturalización y formación de agregados proteicos. Ryan *et al* (2012) desarrollaron un trabajo sobre estabilidad y el mecanismo de agregados solubles de proteína de suero tratadas térmicamente con sales. Se realizó una comparación de aislado de proteína de suero (WPI) y β -lactoglobulina (β -LG) en su forma nativa, fueron tratadas por 5 y 10 min a 90 °C en concentraciones de 0-108 mM NaCl. Los autores concluyeron que los agregados formados bajo ciertas condiciones de pH, concentración, temperatura y tiempo del tratamiento producen mejores propiedades fisicoquímicas como solubilidad, turbidez, viscosidad, masa molar y tamaño de partícula, las cuales pueden ser utilizadas en bebidas.

Más recientemente, Chevallier *et al* (2016) publica un trabajo en el que analizó la estabilidad de las emulsiones elaboradas con proteínas lácteas (WP y caseínas). Las emulsiones se prepararon con 30% de grasa anhidra de leche y soluciones al 70 % de proteínas de suero/caseínas con concentraciones que variaron del 3 a 6 % (%p/p). Para extender la estabilidad de las emulsiones formadas, se empleó un tratamiento térmico de 120 °C durante tiempos de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 y 30 min. Este estudio mostró que las proteínas de suero en conjunto con las caseínas pueden

formar agregados que favorecen a la estabilidad de las emulsiones, en concentraciones menores de 3.5 % (p/p), aplicando tratamientos térmicos de 30 min a 120 °C.

2.6. EL YOGUR

Según la NOM-181-SCFI-2010, se denomina yogur al producto obtenido de la fermentación de leche, estandarizada o no, por medio de la acción de microorganismos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, y teniendo como resultado la reducción del pH. Estos cultivos de microorganismos serán viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de duración mínima. Si el producto es tratado térmicamente luego de la fermentación, no se aplica el requisito de microorganismos viables (FAO y OMS 2011). Ciertas leches fermentadas se caracterizan por la adición de uno o más cultivos específicos utilizado para la fermentación del siguiente modo como se enlista en la Tabla 3:

Tabla 3. leches fermentadas y cultivos característicos (FAO y OMS 2011).

Yogur:	Cultivos simbióticos de <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i>
Yogur en base a cultivos alternativos:	Cultivos de <i>Streptococcus thermophilus</i> y toda especie <i>Lactobacillus</i> .

Para la elaboración del yogur se tiene que estandarizar la matriz láctea a un nivel menor de grasa y mayores contenidos de lactosa, proteínas, minerales y vitaminas; para eso se pueden añadir sólidos lácteos no grasos (leche deshidratada descremada, suero de leche, etcétera), de tal forma que la gravedad específica aumenta de 1.03 g/mL a 1.4 g/mL y paralelamente los sólidos no grasos suben a 12%. También se añaden gomas, estabilizantes, saborizantes y edulcorantes. La pasteurización destruye la mayoría de la microflora propia de la leche, lo que permite un campo libre para los cultivos lácteos que se añaden posteriormente; la interacción de la *k* caseína y la β -lactoglobulina provocada por el tratamiento térmico

controlado (85°C/25 minutos) y favorecida por el pH y la presencia de calcio, crea una nueva estructura que tiene una mejor capacidad de absorción de agua que dará como resultado un gel más firme y terso, de mayor viscosidad que no presenta sinéresis. La homogeneización, después de la pasteurización, estabiliza la grasa en pequeñas partículas que previenen el cremado durante la fermentación, y mejora la textura por la interacción entre las caseínas y los glóbulos de grasa Arjmandi, *et al* (2004).

En estas condiciones, la leche se inocula utilizando microorganismos, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, que actúan de una manera sinérgica a 40-45°C. El ácido láctico, producido a partir de la lactosa, baja el pH hasta 5 en donde se inicia la formación del coágulo. El sabor y aroma se deben al ácido láctico, además del acetaldehído, la acetona, el diacetilo y a otros compuestos con grupos carbonilo. Son muchas las variables que afectan las propiedades de estos derivados, tales como el calentamiento, el contenido proteínico, la homogeneización, la acidez alcanzada en la fermentación, el tipo de cultivo y la presencia de estabilizadores (Damodaran, 1996).

III. JUSTIFICACIÓN

La falta de información sobre la formación de agregados proteicos por efecto del ultrasonido (US), representa un área importante de investigación. La aplicación de US en el suero de leche ha obtenido resultados favorables en las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas para la elaboración de productos lácteos (yogur), sin embargo, su estudio ha sido limitado. Por tanto, resulta en un argumento adicional para enfocar las investigaciones en determinar las agregaciones de estas proteínas, en función de su presencia y concentración para dirigir la materia prima hacia un producto como es el yogur.

En este sentido, la Cámara Nacional de Industriales de la Leche (CANILEC, 2016), indica que uno de los mayores retos para la industria láctea nacional es la Innovación y creatividad en productos terminados y tecnología para dar valor agregado. Basado en esto, la posibilidad de realizar investigación en ciencia básica y buscar su aplicación industrial traerá beneficios para ambas partes.

IV. HIPÓTESIS

El tratamiento de ultrasonicación tendrá efectos positivos en la formación de agregados proteicos sobre aislado de proteína de suero, para su aplicación en la mejora de propiedades funcionales y fisicoquímicas del yogur.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general.

Determinar el efecto del tratamiento de ultrasonificación sobre WPI en solución modelo agua, así como su aplicación en la mejora de las características fisicoquímicas y funcionales de yogur.

5.2. Objetivos específicos.

1. Evaluar el efecto de distintos tratamientos de ultrasonificación sobre WPI en sistema modelo agua, por medio de técnicas ópticas (FTIR) y técnicas tradicionales (HPLC, difractometría láser, electroforesis, AFM y sulfhidrilos libres).
2. Determinar la formación de agregados proteicos en WPI en solución modelo agua por efecto del tratamiento de ultrasonificación.
3. Elaborar yogur con WPI bajo diferentes tratamientos de ultrasonificación.
4. Comparar yogur con WPI tratado por ultrasonificación y un producto elaborado de forma tradicional llevando a cabo análisis de textura y parámetros fisicoquímicos (fuerza del gel, viscosidad y % de sinéresis)

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Preparación de las muestras.

Las muestras se prepararon con WPI bioPro (90 % de proteína, 0 % de grasa y 0 % de carbohidratos), hecho y distribuido por Agropur inc. (Davisco Business Unit), a concentración similar a la real en leche del 3.0 %, en solución modelo agua; a las muestras se les modificó el pH utilizando HCl y NaOH al 0.1M y la fuerza iónica (FI) con CaCl₂, posteriormente se aplicó el tratamiento de sonicación, utilizando un volumen de 100 mL para cada muestra y los controles, como se muestra en la Tabla 6, capítulo VII (resultados y discusiones).

6.2. Tratamientos de ultrasonificación.

Las muestras de WPI al 3 % se sometieron a tratamientos de ultrasonificación de 4 y 6 min (estos tiempos se definieron en base a trabajos realizados anteriormente por Gallegos, 2015 y Gibbens, 2016; concluyendo que el tiempo óptimo de sonicación es no mayor a 6 minutos para evitar mayor daño a propiedades funcionales del producto final) con potencia teórica de salida de 400 W. El ultrasonido se aplicó utilizando un procesador ultrasónico OMMNI SONIC RUPTOR-EU (Figura 8), a una amplitud de 100 % y frecuencia fija de 24 kHz, se utilizó un sonotrodo de 12.7 mm de diámetro (H22), introduciendo el sonotrodo a 3 cm dentro de cada muestra de WPI. Para la calibración del sonotrodo se empleó WPI en solución agua para establecer la potencia real efectiva que llega a la muestra utilizando la misma amplitud y frecuencia antes mencionadas.



Figura 8. Termosonicador.

La potencia efectiva de los tratamientos se calculó a partir del método calorimétrico (Torkamani *et al.*, 2014), mediante la ecuación 1:

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

Dónde:

P_n = Potencia efectiva en W

m_n = la masa utilizada en el tratamiento, en kg

(dT/dt) = diferencial de la relación tiempo/temperatura para cada tratamiento de sonicación

C_p = calor específico para la muestra en J/(kg °C).

El C_p se calcula a partir de la composición proporcionada por el proveedor y se emplea la ecuación de Choi y Okos (Singh & Heldman, 2009) (Ec. 2):

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

Donde:

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

X_i es la fracción peso del componente i

Los calores específicos para los componentes del WPI se determinaron con las siguientes fórmulas (Singh & Heldman, 2009) utilizando la temperatura promedio (T) registrada en cada tratamiento:

Proteína	$C_p=2.0082+1.2089 \times 10^{-3}T-1.3129 \times 10^{-6}T^2$
Grasa	$C_p=1.9842+1.4733 \times 10^{-3}T-4.8008 \times 10^{-6}T^2$
Lactosa	$C_p=1.5488+1.9625 \times 10^{-3}T-5.9399 \times 10^{-6}T^2$
Cenizas	$C_p=1.0926+1.8896 \times 10^{-3}T-3.6817 \times 10^{-6}T^2$
Agua	$C_p =4.1762 - 9.0864 \times 10^{-5} T +5.4731 \times 10^{-6}T^2$

6.3. Espectrometría de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).

Esta técnica óptica se fundamenta en la vibración de los enlaces presentes en la muestra, ya que al hacer incidir una energía de radiación a la muestra, se obtiene una respuesta óptica de la misma (absorbancia, reflexión, transmisión, dispersión o fluorescencia). La respuesta óptica dependerá de la energía con la que sea irradiada la muestra. La finalidad con la que se utilizó esta técnica es identificar cambios en la estructura secundaria de la proteína, se utilizó un espectrómetro marca Bruker® modelo Vertex 70 en el modo de Reflectancia Total Atenuada (ATR por sus siglas en inglés). Para el análisis se colocó una alícuota de 10 μ L de cada una de las muestras y se colectó el espectro dentro de la región del infrarrojo mediano entre 4000-650 cm^{-1} (Ruvalcaba, 2015), realizando 3 mediciones por muestra, después de haber aplicado el tratamiento y posteriormente a las 6 y 24 horas. Posteriormente los datos espectrales de las muestras fueron analizados mediante PCA para evaluar tendencias de agrupación entre las muestras control y aquellas con tratamiento de US, modificación de pH y FI. Para ello se utilizó el programa OriginPro (versión 8).

6.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE por sus siglas en inglés), se fundamenta en la movilidad de las proteínas bajo un campo eléctrico, el desplazamiento de estas dependerá de algunas de sus características como es, su peso molecular, forma y tamaño. Para el análisis de PAGE-nativo, se prepararon las muestras en tubos eppendorf de 1.5 mL, colocando 20 μ L de muestra y 20 μ L de Buffer de carga. En cada pozo se cargó 3 μ L de cada muestra y 8 μ L del marcador de peso molecular. Para SDS-PAGE, se prepararon las muestras en tubos eppendorf de 1.5 mL, añadiendo en cada tubo, 10 μ L de muestra, 3 μ L de Buffer de carga y 7 μ L de agua destilada, posteriormente las muestras se calentaron a 95 °C en un thermomixer compact durante 5 min. En cada pozo se cargó 1 μ L y del marcador (10-250 kDa) 7 μ L. El gel se realizó a una concentración del 12% que funciona para proteínas con un PM \leq 50 kDa; a continuación, en la Tabla 4, se presenta la composición del gel de separación y del gel concentrador. Para el buffer de carga se utilizaron los componentes que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 4. Gel de separación y concentración.

Componentes	Gel de separación (mL)	Gel concentrador (mL)
Agua destilada	1.93-1.88	0.87-0.86
1.5 M Tris-HCl, pH8.8	1.38	---
1.5 M Tris-HCl, pH6.8	---	0.37
Acrilamida/Bisacrilamida (30 % / 0.8 % w/v).	2.2	0.23
10 % (w/v) amonio persulfato	0.03	0.22
TEMED	0.00275	0.003
SDS	0.00055	0.15

Tabla 5. Componentes del buffer de carga.

Componentes	Concentración (mL)
Agua destilada	5.5
1.5 M Tris – Cl pH 6.8	1.25
Glycerol	3
Azul de bromofenol 0.5 %	0.2

El marcador de peso molecular posee un intervalo de pesos de 14-380 kDa (nativo) y de 10-250 kDa (SDS). Se realizó una curva de calibración para determinar la concentración cargada en cada pozo ($\mu\text{g/mL}$), como puede observarse en el Anexo 10.1

6.5. Cromatografía de alta resolución (HPLC).

Esta técnica, se fundamenta en la separación de mezclas, logrando una purificación de los compuestos presentes. Para este procedimiento cromatográfico se utilizó un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) 1260 Infinity (Agilent Technologies, E.U.A.) equipado con un detector de UV visible. La fase móvil consistió en una mezcla de una solución A (0.1% de ácido trifluoroacético en agua) y B (0.1% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo) en un gradiente de concentración desde una relación 65-35 de A y B respectivamente, hasta 0-100 de A y B en un tiempo de 22 minutos. La temperatura durante la separación se mantuvo constante a 40 °C. La fase estacionaria consistió en una columna C18 de fase reversa de silica gel (250 x 4.6 mm) con un diámetro de partícula de 5 μm y ancho de poro de 3000 nm. La detección se llevó a cabo por UV visible a una longitud de onda de 220 nm (Ruvalcaba, 2015).

6.6. Sulfhidrilos libres.

6.6.1. Referencia del método.

La determinación de los sulfhidrilos libres en las muestras de proteínas y leche se llevó a cabo con respecto al método descrito por Guingamp *et al.* (1993).

6.6.2. Preparación de la muestra.

Se tomó 0.5 mL de la muestra y 0.5 mL de agua desionizada, teniendo una relación 1:1. Estos volúmenes se colocaron en tubos de ensayo. Posteriormente se tomó 1 mL de buffer de urea a 8 M y se agregó al tubo que contenía la muestra. Después se agregó 50 µL de solución DNTB y se agitó en vortex. Se mantuvieron de 3 a 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez pasado el tiempo se añadió 0.5 mL de EDTA a 0.2M y de nuevo se agitó en vortex. Se calentaron las muestras a 37 °C durante 5 minutos. Una vez pasado el tiempo, se dejaron enfriar para medir absorbancia (A_S) a 412 nm.

Blanco 1 (B1) = es igual, pero sin muestra.

Blanco 2 (B2) = todos los reactivos menos DTNB (A_{BM}). El blanco 2 se lee contra B3.

Blanco 3 (B3) = todos los reactivos menos DTNB y muestra.

$$A_F = A_S - A_{BM} \quad (\text{Ec. 3})$$

Para la cuantificación se prepara una recta de calibración con L-cisteína hidrociorada anhídrida (98% pureza). Los resultados serán expresados en micromoles de SH/g sólidos no grasos.

6.7. Determinación de tamaño de partícula.

La distribución de tamaño de partícula se determinó mediante un equipo Bluewave, 3500, Nanotrak (Montgomeryville, E.U.A.) el cual se basa en la teoría MIE, que permite transformar los datos de medida de las distribuciones de intensidad a medidas en volumen. Resuelve exactamente la interacción electromagnética con la materia y predice los máximos y mínimos de intensidad de la dispersión de la luz producidos por las partículas cuando éstas son bombardeadas por un haz Láser.

Esto permite una total seguridad y precisión de la medida en todo el rango de tamaño entre 0.02 y 2000 μm típicamente (Malvern Instruments, 2000).

El diámetro medido por este método es llamado diámetro hidrodinámico y se refiere a la manera en que la partícula se difunde dentro del fluido. Los datos de las mediciones serán obtenidos mediante el software Microtrac Flex 11. Las lecturas se realizarán colocando 1.5 mL de muestra en el equipo y manteniendo la temperatura controlada ($40 \pm 1^\circ\text{C}$) mediante una celda peltier durante el análisis. El índice de refracción utilizado fue de 1.33 para el agua (Hayes & Kelly, 2003). Cada medición fue realizada por duplicado. El análisis de datos se realizará utilizando distribuciones de volumen y calculando el diámetro promedio en volumen $D_{[4,3]}$, el diámetro promedio en superficie (promedio Sauter) $D_{[3,2]}$ y los diámetros promedio debajo del cual se encuentran el 90, 50, y 10% del volumen total de partículas (D_{90} , D_{50} , D_{10}). Para determinar $D_{[4,3]}$ y $D_{[3,2]}$ se emplearán las ecuaciones 4 y 5:

$$\text{(Ec. 5)} \quad D_{[3,2]} = \frac{\sum_1^n D_i^3 v_i}{\sum_1^n D_i^2 v_i} \quad D_{[4,3]} = \frac{\sum_1^n D_i^4 v_i}{\sum_1^n D_i^3 v_i} \quad \text{(Ec. 4)}$$

6.8. Microscopia de fuerza atómica (AFM).

Se empleó para observar la topografía de los agregados en forma de complejo o polímero (Silva, 2005).

6.8.1. Preparación de la muestra.

Las muestras se colocaron en soportes de vidrio (1 x 1 cm) los cuales son lavados con anterioridad como se describe a continuación; se dejaron durante 10 min en acetona. Posteriormente se pasaron a una solución de alcohol al 70 % por 10 min, seguido de 10 minutos en HCL al 0.1 M, terminando el tiempo se colocaron en una caja Petri, cuidando que no quedaran uno sobre otro. Se llevaron a una estufa de secado durante 15 min aproximadamente a una temperatura de 35-40 $^\circ\text{C}$. Una vez

que los soportes de vidrio están lavados, se tomó un 1 μ L de las muestras dejándola caer sobre el vidrio, evitando aglomeración de la muestra en un solo punto del soporte, una vez que secaron perfectamente; se procedió a la toma de imágenes, para lo cual se utilizó un equipo de AFM-QSCOPE 250, en modo de medición intermitente o tapping.

6.9. Determinación de propiedades funcionales.

Morr y colaboradores en 1993, definieron como propiedades funcionales aquellas (propiedades fisicoquímicas) que influyen en la estructura, apariencia, textura, viscosidad, sabor, entre otras. Las propiedades funcionales que se evaluarán en este proyecto de tesis se describen a continuación.

6.9.1. Capacidad de retención de agua (CRA).

Para la determinación de la CRA, se elaboraron geles con las muestras, utilizando el método Holder (Updegrave, 2005), que consistió en poner las muestras en baño maría a una temperatura de 85 °C por 30 minutos, posteriormente se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente, para la determinación de porcentaje de humedad, se utilizó una termobalanza (PROBASSCA, MB45), en una charola de aluminio que es colocada dentro de la termobalanza, se pesa 1 g de la muestra y se inicia la medición a temperatura de 105 °C. En tubos Falcón se pesan 3 g de muestra y se procedió a centrifugar (Hermle z323k- Woodbridge, NJ, capacidad de 4 x 100 mL hasta 5000 rpm) durante 40 min a 4500 rpm con temperatura de 10 °C, una vez terminado el tiempo, se midió el volumen del exudado (mL). Para la determinación de CRA se utilizó la ecuación 6.

$$\text{CRA} = \left(\frac{M * m_o}{100} - E \right) \left(\frac{100}{M - E} \right) \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde: M = Peso de la muestra antes de centrifugar, E = Masa de exudado, m_o = Porcentaje inicial de contenido de humedad de la cuajada (base húmeda).

6.9.2. Viscosidad en geles.

Para las pruebas de viscosidad, se utilizó un Reómetro marca Brookfield, modelo RST-CP, EU, se colocó 1 g de muestra; los parámetros para la medición fueron los siguientes: velocidad 100 rpm durante 60 s, tomando 10 puntos de medición a temperatura constante 25 ± 1 °C.

6.10. Determinación de la hidrofobicidad de superficie (H_0).

La hidrofobicidad de la superficie ANS de las muestras se determinó usando la sonda de fluorescencia, 1-anilino-8-naftalenosulfonato (8mM en tampón de fosfato 10 mM, pH 7,2), de acuerdo con un método de la literatura Wang *et al.* (2013), con modificaciones. Cada muestra se diluyó utilizando una relación muestra / tampón (1:5). Se añadieron 20 μ L de solución de ANS a 4 mL de cada solución de proteína ya diluida. La intensidad de fluorescencia (longitud de onda de excitación y emisión fue de 365 nm y 484 nm, respectivamente) se midió usando un espectrofluorómetro Ocean Optics (USB4000-FL). El índice de hidrofobicidad superficial de las soluciones se calculó a partir de la pendiente inicial de la intensidad de fluorescencia frente a la concentración de proteína como un índice de hidrofobicidad de superficie (H_0).

6.11. Turbidez.

Para la determinación de la turbidez (asociado a la agregación de proteínas), se midió a 400 nm la absorbancia de las muestras de proteína; para ello, se empleó un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific Evolution 600 (England EV6-171104) y una celda de cuarzo, como blanco se utilizó agua Mili-Q.

6.12. Calorimetría diferencial de Barrido (DSC).

El impacto del ultrasonido sobre las propiedades térmicas de los agregados de proteína de suero de leche se evaluó usando un Calorímetro de Barrido Diferencial (NETZSCH STA 409 PC/PG, EU). Aproximadamente 20 mg de muestras de WPI en solución agua al 3 % (p / v) se colocaron en bandejas de aluminio y se pesaron de manera precisa, luego las bandejas se sellaron herméticamente. La temperatura aumentó de 20 a 100 °C por 5 °C / min.



Figura 9. Equipo de calorimetría diferencial de barrido

6.13. Determinación de potencial zeta

El potencial zeta (ζ , mV) se determinó a partir de la medición de la movilidad electroforética (E) usando velocimetría Doppler láser y dispersión de luz de análisis de fase usando un Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Reino Unido). Las soluciones se colocaron en la celda de movilidad electroforética y se analizaron con

un ángulo de dispersión de 173°. El potencial zeta (ζ) se calculó en base a la ecuación de Henry, ecuación 7:

$$\zeta U_E = (2\varepsilon \times \zeta \times f(\kappa\alpha))/3\eta \quad \text{Ec. 7}$$

Donde ε es la permitividad F (Farad/m), η es la viscosidad de la solución (mPa.s), κ es la longitud de Debye (nm^{-1}) y α es el radio de la partícula (Nuevo México. $G(\kappa\alpha)$ es igual a 1.5 basado en la aproximación de Smoluchowski (Helgason *et al.*, 2009).

6.14. Elaboración del yogur

Para la elaboración del yogur se realizaron 3 formulaciones como se muestran en la Tabla 6. La primera formulación se refiere al yogur elaborado de forma tradicional, la segunda y tercera formulación al yogur con WPI tratado, como se mencionó anteriormente 6.1. preparación de las muestras. Las muestras estaban en estado líquido por lo que se tuvieron que liofilizar para adicionarse de forma solida al proceso de elaboración de yogur; un día antes de liofilizar las muestras se ultracongelaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$, se utilizó una liofilizadora (LABCONCO fabricada en USA). Las condiciones del proceso fueron las siguientes; temperatura de $-55\text{ }^\circ\text{C}$ y vacío 0.020 mBar. El yogur se elaboró de la forma en que se presenta en la Figura 10. Los tratamientos T1 y T2 se eligieron por mostrar los mejores resultados en las pruebas realizadas de CRA y viscosidad de gel. El inóculo utilizado fue yogur natural, marca alpura.

Tabla 6. Formulaciones para elaboración del yogur.

Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3
leche (94 %)	Leche 150 mL	leche 150 mL
Leche en polvo (6%)	WPI ^{T1} 2.5 g	*WPI ^{T2} 2.5 g
Inóculo 2 g	Inóculo 2 g	Inóculo 2 g

*WPI T1, pH7 0.1 M-4 min WPI T2; pH7-0.1 M-6 min

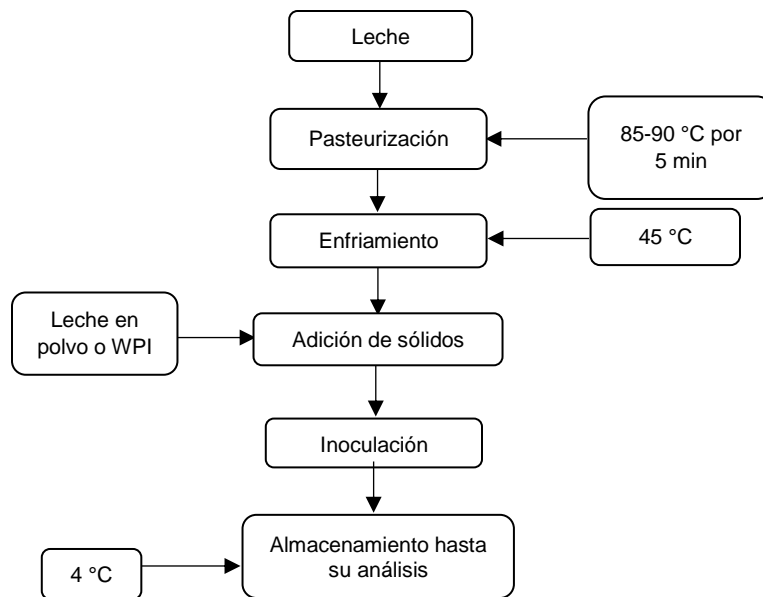


Figura 10. Diagrama de flujo del yogur.

6.14.1. Análisis de firmeza de gel

De cada muestra de yogur se determinó firmeza de gel utilizando un texturómetro TA.XT Plus (Fig. 11). El análisis fue llevado a cabo utilizando una sonda cilíndrica de 1.6 cm de diámetro. El producto fue sometido a una fuerza de compresión por sonda hasta una distancia de 20 mm. Las condiciones establecidas en el analizador de textura para medir la firmeza (g) del yogur fueron las siguientes: Velocidad de prueba previa, 1 mm / s; Velocidad posterior a la prueba, 1 mm / s; Velocidad de prueba, 0.5 mm / s; Fuerza de disparo, 10.0 g; Tiempo, 48.0 s, las mediciones se realizaron por duplicado.



Figura 11. Texturómetro TA.XT Plus.

6.14.2. Determinación de sinéresis

El porcentaje de sinéresis de las muestras de yogur fue determinado de acuerdo al método descrito por Farnsworth *et al.* (2006) con algunas modificaciones, las muestras de yogur (15 g) fueron pesadas en tubos para posteriormente llevarlas a centrifugación (Hermle z323k- Woodbridge, NJ, capacidad de 4 x 100 mL hasta 5000 rpm) durante 10 min a 4 °C; el cálculo se realizó utilizando la Ecuación 8.

$$\% \text{ de Sinéresis} = \frac{\text{Exudado (g)}}{\text{Peso de la muestra (g)}} \times 100 \quad (\text{Ec. 8})$$

6.14.3. Viscosidad del yogur

Para las pruebas de viscosidad, se utilizó un Reómetro marca Brookfield, modelo RST-CP, EU, se colocó 1 g de muestra, los parámetros para la medición fueron los siguientes: velocidad 100 rpm durante 60 s, tomando 10 puntos de medición a temperatura constante 25 ± 1 °C.

6.14.4. Análisis estadístico.

Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza de una vía (por sus siglas en inglés ANOVA) y diferencia mínima significancia (Tukey) como pruebas post hoc, se utilizó el software Minitab (versión 17), para determinar si había diferencias significativas entre cada yogur. Se realizaron análisis estadísticos sobre, análisis de firmeza de gel, % de sinéresis y los valores de viscosidad.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se preparo una disolución con aislado de proteína de suero (WPI-Bipro) en solución modelo agua a una concentración del 3 % (w/v). Se dividió el volumen de la disolución en 15 muestras quedando de 100 mL cada una de las muestras, de las cuales 7 son controles y 8 muestras tratadas, como se muestra en la Tabla 7. Las muestras enumeradas del 8 al 15 se trataron por sonicación (con una potencia real entregada al sistema de 49.67 ± 0.78 W en las soluciones de WPI), así como los controles respectivamente, posteriormente se almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

El contenido de grasa en los sistemas lácteos puede actuar como un aislante con respecto a la energía real recibida en los mismos. En este caso, cuando el sistema no contiene grasa (biPro-WPI 0 % de grasa), las ondas sónicas pueden viajar con mayor libertad por el medio a comparación cuando el medio contiene un alto contenido graso (Gibbens, 2016).

Tabla 7. Tratamientos de ultrasonificación, pH y fuerza iónica.

<i>Muestra</i>	<i>pH</i>	<i>Fuerza iónica</i>	<i>Tiempo de ultrasonificación</i>
*WPI ¹	-	-	-
*WPI ²	7	-	-
*WPI ³	4	-	-
*WPI ⁴	-	0.1	-
*WPI ⁵	-	0.2	-
*WPI ⁶	-	-	4
*WPI ⁷	-	-	6
8	7	0.1	4
9	7	0.1	6
10	7	0.2	4
11	7	0.2	6
12	4	0.1	4
13	4	0.1	6
14	4	0.2	4
15	4	0.2	6

*WPI 1,2,3,4,5,6 y7 son controles.

7.1. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier.

En las siguientes ocho figuras se muestran los espectros de muestras tratadas por ultrasonicación, en todas ellas las líneas continuas son los controles contra los cuales se hará la comparación y discusión del efecto del tratamiento, la línea en color mangenta es el WPI sin tratamiento, las líneas continuas roja, azul, negra y verde, son las muestras analizadas bajo las condiciones experimentales mencionadas con anterioridad, las líneas intermitentes y punteadas son las muestras analizadas después de 6 y 24 horas respectivamente y su color representa las condiciones experimentales a las cuales fueron sometidas. Es notorio como el espectro correspondiente al WPI sin tratamiento no presenta picos definidos dentro de la banda de la amida I.

En la Figura 12 se muestran los espectros de las muestras obtenidos después del tratamiento aplicado (tiempo 0), 6 y 24 horas, así como su control. El espectro que pertenece a la muestra de WPI en solución agua con modificación de pH, FI y 4 min de ultrasonicación (línea punteada color verde), se observan picos que se definen posterior a las 6 horas ubicados a 1631 cm^{-1} , 1651 cm^{-1} y 1683 cm^{-1} que corresponden a hojas β , α -hélices y estructuras giro respectivamente, todo esto en la región de la Amida I ($1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$). Estos picos ya fueron identificados anteriormente por varios autores como Nevskaya *et al.*, (1976); Gimel *et al.*, (1994); Antony *et al.*, (2005) y más actual Barth, (2007).

Al presentarse cambios en la banda de la amida I y el hecho que estos cambios se mantuvieran presentes después de 6 y 24 horas, nos permiten determinar que, si hubo desnaturalización irreversible por efecto del tratamiento de ultrasonido, la muestra con mayores cambios sobre la región proteica, es cuando únicamente el tratamiento de ultrasonicación está presente, línea color negro (US 4 min).

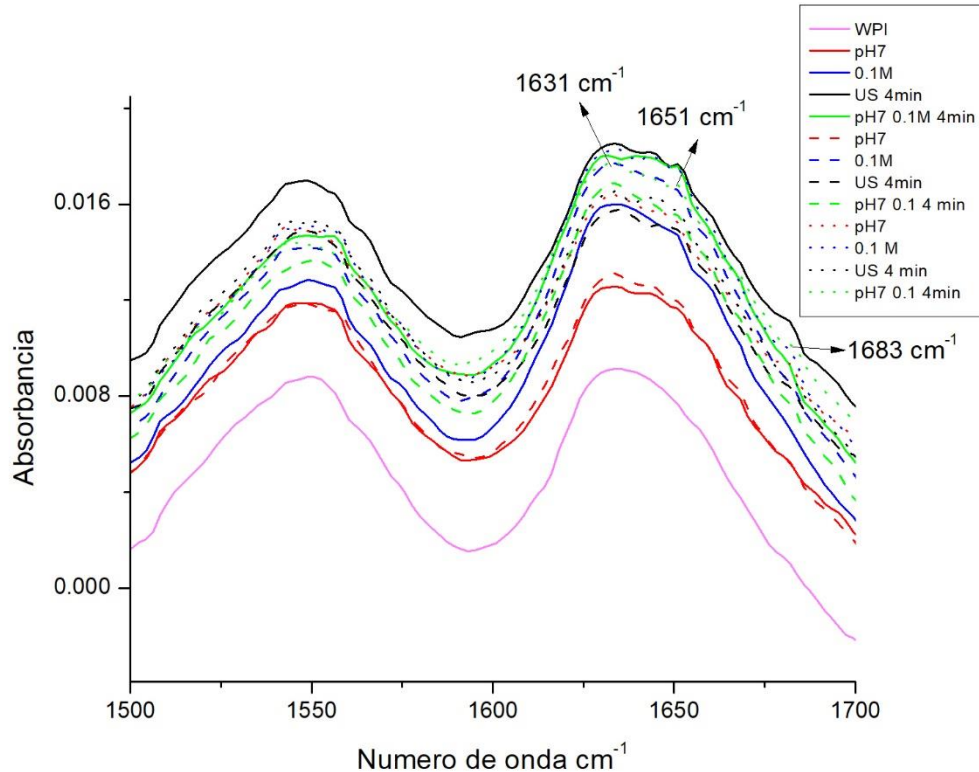


Figura 12. Espectros de proteína de suero aislada en solución modelo agua a pH 7 FI 0.1 M ultrasonificada por 4 min al 3 % y controles. tiempo 0 (líneas continuas —), 6 horas (líneas intermitentes - - -) y 24 horas (líneas punteadas).

Los espectros que se muestran a continuación (Figura 13), corresponden a la muestra de WPI en solución agua, con modificaciones de pH7, FI 0.1 M y tiempo de ultrasonificación 6min. Se observan específicamente en la línea color verde punteada dos picos uno a 1635 cm^{-1} y otro a 1645 cm^{-1} , los cuales están asociados a hojas β y α -hélices respectivamente, Barth, (2007). El corrimiento, ensanchamiento y definición de picos, todo esto en la región de la Amida I ($1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$), se debe al tiempo de exposición al que la proteína fue sometida durante el tratamiento de ultrasonificación y modificaciones de condiciones en su entorno Shen *et al* (2017). Como en el tratamiento anterior el hecho de que el comportamiento espectral difiera del control y se mantenga durante el tiempo en stock, nos permite afirmar que, si hay desnaturalización y posteriormente agregación, esto se pudo confirmar en los análisis electroforéticos que más adelante se presentaran (sección 7.2).

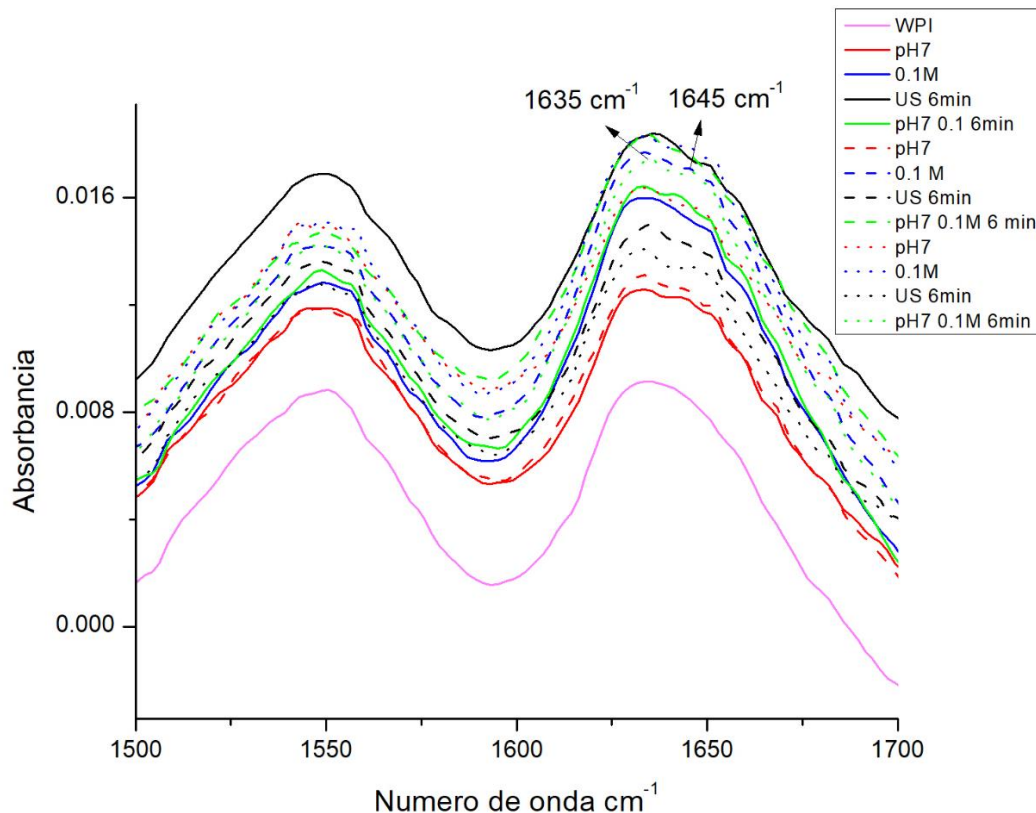


Figura 13. Espectros de proteína de suero aislada en solución modelo agua a pH 7 FI 0.1 M ultrasonificada por 6 min al 3 % y controles. tiempo 0 (líneas continuas —), 6 horas (líneas intermitentes- -) y 24 horas (líneas punteadas).

En la Figura 14 se presentan los espectros obtenidos de la muestra de WPI en solución agua con modificación de pH 7, FI 0.2 M y tiempo de ultrasonificación de 4 minutos. enfocándonos en la región de la Amida I (1600-1700 cm^{-1}), observamos los cambios con respecto al control (línea color magenta) mediante la definición de picos a 1632, 1651, 1665 y 1682 cm^{-1} asociados los dos primeros a hojas β , y los dos últimos a α -hélices y estructuras giro. Se evidencia que después de las 6 horas el efecto mostrado en la muestra control que tiene presente los tres parámetros (línea color verde- continua), disminuye mostrando similitud con el espectro control del WPI, sin embargo, la desnaturalización proteica generada es irreversible. esto se le adjudica al tratamiento de ultrasonificación aplicado. Como se puede observar en los espectros correspondientes a los controles, el que genera mayores cambios cuando el tratamiento de ultrasonido está presente, este resultado es similar al que se presentó con pH4, estos resultados coinciden con los reportados por Barraza *et*

al. (2016) quienes concluyen que la aplicación de ultrasonido de alta intensidad (10–1000 W/cm² con 20–100 kHz frecuencia) es una buena tecnología alternativa para mejorar las propiedades funcionales de las proteínas principalmente a través del efecto de la cavitación generando como primer paso la desnaturalización de estas.

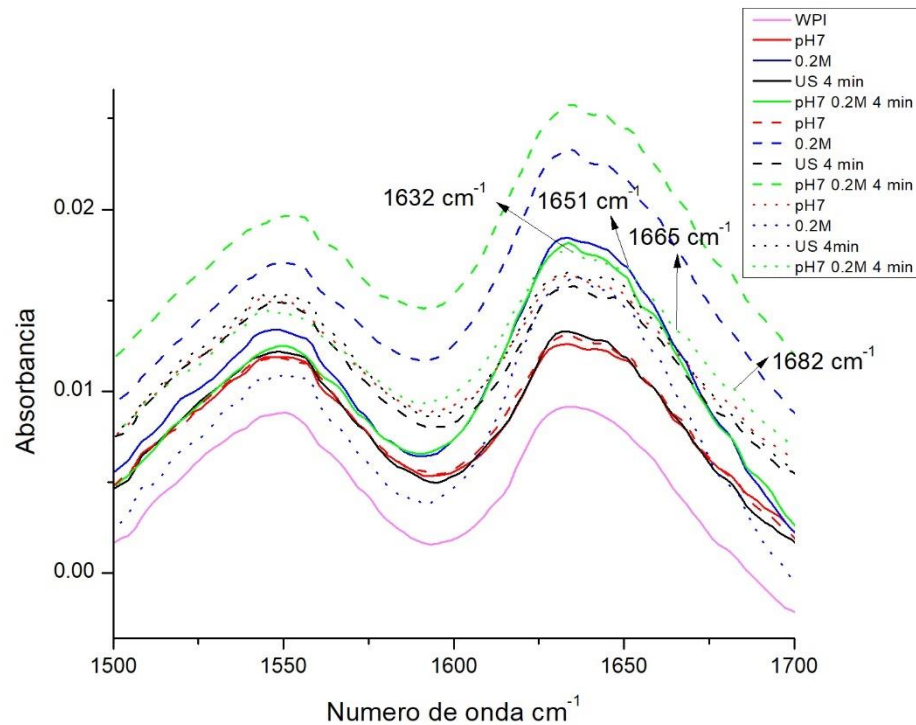


Figura 14. Espectros de proteína de suero aislada en solución modelo agua a pH 7 FI 0.2 M ultrasonificada por 4 min al 3 % y controles. tiempo 0 (líneas continuas —), 6 horas (líneas intermitentes - - -) y 24 horas (líneas punteadas).

En la Figura 15 se presentan los espectros obtenidos de la muestra de WPI con pH 7, FI 0.2 y tiempo de ultrasonificación de 6 minutos, después del tratamiento aplicado (líneas continuas), 6 horas (línea intermitente) y 24 horas (línea punteada). Nuevamente si nos enfocándonos en la región de la Amida I (1600-1700 cm⁻¹), se observa la definición de picos a 1631 cm⁻¹, 1644 cm⁻¹, 1652 cm⁻¹ y 1683 cm⁻¹ (hojas β, α-hélices, y estructuras giro). Esto es más evidente en los casos en que el tratamiento de ultrasonificación es aplicado por si solo y/o en conjunto modificando el pH y FI (líneas punteadas color negra y verde respectivamente).

Como se mencionó con anterioridad el hecho que las bandas con respecto al control tengan comportamiento diferente y que el mismo se mantenga por 6 y 24 horas, nos

permite concluir que bajo estas condiciones la desnaturalización proteica es irreversible, el porcentaje de pérdida de proteína nativa se determinó por medio de la técnica de HPLC que más adelante se presentaran (sección 7.3.), los cuales son congruentes con lo observado por medio de esta técnica.

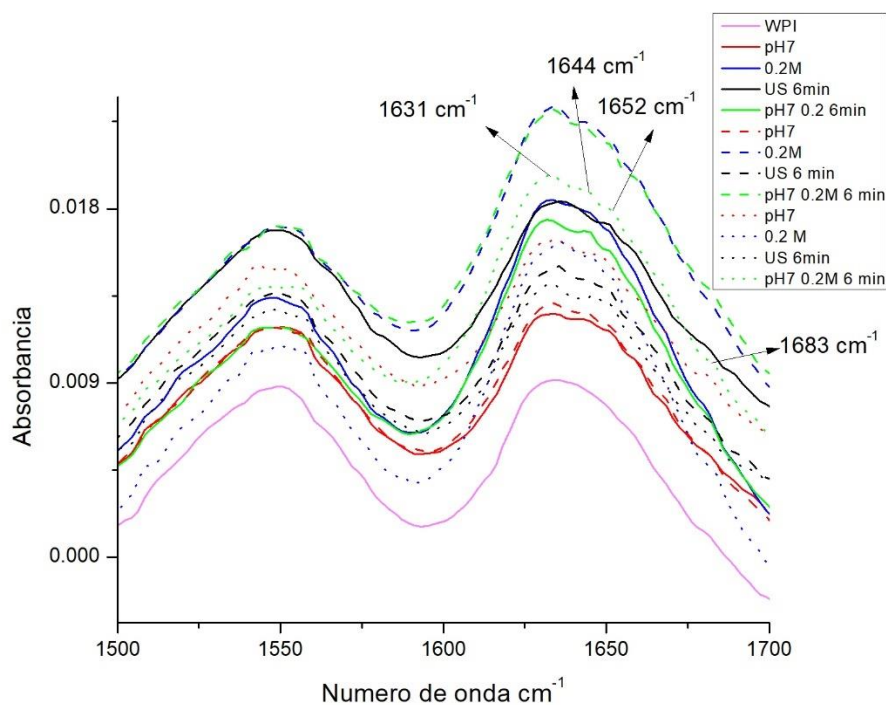


Figura 15. Espectros de proteína de suero aislada en solución modelo agua a pH 7 FI 0.2 M ultrasonificada por 6 min al 3 % y controles. tiempo 0 (líneas continuas —), 6 horas (líneas intermitentes - - -) y 24 horas (líneas punteadas).

En la Figura 16 se presentan los espectros de la muestra de WPI al 3 % en solución agua con modificación de pH 4, FI 0.1 y 4 minutos de ultrasonificación. Las líneas solidas representan los espectros obtenidos después del tratamiento aplicado, las líneas intermitentes después de las 6 horas y las líneas punteadas después de las 24 horas, así como los controles. Se observan picos a 1630 cm^{-1} , 1641 cm^{-1} y 1652 cm^{-1} , asociados a hojas β y α -hélices respectivamente. Estas contribuciones ya fueron asignadas por algunos autores mencionados anteriormente.

Enfocándonos en la región de la Amida I ($1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$), en esta región ha sido más concreta la asociación de las estructuras con la vibración de enlaces en un determinado número de onda (Barth, 2007); el espectro de la línea verde punteada,

asociado a la presencia de los tres parámetros a la vez cumplidas las 24 horas, hacen notorio que los cambios generados se mantienen sugiriendo desnaturalización irreversible.

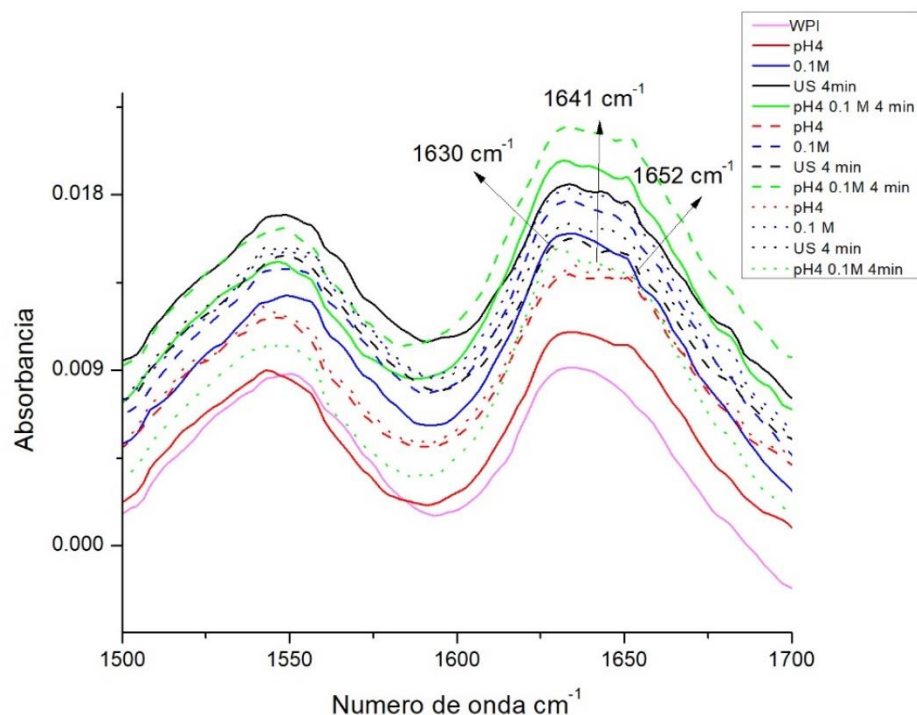


Figura 16. Espectros de proteína de suero aislada en solución modelo agua a pH4 FI 0.1 M ultrasonificada por 4 min al 3 % y controles. tiempo 0 (líneas continuas —), 6 horas (líneas intermitentes - - -) y 24 horas (líneas punteadas).

En la siguiente figura se presentan los espectros obtenidos de la muestra de WPI al 3 % en solución agua a pH4, FI 0.1 M y 6 minutos de ultrasonificación (ver Figura 17) con sus respectivos controles. Con respecto al control WPI (línea continua magenta) enfocándonos siempre en la región de la Amida I, se observan picos a 1635 cm^{-1} , 1644 cm^{-1} , 1651 cm^{-1} y 1681 cm^{-1} (hojas β , α -hélices y estructuras giro). Estos picos ya han sido observado y discutido su asociación con anterioridad.

Para el caso de este tratamiento, el efecto de desnaturalización de las proteínas es más evidente cuando se ha aplicado en conjunto la ultrasonificación y las modificaciones de pH y FI, determinando desnaturalización proteica irreversible. este efecto fue observado por O'Sullivan *et al.* (2014); Barraza *et al.* (2016), Shen *et al.* (2017), quienes concluyen que la aplicación de ultrasonido de alta energía es

una buena tecnología alternativa para mejorar las propiedades funcionales de las proteínas principalmente a través del efecto de la cavitación.

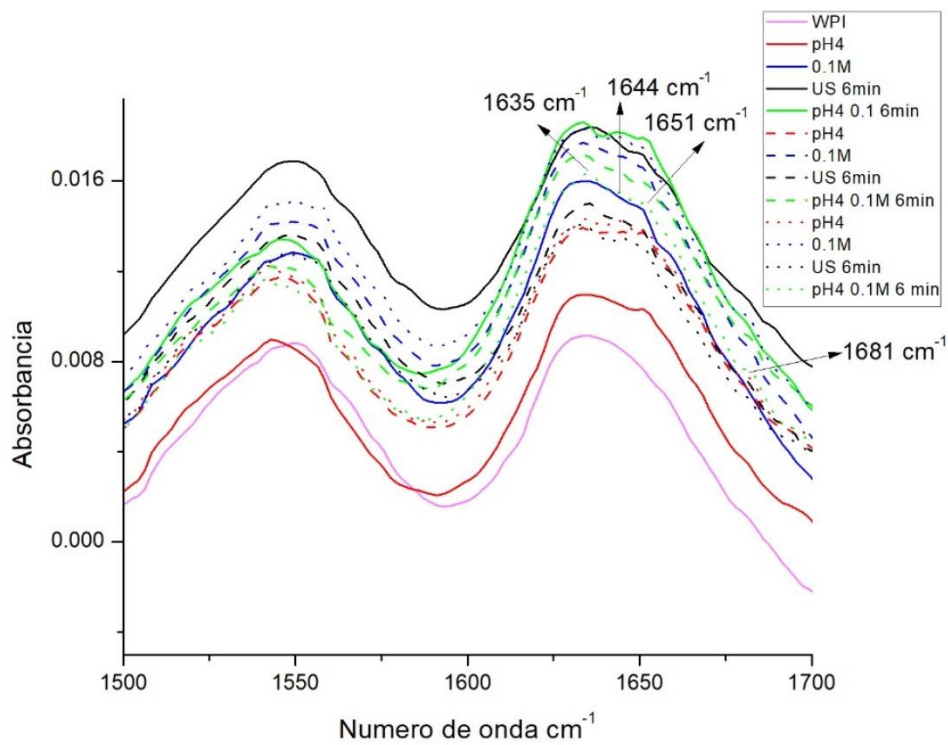


Figura 17. Espectros de proteína de suero aislada en solución modelo agua a pH 4 FI 0.1 M ultrasonificada por 6 min al 3 % y controles. tiempo 0 (líneas continuas —), 6 horas (líneas intermitentes - -) y 24 horas (líneas punteadas).

En la Figura 18, se muestran los espectros obtenidos de la muestra WPI al 3 % en solución agua, a pH 4, FI 0.2 M y 6 minutos de tratamiento de ultrasonificación, así como los controles. Enfocados en la región de la Amida I, en la línea color verde punteada correspondiente a la muestra con los tres parámetros experimentales utilizados en este proyecto de tesis, se observó definición de picos a 1630 cm^{-1} - 1645 cm^{-1} , 1651 cm^{-1} , 1660 cm^{-1} (asociados como anteriormente se mencionó a hojas β , α -hélices, y estructuras giro respectivamente) después del tratamiento y hasta las 24 horas, este hecho está asociado con los cambios conformacionales que se inducen sobre la estructura de la proteína por efecto del tratamiento. Como en los tratamientos anteriores debido al comportamiento espectral se puede

determinar, que el tratamiento ha generado una desnaturalización irreversible de la proteína.

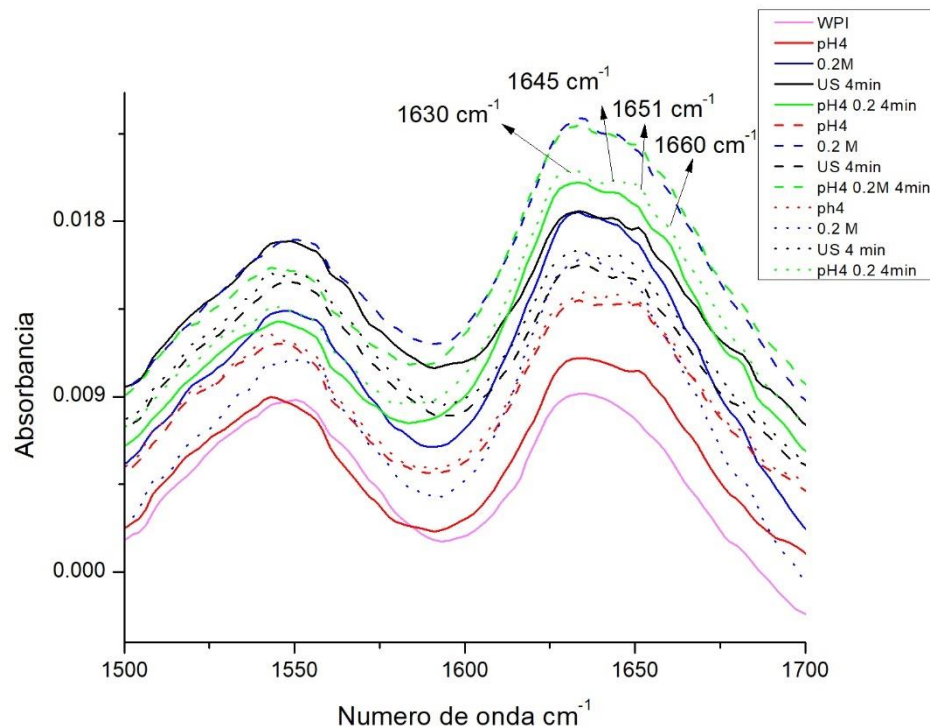


Figura 18. Espectros de proteína de suero aislada en solución modelo agua a pH 4 FI 0.2 M ultrasonificada por 4 min al 3 % y controles. tiempo 0 (líneas continuas —), 6 horas (líneas intermitentes - -) y 24 horas (líneas punteadas).

Finalmente, en la figura siguiente se presenta el comportamiento de absorbancia de infrarrojo de WPI al 3 % a pH 4, FI 0.2 M y 6 minutos de ultrasonificación y controles, ver Figura 19. Se observa con respecto al control (línea continua magenta); cambios en la banda de los espectros obtenidos después del tratamiento aplicado enfocados en la región del la Amida I, específicamente la línea color verde, que corresponde al amuestra tratada por ultrasonificación y modificaciones de pH y FI. Se observan picos a 1632 cm^{-1} - 1643 cm^{-1} , 1652 cm^{-1} y 1667 cm^{-1} asociados a hojas β , α -hélices y estructuras giro respectivamente.

Este hecho se debe al despliegue de la estructura, como ya se mencionó por el efecto del tratamiento aplicado, observando también estos cambios en las muestras tratadas con pH 7 con FI 0.1 y 0.2 M, con tiempo de tratamiento de 4 y 6 minutos,

determinando desnaturalización irreversible. estos resultados se pudieron corroborar por PAGE, HPLC y sulfhidrilos libres, que se muestran más adelante.

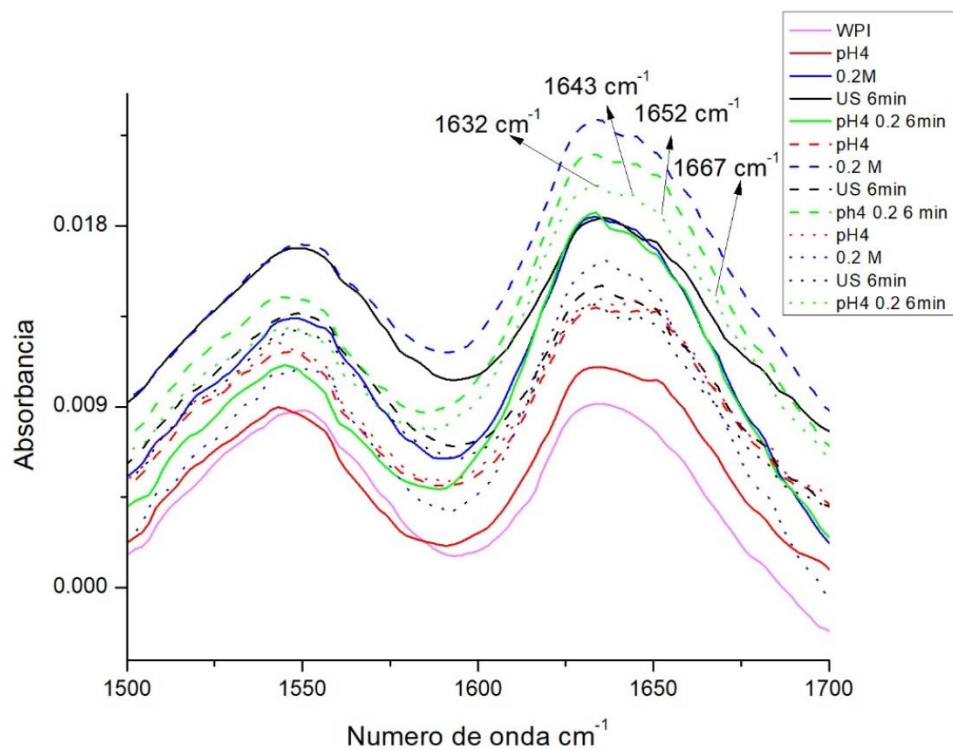


Figura 19. Espectros de proteína de suero aislada en solución modelo agua a pH 4 FI 0.2 M ultrasonificada por 6 min al 3 % y controles. tiempo 0 (líneas continuas —), 6 horas (líneas intermitentes - - -) y 24 horas (líneas punteadas).

Al realizar un análisis quimiométrico de los resultados de infrarrojo por medio del análisis de componentes principales, en la región de la amida I, la tendencia de agrupación en diferentes cuadrantes del plano es evidente entre las muestras de WPI + agua sin tratamiento, WPI + agua modificación de pH 4 y 7, WPI + agua con modificación de FI 0.1 y 0.2 M y finalmente WPI + agua con tratamiento de ultrasonido por 4 y 6 min (Figura 20), corroborando así, las diferencias estructurales entre las muestras tratadas y aquellas sin tratar que se habían observado mediante los cambios espectrales sobre la región de la amida primaria (1600-1700 cm^{-1}).

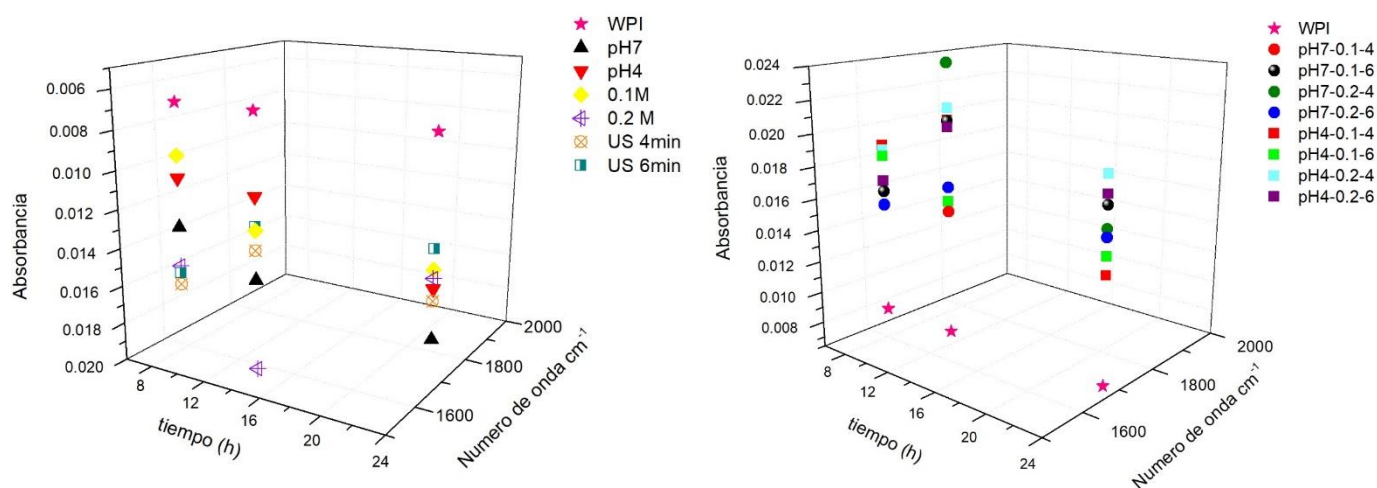


Figura 20. Gráfica de puntuaciones de tres dimensiones obtenida mediante el análisis de PCA de los espectros de FTIR de los controles y tratamientos de US.

7.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se realizó el estudio electroforético de las muestras del aislado de proteína de suero (ver tabla 8, capítulo 7. Resultados y discusión), en solución modelo agua, a una concentración similar a la real en leche (3 %). El marcador de peso molecular que se utilizó para PAGE-nativo (14-380 kDa), fue elaborado en el laboratorio por el grupo de trabajo de la Dra. Silvia Luna, en el caso de SDS-PAGE se utilizó el marcador de peso molecular de la marca Bio-rad (Figura 21), Precision Plus Protein™ Unstained Standards (10-250 kDa) para ambos casos se utilizó una cámara electroforética vertical (Figura 22).

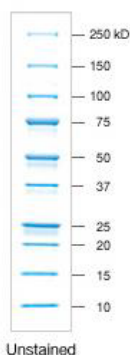


Figura 21. Marcador de peso molecular SDS-PAGE.



Figura 22. Cámara electroforética vertical.

El orden de carga fue el siguiente (Figura 23): el primer carril, corresponde al marcador de peso molecular para PAGE-nativo, en los carriles siguientes corresponden a los controles WPI en solución agua al 3 % modificando el pH, FI o tiempo de ultrasonificación, respectivamente. En el gel se observan bandas intensas en cada carril, cerca de los 18 kDa correspondientes a la proteína, β -lactoglobulina variante A y B (β -LG), α -lactoalbúmina (α -LA) en forma de dímero a 28 kDa, albúmina de suero bovino (más conocida por sus siglas en inglés, BSA) cerca de los 66 kDa, coincidiendo con lo reportado por Havea *et al* (1998); Chen *et al.* (2005). La banda que se observa arriba de 66 kDa se identifican como agregados, sin embargo, al aparecer en cada carril, se podría asociar como una consecuencia del proceso de obtención del WPI, el cual se mencionó en el capítulo 2.

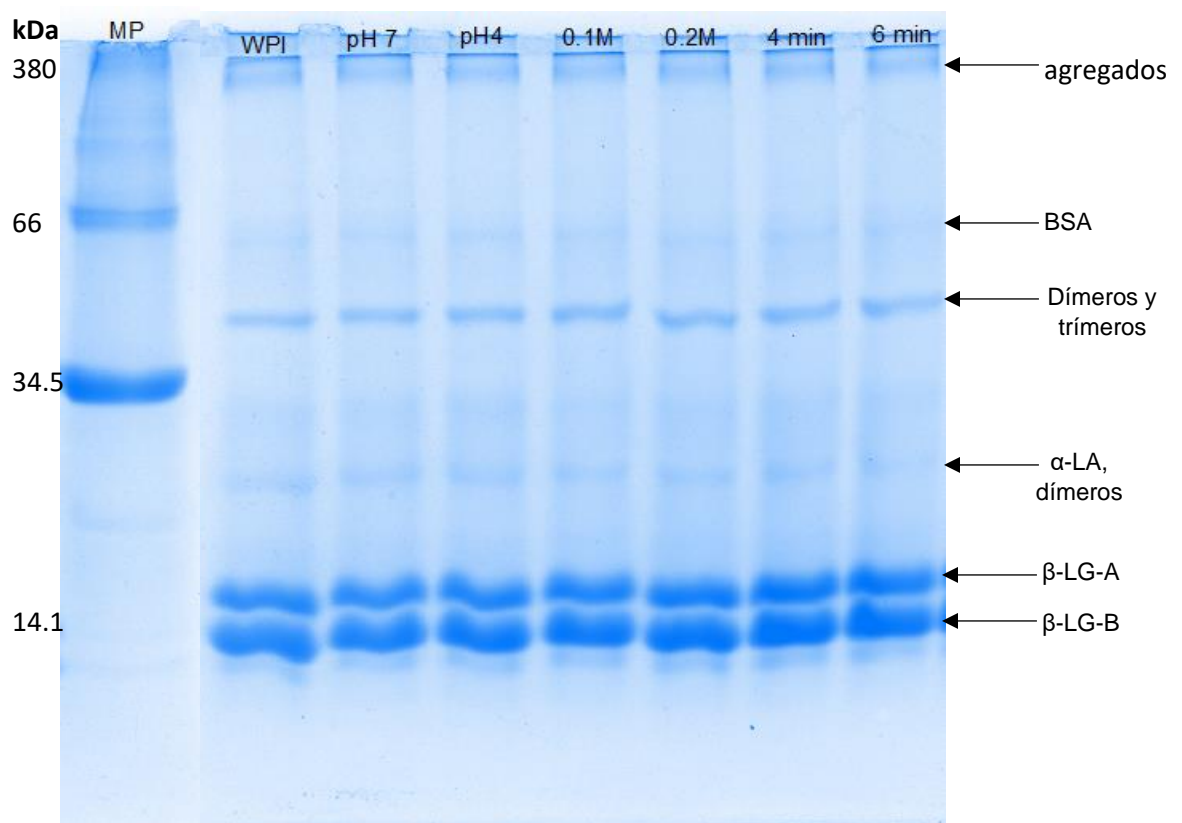


Figura 23. Gel nativo de una dimensión de WPI al 3 % (w/v) en solución modelo agua y controles.

Se observa en la Figura 24, el gel Nativo de las muestras tratadas por ultrasonificación, a las cuales se le variaron los tres parámetros a la vez, modificación de pH y FI, el marcado de peso molecular, se cargó en el primer carril, posteriormente las muestras con pH 7, FI 0.1M, 0.2 M, 4 y 6 minutos de ultrasonificación, en los últimos 4 carriles se cargaron las muestras con pH 4, FI 0.1 M, 0.2 M, 4 y 6 minutos de ultrasonificación. En cada carril se observan bandas correspondientes a β -LG variante A y B (18 kDa), bandas cerca de 34 kDa corresponden a dímeros de β -LG y bandas más intensas que se sugiere son agregados de alto peso molecular que no pudieron resolver en el gel. Estos resultados concuerdan con los reportados por Mulcahy et al. (2017), quienes observaron agregados de proteínas arriba de 250 kDa en soluciones de WPI con 20 mM de NaCl (WPI + NaCl).

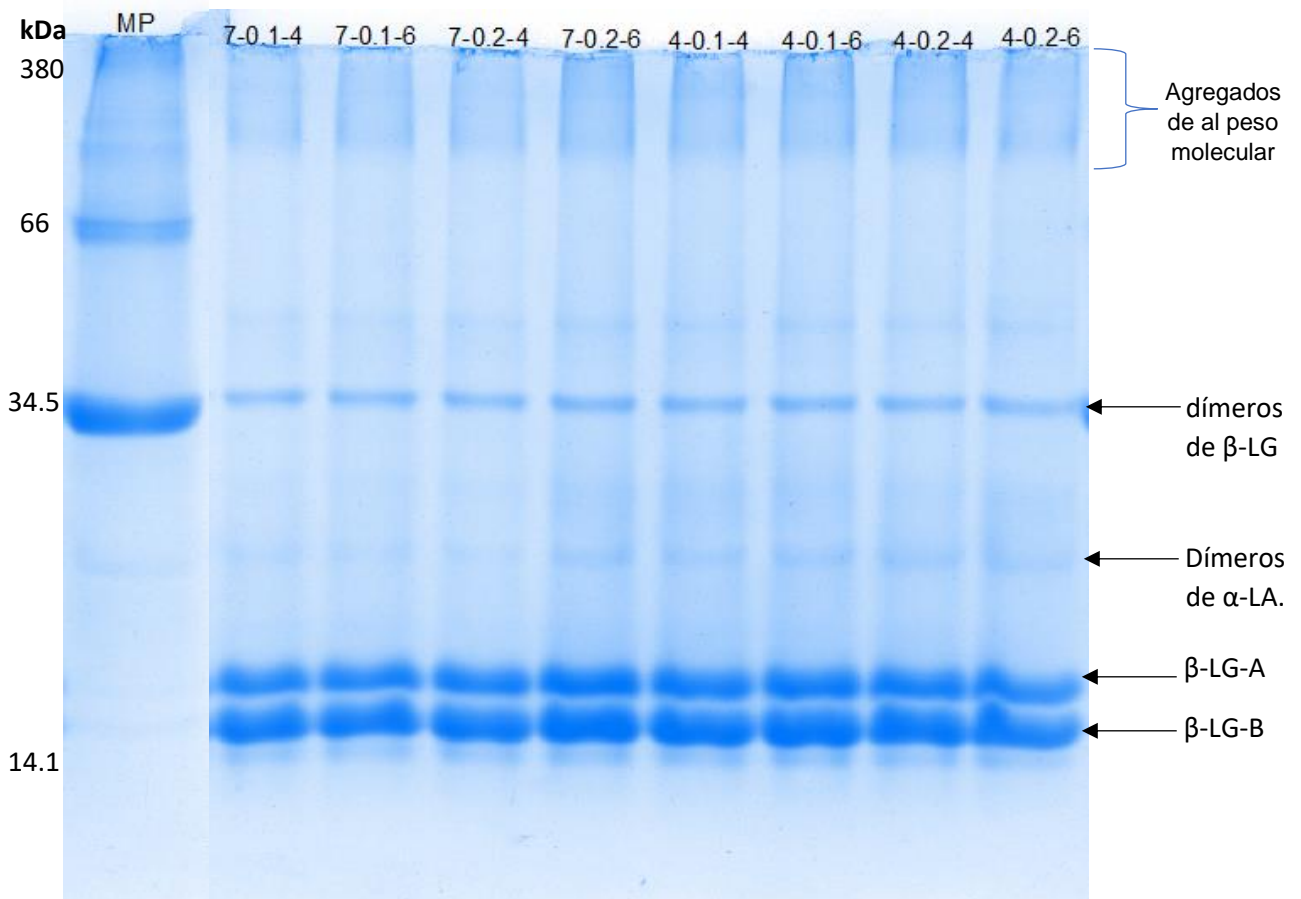


Figura 24. Gel nativo de una dimensión de los tratamientos de ultrasonificación con modificación de pH y fuerza iónica con WPI en solución modelo agua al 3 %.

Ahora bien, para el caso de condiciones desnaturalizantes, el orden de carga fue el siguiente (Figura 25): el primer carril, corresponde al marcador de peso molecular para SDS-PAGE, los carriles siguientes corresponden a los controles: WPI + agua sin tratamiento, WPI + agua modificación de pH 4 y 7, WPI + agua con modificación de FI 0.1 y 0.2 M y finalmente WPI + agua con tratamiento de ultrasonido por 4 y 6 min. En el gel se observan bandas, cerca de los 18 kDa correspondientes a la proteína, β -lactoglobulina variante A y B (β -LG) a excepción de los carriles de WPI a pH 7 y 0.1 M donde no se logran apreciar estas bandas, esto pudiera deberse a que el pH del medio es cercano al punto isoeléctrico de las proteínas, lo cual causaría que estas no migraran al verse anulada su carga, sin embargo el pH del medio no es cercano al pI de ninguna de las proteínas, por lo que otra causa, se sugiere, los tratamientos por sí solos de pH 7 y FI 0.1 M no generaron grandes cambios en la estructura secundaria y terciaria de las proteínas y al estar a temperatura ambiente se repliega la parte de las proteínas que estaba desplegada (Lam & Nickerson, 2015), destacando los tratamientos por ultrasonido, esto se debe al efecto del fenómeno de cavitación que se genera al aplicar ultrasonido, Barraza *et al.* (2016), Jambrak *et al.* (2014).

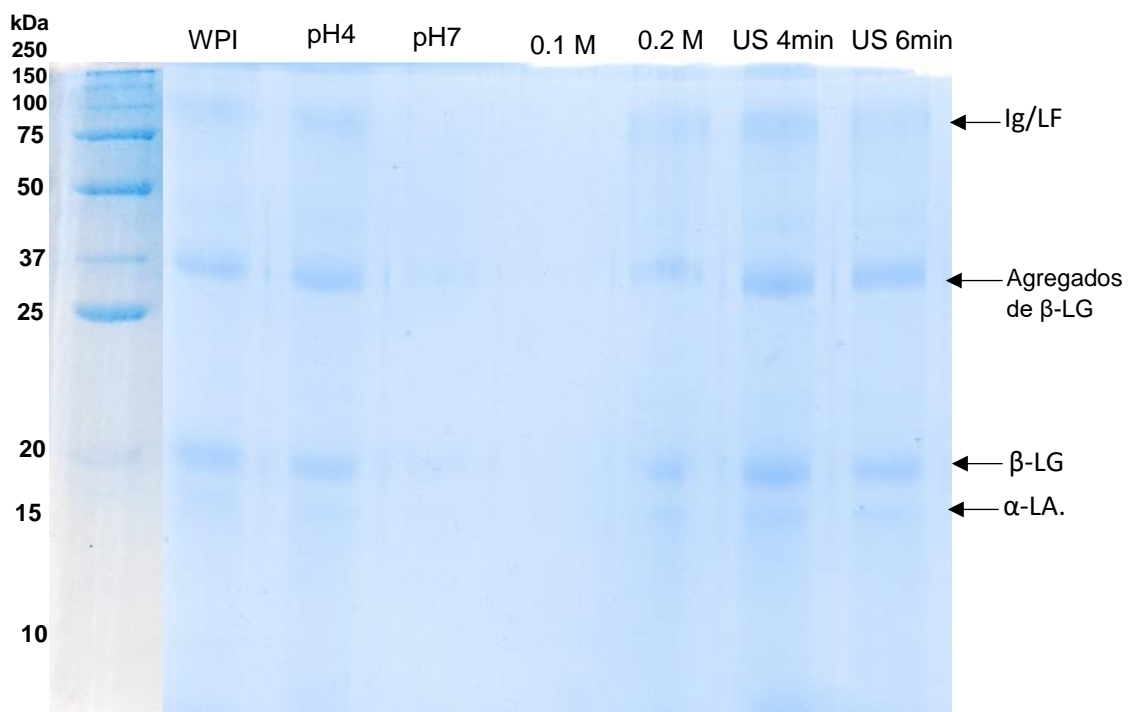


Figura 25. Gel SDS de una dimensión de WPI al 3 % (w/v) en solución modelo agua y controles.

Para las muestras donde se variaron los tres parámetros experimentales a la vez en gel con condiciones desnaturizantes, el orden de carga fue el siguiente (ver Figura 26): el primer carril, corresponde al marcador de peso molecular para SDS-PAGE, seguido de las muestras tratadas por ultrasonificación, con pH7, FI 0.1M, 0.2 M, 4 y 6 minutos de ultrasonificación, en los últimos 4 carriles se cargaron las muestras con pH4, FI 0.1M, 0.2M, 4 y 6 minutos de ultrasonificación. Solo en el carril de las muestras a pH4- 0.1M-4 minutos y pH4-0.2-4 minutos se observó una banda a 14 kDa correspondientes a α -lactoalbúmina (α -LA). En cada carril se observan bandas intensas, cerca de 18 kDa correspondiente a la proteína β -lactoglobulina (β -LG) y una banda tenue perteneciente a BSA (66 kDa). Otros autores informaron con un patrón electroforético similar para una solución de WPI calentada, en condiciones de SDS-PAGE no reductora (Wijayanti *et al.*, 2015; Mulcahy *et al.*, 2016) la presencia de dímeros, trímeros y oligómeros de β -LG y α -LA en el rango de peso molecular de 35-250 kDa, junto con material con un peso molecular > 250 kDa que no pudo penetrar el gel. Confirmando lo observado por FTIR donde se observó desnaturalización proteica irreversible, generando la formación de agregados.

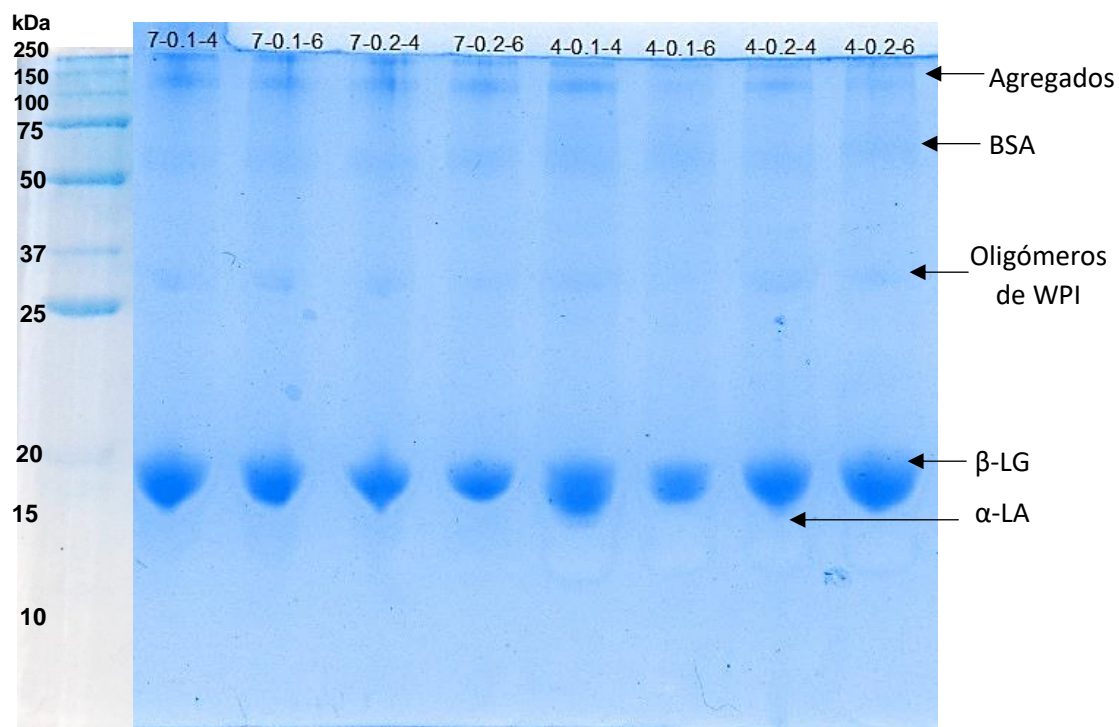


Figura 26. Gel SDS de una dimensión de los tratamientos de ultrasonificación con modificación de pH y fuerza iónica con WPI en solución modelo agua al 3 %.

7.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

En la siguiente figura, se muestran los cromatogramas más representativos; correspondientes al control WPI sin tratamiento (línea rosa) y WPI tratadas por ultrasonificación con modificación de pH y FI, pH 7-0.1 M-4 min (línea negra) y pH7-0.1M-6 min (línea roja punteada), ver Figura. 27. Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó el software Origin ver 8.0. se identificaron dos picos principales con tiempo de retención de 26 y 27 minutos. De acuerdo a lo reportado, estos picos corresponden a las variantes A (V.A) y B (V.B) de β -LG respectivamente (Haque *et al.*, 2015).

Para estimar el % de pérdida de proteína nativa y su posible agregación a causa del tratamiento aplicado, como se pudo observar por FTIR y PAGE, se calculó el área bajo la curva de ambos picos, mediante una curva patrón del estándar de β -LG en solución agua a diferentes concentraciones (ver Anexo), se estimó el porcentaje. Logrando un porcentaje de alrededor del 27.81 % y 24.52 %, (pH 7 0.1 M 4 min y pH 7 0.1 M 6 min, respectivamente). Este resultado es mayor al porcentaje reportado en otros trabajos en los cuales se aplicó tratamiento térmico a 72 °C por 15 s, obteniéndose alrededor de un 10% de desnaturalización (Ruvalcaba, 2015).

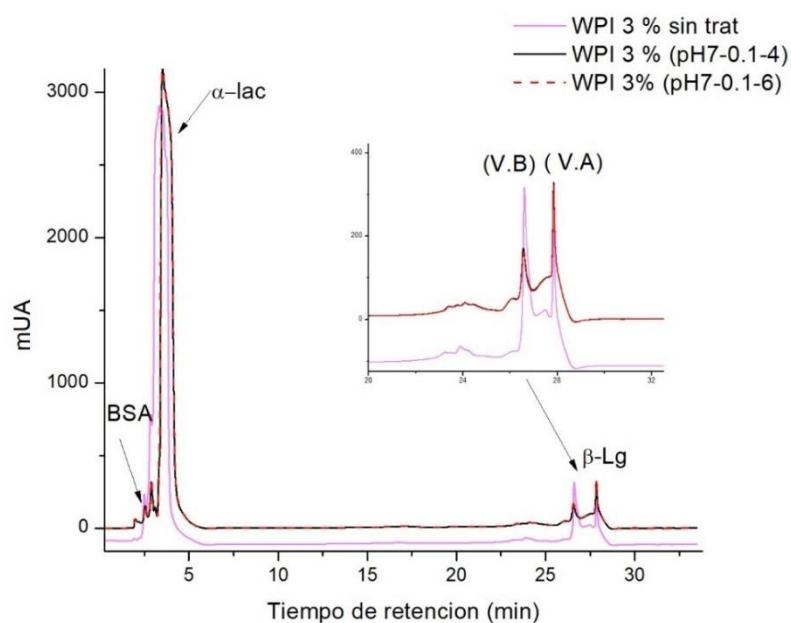


Figura 27. Cromatograma de WPI en solución agua al 3 % sin tratamiento y muestras tratadas con ultrasonificación y modificación de pH y FI, (1) Variante B de β -LG y (2) Variante A de β -LG.

7.4. Cuantificación de sulfhidrilos libres.

La desnaturalización de las proteínas se ve reflejado en el aumento de sulfhidrilos libres, como se ve en los resultados de la Tabla 8. Las muestras control con FI 0.1, 0.2 M, los tratamientos de pH7-0.1-4 y 6 minutos con 1.53 $\mu\text{mol SH/g}$ y 1.42 $\mu\text{mol SH/g}$, así como los tratamientos pH4- 0.1M con 4 y 6 minutos de ultrasonificación respectivamente.

Tabla 8. Concentración de sulfhidrilos libres ($\mu\text{mol SH/g}$) de muestras ultrasonificadas.

<i>MUESTRA</i>	<i>Sulfhidrilos libres ($\mu\text{mol SH/g}$)</i>
WPI	0.85 \pm 0.2
pH7	0.75 \pm 0.2
pH4	0.86 \pm 0.1
0.1M	1.61 \pm 0.7
0.2M	0.89 \pm 0.5
US 4min	0.80 \pm 0.1
US 6min	0.65 \pm 0.1
pH7 0.1 4	1.53 \pm 0.4
pH7 0.1 6	1.42 \pm 0.2
pH7 0.2 4	1.12 \pm 0.2
pH7 0.2 6	1.26 \pm 0.2
pH4 0.1 4	1.76 \pm 0.1
pH4 0.1 6	1.72 \pm 0.8
pH4 0.2 4	1.08 \pm 0.4
pH4 0.2 6	0.90 \pm 0.7

Nuestros resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Shen *et al* (2017) en muestras de WPI al 10 % p/v ultrasonificadas a diferentes tiempos (5-40 min). Los autores atribuyen esos resultados al flujo turbulento y fuerza de cizalla asociadas a la cavitación que logra exponer a los grupos -SH que se encuentran cerrados en la WPI sin tratamiento a la superficie. Caso contrario a los resultados obtenidos en las muestras control, siendo inferiores a las muestras que en conjunto se ultrasonificaron y modificaron pH y FI, resaltando la muestra control con modificación de 0.1 M con 1.61 $\mu\text{mol SH/g}$. estos resultados se correlacionan con los obtenidos inicialmente

por FTIR e hidrofobicidad, al exponer sitios activos (desnaturalización irreversible) el índice de hidrofobicidad aumenta.

7.5. Determinación de tamaño de partícula.

En la Tabla 9, se observan los resultados obtenidos del análisis de tamaño de partícula, denotando como $D_{[50]}$ diámetro mediano, $D_{[90]}$ diámetro de la moda, $D_{[3,2]}$ corresponde al diámetro-área equivalente y $D_{[4,3]}$ corresponde al diámetro-volumen equivalente.

Tabla 9. Tamaño de partícula de muestras tratadas por ultrasonificación 24 kHz y 400 W.

Muestra	$D_{[50]}$	$D_{[90]}$	$D_{[3,2]}$ (nm)	$D_{[4,3]}$ (nm)
WPI	23.77	212.3	2.16	72.71
pH7	1.82	10.63	1	4.33
pH4	13.11	21.56	11.33	13.86
0.1M	2.03	8.95	0.89	3.39
0.2M	2.83	54.28	1.68	26.63
US 4min	1.17	45.59	0.28	15.38
US 6min	0.12	0.41	0.08	0.19
pH7 0.1 4	4.1	10.29	1.28	12.72
pH7 0.1 6	9.99	24.47	1.06	4.78
pH7 0.2 4	28.1	48	25.84	31.01
pH7 0.2 6	0.93	25.27	0.38	6.84
pH4 0.1 4	5.99	10.19	2.8	6.37
pH4 0.1 6	4.05	7.78	0.08	3.86
pH4 0.2 4	4.88	8.35	2.59	5.23
pH4 0.2 6	3.33	6.55	0.9	3.6

En la Tabla 9 puede observarse una disminución en el tamaño de todas las muestras con respecto al control ($D_{[3,2]}$ y $D_{[4,3]}$), siendo los más representativos las muestras a pH 7 0.1 M y 0.2M con 6 min de ultrasonificación. Para el caso de las muestras a pH 4, dos de ellas mostraron una mayor disfunción en el tamaño siendo ambas con tiempos de ultrasonificación de 6 min y FI 0.1 y 0.2 M. Estos resultados concuerdan con los reportados por O'Sullivan *et al.* (2014) y Shen *et al.* (2017), concluyendo que el tamaño de partícula se ve afectada por las fuerzas de cizalla hidrodinámicas asociadas a la cavitación que alteraron en gran medida a las interacciones no covalentes entre las moléculas de proteínas.

7.6. Microscopía de fuerza atómica (AFM).

Se estudió la topografía de la superficie a microescala de las muestras de WPI con/sin tratamiento de ultrasonido y modificaciones de pH y FI, usando AFM (Figura 28). La muestra de WPI (Figura 28a) a la cual no le aplicó ningún tratamiento, mostró una microestructura lisa, comparada con la de las otras muestras en las cuales se observó una superficie más gruesa con algunos vacíos e incluso menos homogéneas (Figuras 28c, d, e, g, h e i), caso opuesto, hubo muestras que mostraron homogeneidad (WPI pH4 y WPI-US 4 min). Esto se pudo corroborar con la medición de tamaño de partícula, para el caso de ultrasonido específicamente, disminuyó considerablemente el tamaño de partícula (Figura 28g y Tabla.9). Algunos autores que lograron observar la morfología de agregados de proteínas (WPI), lo hicieron en el orden nanométrico y micrométrico, Ikeda & Morris, 2002; Chen *et al.* (2004); Alavi *et al.* (2018).

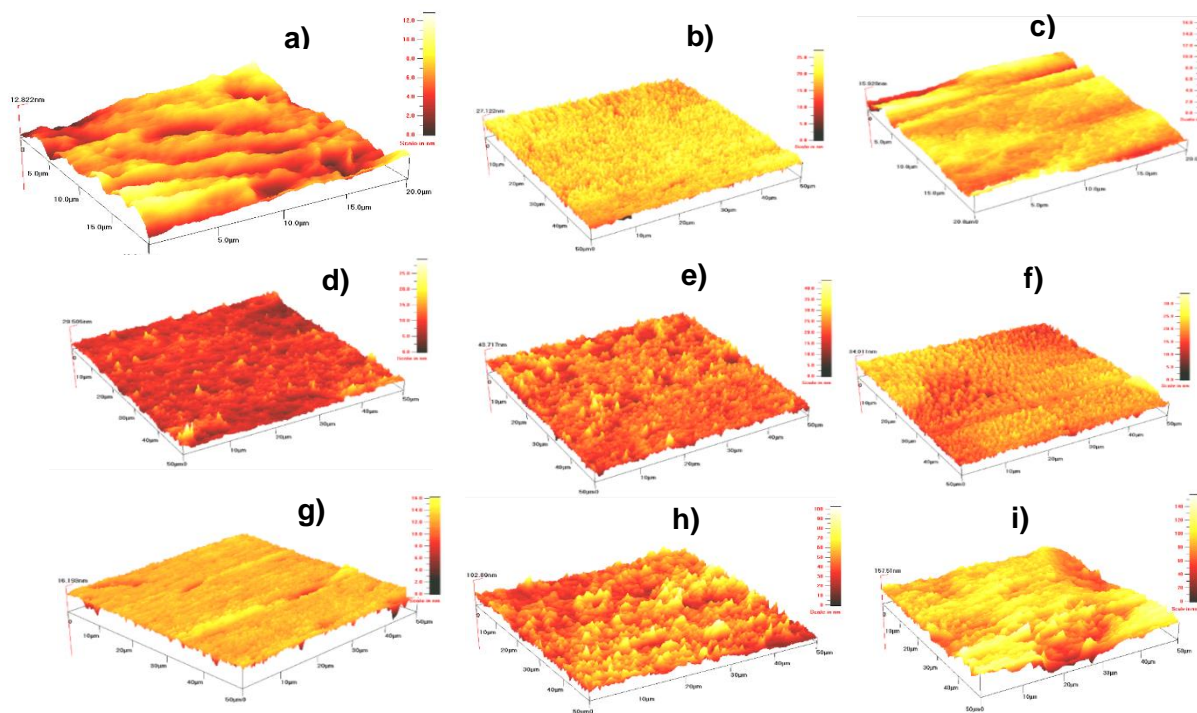


Figura 28. Imágenes 3D AFM de muestras preparadas al 3 % de WPI; (a) WPI sin tratamiento, (b) WPI pH4, (c) WPI pH7, (d) WPI 0.1 M, (e) WPI 0.2M, (f) WPI-US 4 min, (g) WPI-US 6 min, (h) pH7-0.1M-4min e (i) pH7-0.1M-6min, con modo de tapping a una velocidad de exploración de 20 Hz.

En la Figura 29, se presentan las muestras cuyo valor de pH, FI y tiempo de ultrasonificación se modificaron como se menciona anteriormente (Tabla 8, Capítulo 7 Resultados y discusión). Para las muestras con pH7 (Figura 28h, 28i, Figura 29a y 29b) la distribución de los agregados es menos uniforme, pero de mayor tamaño (Tabla.9), mientras las muestras con pH 4 se observó mayor homogeneidad, pero el tamaño fue menor de los agregados, concluyendo que el pH idóneo para agregados de mayor tamaño es de pH7 dependiendo del tiempo de ultrasonificación y FI. Wang *et al.* (2013), destacó que la adición de sal aumenta el tamaño de los agregados los cuales pudo observar a escala nanométrica.

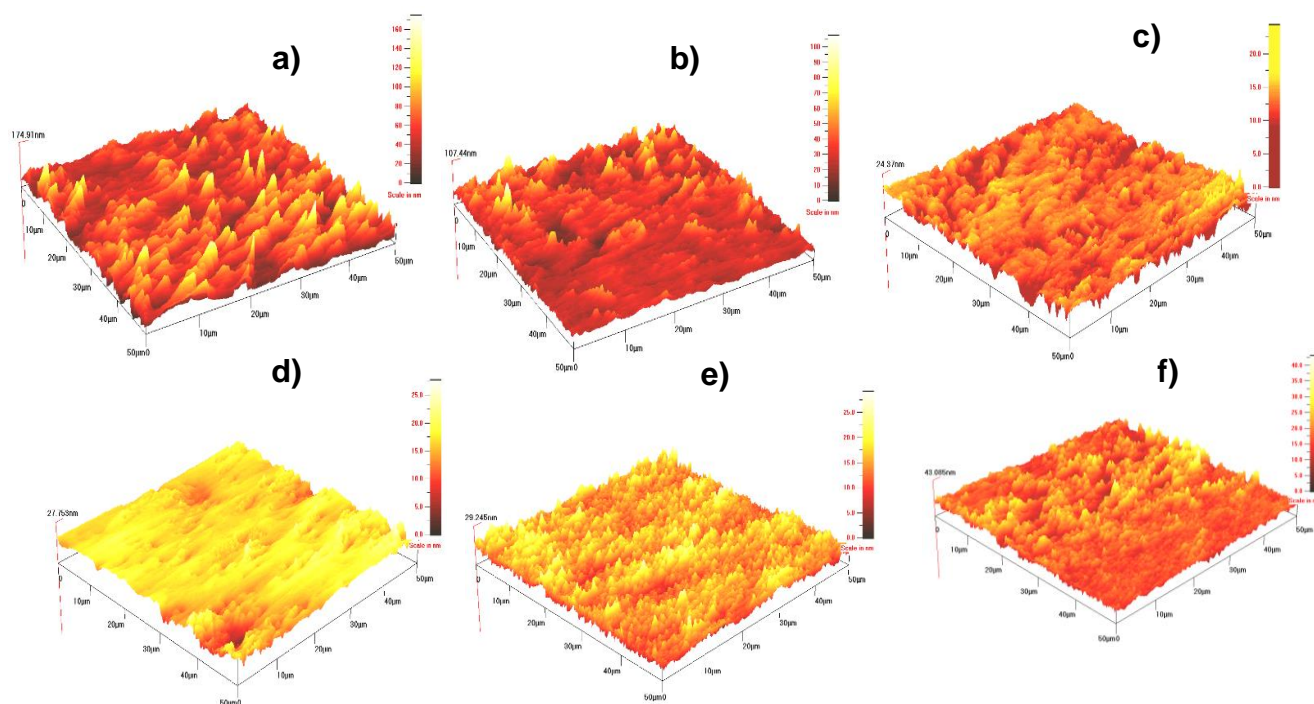


Figura 29. Imágenes 3D AFM de muestras preparadas al 3 % de WPI con modificación de pH y FI; a) pH7-0.2M-4min, b) pH7-0.2M-6min, c) pH4-0.1M-4min, d) pH4-0.1M-6min, e) pH4-0.2M-4min, f) pH4-0.2M-6min, con modo de tapping a una velocidad de exploración de 20 Hz.

7.7. Capacidad de retención de agua (CRA) y viscosidad.

Las muestras WPI, pH7, pH4, US 4 min y US 6 min, no tuvieron formación de gel, esto puede deberse a que por sí solos los tratamientos de pH y US generan desnaturalización proteica, pero al ser un bajo número de enlaces intermoleculares y una pequeña carga neta son insuficientes para la gelificación (Lorenzen & Schrader, 2006).

Tabla 10. Parámetros de los geles elaborados con WPI al 3 %.

MUESTRA	CRA	Viscosidad (mPa.s)
WPI	-	
pH7	-	
pH4	-	
0.1M	89.3 ± 2.7	0.3
0.2M	87.1 ± 0.7	0.9
US 4min	-	
US 6min	-	
pH7 0.1 4	91.9 ± 3.4	3.2
pH7 0.1 6	88.7 ± 1.4	1.7
pH7 0.2 4	87.2 ± 5.8	0.3
pH7 0.2 6	84.7 ± 2.7	0.6
pH4 0.1 4	91.7 ± 0.5	0.4
pH4 0.1 6	91.6 ± 1.2	0.5
pH4 0.2 4	90.6 ± 3.2	0.5
pH4 0.2 6	87.7 ± 2.1	0.1

Como se observa en la Tabla 10 se evidencia el resultado más alto que corresponde a la muestra a pH 7 0.1 M y 4 minutos de ultrasonificación, el cual se vio reflejado en aumento de viscosidad de 3.2 mPa.s obteniendo geles más firmes, en segundo lugar, los geles elaborados a pH 4, FI 0.1 con tiempo de ultrasonificación de 4 y 6 minutos, aunque en viscosidad se vio una disminución resultando en la obtención de geles muy poco firmes. Se observó un aumento de forma equivalente en la capacidad de retención de agua con el aumento de sulfhidrilos (Tabla 8). Estos resultados permitieron generar un panorama general para la elección de los tratamientos que se utilizaron en la elaboración de yogur. Pues se observó que en un mismo sistema los tratamientos de pH, FI y US generan mayor efecto sobre las proteínas (desnaturalización) que ayudan a la formación de los geles.

7.8. Determinación de la hidrofobicidad de superficie del 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS)

En la Figura 30, se observa un aumento en la hidrofobicidad dependiendo del tratamiento aplicado, WPI (línea color magenta) es la muestra a la cual no se modificó ni aplico ningún tratamiento ya sea de ultrasonificación o modificación de pH y/o FI. En comparación con WPI todas las muestras restantes, incrementaron la hidrofobicidad, destacando las muestras a las que se les aplicó ultrasonido a 4 y 6 min (líneas color verde), posteriormente las muestras a las que se les modifico el pH o la FI. El aumento de fluorescencia es indicativo de la exposición de aminoácidos hidrofóbicos como resultado del despliegue de proteínas de suero. Estos resultados concuerdan a los reportados por Shen *et al.* (20016), quienes además proponen el ultrasonido de alta intensidad como una alternativa a la aplicación de métodos tradicionales (pasteurización) en la industria alimentaria, un años más tarde Jiang, 2017, observan también un incremento de fluorescencia en dispersiones de WPI tratada por US a diferentes amplitudes (0-800 W) y tiempos (20 o 40 min). En el caso de las muestras a las que se aplicó tratamiento de ultrasonido y además se modificó el pH y la FI el incremento es menor a de las muestras ultrasonificadas únicamente, pero aun así se observa mayor hidrofobicidad que WPI.

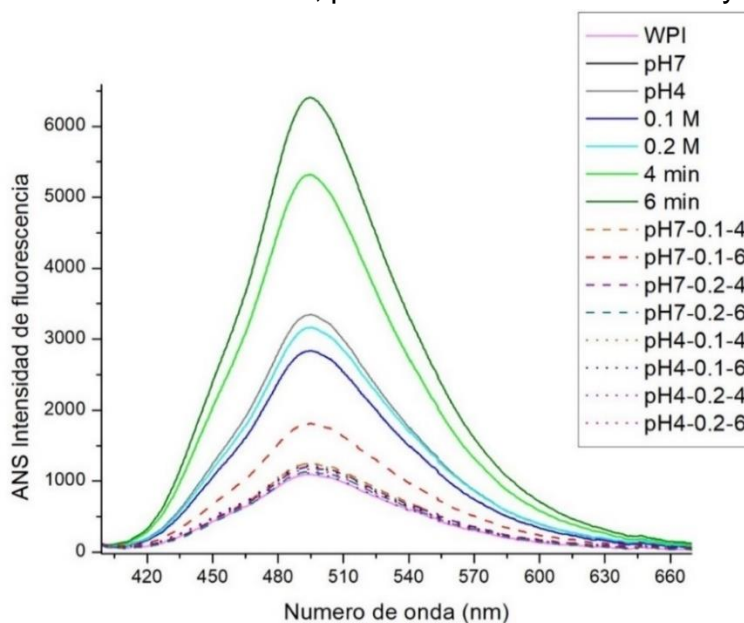


Figura 30. Espectros de fluorescencia de ANS de las muestras tratadas y controles.

7.9. Turbidez.

Los resultados obtenidos en las muestras tratadas a 4 y 6 minutos a pH7 y pH4 con FI de 0.1 M y 0.2 M, mostraron un incremento considerable en la turbidez, comparado con las muestras control (WPI, pH7, pH4, 0.1 M, 0.2 M, 4 min y 6 min de ultrasonificación). La turbidez de una dispersión coloidal se puede considerar como un indicador de su tamaño de partícula porque las partículas más grandes dispersan la luz en mayor medida. El aumento de la turbidez es una indicación directa de la agregación de partículas y, por lo tanto, se puede utilizar para evaluar el grado de agregación de forma cualitativa, Alavi *et al.* (2018). Shen *et al.* (2017), reportó la disminución de Turbidez en muestras tratadas por ultrasonido a 20 kHz, 31 W cm^{-2} por 20 min, lo cual concuerda con las muestras que se trataron únicamente con ultrasonido a 4 min y 6 min en este trabajo (Figura 31), El diámetro de la partícula disminuyó y, correspondientemente, aumentó el área superficial disponible para la dispersión de la luz, dando como resultado una disminución de la turbidez.

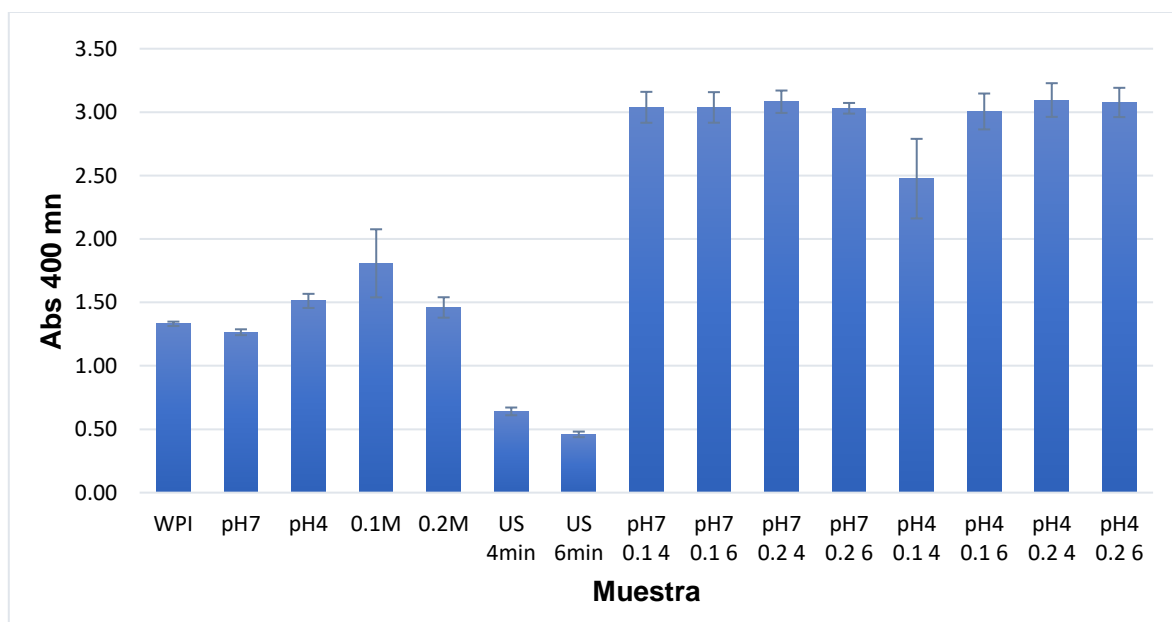


Figura 31. Turbidez de muestras tratadas y controles.

7.10. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Se muestra la comparación de los termogramas obtenidos de las muestras de WPI al 3 % (Figura 32), con modificación de pH, FI y aplicación de tratamiento de ultrasonido. Cuando se calientan las proteínas (20-100 °C) se involucran procesos de desnaturalización (endotérmicos) y agregación (exotérmicos), al igual, muchos factores se ven involucrados, concentración de proteína, pH, FI y velocidad de calentamiento Shen *et al.* (2017). La muestra de WPI no tratada (línea magenta) se observó con mayor estabilidad térmica, a diferencia de las muestras que fueron tratadas por ultrasonificación y se modificó el pH y FI, se destacaron las muestras a pH 7 0.1 M con 4 min y 6 min de ultrasonificación, se podría decir que la estabilidad térmica de las muestras se ve menos afectada por la formación de agregados, esto lo observaron también otros autores (Chandrapala *et al.* (2011), Arzeni *et al.* (2012), Shen *et al.* 2017), cuya conclusión fue que la estabilidad térmica mejora parcialmente por la formación de agregados.

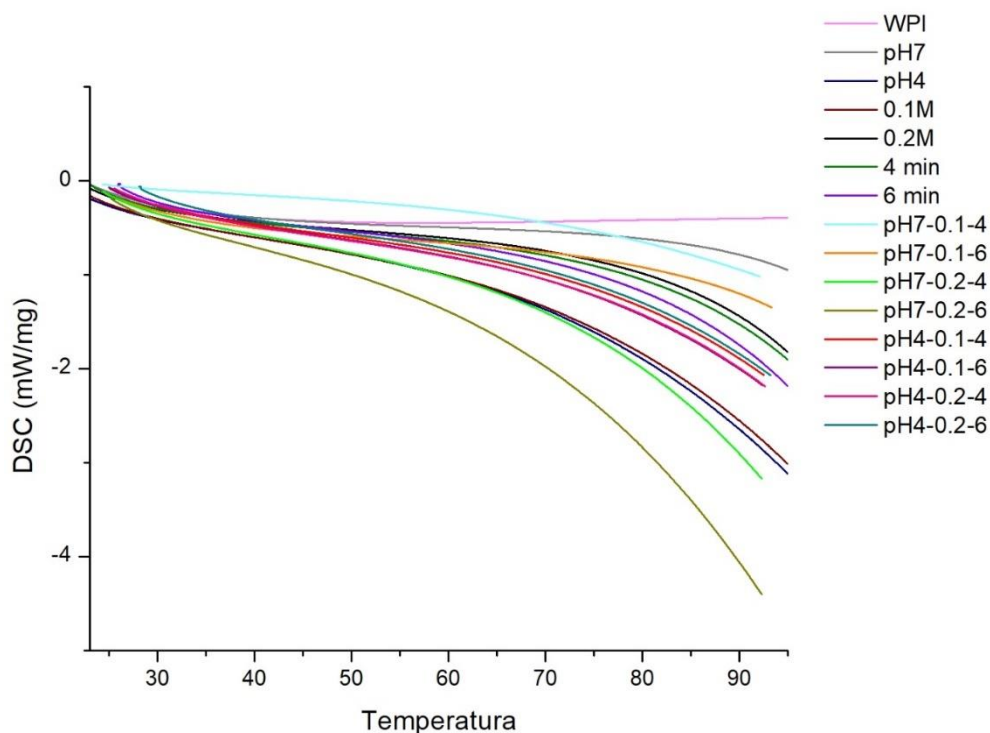


Figura 32. Comparación de termogramas DSC de muestras control y muestras tratadas.

7.11. Potencial zeta

En la Tabla 11 se presentan los resultados de potencial z de las muestras control y muestras con modificación de pH, FI y tiempo de ultrasonido, en primer plano se observa al control (muestra sin modificación de pH, FI y ultrasonido) con -14.7 mV, por lo que, el aumento negativo de la magnitud de potencial z en los sistemas de pH7, US-4min y US-6min, es evidente, esto es el resultado de la formación de agregados, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Schmitt *et al.* (2007), quienes mencionan un aumento en el potencial z atribuyéndolo a la formación de agregados.

Tabla 11. Efecto del ultrasonido, pH y fuerza iónica sobre el potencial zeta de WPI.

Muestra	Potencial zeta (mV)
WPI*	-14.7
pH7*	-40.4
pH4*	-7.93
0.1M*	-11.2
0.2M*	31.2
US-4min*	-27.5
US-6min*	-30.8
pH7-0.1-4min	-7.22
pH7-0.1-6min	-0.10
pH7-0.2-4min	-5.53
pH7-0.2-6min	-5.29
pH4-0.1-4min	14.9
pH4-0.1-6min	-0.11
pH4-0.2-4min	-0.58
*muestras control. pH4-0.2-6min	-0.34

Por otra parte, Ryan *et al.* (2012), indica que el incremento de potencial zeta negativo en soluciones de WPI refuerza la repulsión electrostática para ser más resistente a una mayor agregación. Al no tener un aumento de potencial zeta, como se observó en los sistemas con modificación de pH, FI y ultrasonicación, así como en muestras control se puede deber a diversos factores como son: forma, peso molecular y radió hidrodinámico de los agregados o simplemente el tratamiento de ultrasonido o modificación de pH y FI que en un solo sistema no realizó cambios

significativos ($p > 0.05$) en los valores de potencial zeta independientemente de la agregación en las muestras, esto también fue observado por Shen y colaboradores en el 2017, aunque ellos solo aplicaron tratamiento de ultrasonificación a muestras de WPI (20 kHz, 20 % de amplitud por 20 min).

7.12. Elaboración del yogur

El volumen preparado de cada yogur (control, pH7-0.1M-4 min y pH7- 0.1M-6 min) fue de 100 mL. Las muestras se generaron por duplicado, las cuales se dejaron en refrigeración (4 °C) hasta su análisis.

Se observó que al adicionar la proteína correspondiente a los tratamientos (pH 7- 0.1 M-4 min y pH 7- 0.1 M-6 min), el pH de la leche disminuyó (Tabla 9.) una unidad, lo que permitió que el tiempo de coagulación fuera menor con respecto al control, con una diferencia de media hora, este hecho se debe a la rápida formación de agregados por la disminución de pH y por la presencia de sal (CaCl_2) en el medio, ayudando al aumento en la velocidad de coagulación, Marangoni *et al.* (2000) reportaron agregación rápida y grandes agregados en soluciones con tratamiento de temperatura a 80 °C por 30 min y adición de CaCl_2 (100mM-300mM), así como Wang, 2013 reportó que en ausencia de NaCl, los agregados fueron de menor tamaño, comparados con las muestras que tenían concentración de NaCl (100mM) reportaron tamaños de 33 nm.

7.12.1. Análisis de firmeza de gel

Los resultados obtenidos en el análisis de firmeza de gel de las muestras de yogur (control y tratamientos: pH 7- 0.1 M con 4 y 6 min de US), se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12. Perfil de textura de diferentes muestras de yogur.

Muestra	pH		Fuerza (g)
	SN WPI-trat	CN WPI-trat	
Control	-	-	72.0 ± 4.53 ^a
pH7-0.1M-4min	6.68	5.81	65.8 ± 12.52 ^b
pH7-0.1M-6min	6.68	5.76	44.7 ± 9.05 ^c

Los resultados, indican que hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores registrados de fuerza del gel, siendo superior el de la muestra de yogur (control) con un valor de 77 ± 10.14 , seguido del tratamiento de pH 7-0.1 M con 4 min de ultrasonificación con 46.7 ± 23.19 y por último el tratamiento de 6 min de ultrasonificación, lo cual es prácticamente la mitad del resultado obtenido por el control, serían necesarias más pruebas realizando un diseño experimental que permita determinar la formulación idónea para mejorar el perfil de textura del yogur, en este caso firmeza, para poder correlacionar los resultados con otros parámetros como % de sinéresis y viscosidad los cuales se muestran a continuación.

7.12.2. % de Sinéresis en muestras de yogur y viscosidad.

Tabla 13. % de sinéresis y viscosidad de muestras de yogur

Muestra	% sinéresis	Viscosidad (mPa.s)
Control ^(Y1)	30.0 ± 4.95^a	3.5 ± 0.07^a
pH7-0.1M-4min ^(Y2)	41.7 ± 3.18^a	3.2 ± 0.07^{ab}
pH7-0.1M-6min ^(Y3)	46.7 ± 2.83^a	1.9 ± 0.04^b

Y1= yogur 1, Y2= yogur 2 y Y3= yogur 3.

En los resultados obtenidos para el % de sinéresis y viscosidad (Tabla 13), se observa un valor superior en la muestra control sobre las muestras de yogur de los tratamientos de pH7-0.1M con 4 y 6 minutos de ultrasonificación, correlacionando lo obtenido en la prueba de firmeza de gel (Tabla 12), a mayor firmeza el porcentaje de sinéresis es menor y la viscosidad aumenta. El reemplazo de proteína de leche por los tratamientos de WPI con modificación de pH, FI con 4 y 6 minutos de ultrasonificación, tuvo un impacto significativo en las propiedades reológicas (viscosidad y firmeza de gel) de las muestras de yogur, el análisis de varianza, mostró diferencia significativa en la viscosidad de cada yogur ($p > 0.05$) y diferencia significancia (Tukey) entre el Y1 y Y3, pero no entre Y1 y Y2. En el porcentaje de

sinéresis tuvo un incremento de 6.7 % a 20.0 % que pertenecen a Y1 y Y3 respectivamente.

De acuerdo a lo reportado por Shi et al. (2016), la adición de WPI (35 g de proteína/kg) reticulada mediante transglutaminasa durante 5–10 min o polimerizada a 90° C o 100°C durante 10–30 min, mezclada con leche desnatada (35 g de proteína/kg) a 1:2 (v/v), se mejoraron los valores de firmeza ($95.6 \text{ g} \pm 5.2$ a $182.4 \text{ g} \pm 3.5$), viscosidad y una disminución en sinéresis ($\% 30.0 \pm 0.9$ a $\% 24.6 \pm 1.1$) en las muestras de yogur. determinando que el WPI tratado térmicamente es el tratamiento más apropiado para la producción de yogur. Han et al. (2016), reportaron una disminución de % de sinéresis (8.5%) y mejora en la textura, utilizando mezclas de microorganismos que producen exopolisacáridos (*Streptococcus thermophilus* zlw TM11 y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*), que a su vez compararon con cultivos comerciales, siendo el de mejor resultados la combinación de *S. thermophilus* y *L. Bulgaricus*. Concluyendo que el porcentaje de sólidos agregados al yogur y cultivo utilizado son factores que podrían modificarse para obtener mejores resultados, destacando que la concentración de sólidos que son adicionados en las muestras de yogur (tratamientos a pH 7-0.1 M con 4 y 6 minutos de ultrasonificación) fue la mitad de lo adicionado en el control con 6 g.

VIII. CONCLUSIONES

Por medio de Espectroscopía de infrarrojo y técnicas tradicionales (HPLC, electroforesis, difracción láser, DSC, potencial z, AFM y sulfhidrilos libres), se pudo evaluar el efecto de los distintos tratamientos de ultrasonificación, modificación de pH y FI, sobre WPI evidenciando los cambios al observar desnaturalización y su posterior agregación de las proteínas.

La aplicación de los distintos tratamientos de ultrasonido (4 y 6 min, 24 kHz a 400 W) sobre WPI no solo impacta en la estructura de las proteínas, sino que también en las propiedades funcionales, esto modifica el comportamiento de las proteínas durante el proceso de elaboración de yogur, disminuyendo el tiempo de formación del gel y modificando el % de sinéresis que se logra en el gel obtenido, y por tanto modifica las características del producto obtenido.

El uso de FTIR y el análisis de componentes principales es de utilidad para corroborando, las diferencias estructurales entre las muestras tratadas y aquellas sin tratar que se habían observado mediante los cambios espectrales sobre la región de la amida primaria ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$).

Asimismo, se realizó la comparación de las muestras de yogur con WPI tratado por ultrasonificación y un yogur elaborado de forma tradicional, determinando sus diferencias, mediante análisis de textura y propiedades fisicoquímicas (fuerza del gel, viscosidad y % de sinéresis), las cuales se mostraron significativamente diferentes en los parámetros de fuerza del gel y % de sinéresis, no así en viscosidad que mostró una disminución. Este hecho pone en evidencia la necesidad de continuar con el planteamiento y ejecución de estudios de investigación encaminados a la mejora de las propiedades fisicoquímicas y de textura, mediante la generación de agregados por efecto del ultrasonido.

IX. LITERATURA CITADA

- Alavi, F., Momen, S., Emam-Djomeh, Z., Salami, M., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). Radical cross-linked whey protein aggregates as building blocks of non-heated cold-set gels. *Food Hydrocolloids*, 81, 429–441. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.016>
- Antony, B. Schmidt, C. Schütte, (2005), Nonadiabatic effects on peptide vibrational dynamics induced by conformational changes, *J. Chem. Phys.* 122 014309.
- Arjmandi, B.H., Khalil, D.A., Lucas, E., Smith, B., Sinichi, N., Hodges, S., Juma, S., Munson, M., Pay- ton, M. Tivis R. y Sanborg, A. (2004). Soy protein may alleviate osteoarthritis symptoms. *Phytomedicine* 7/8: pp. 567-575
- Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O. E., & Pilosof, A. M. R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 463e472. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodeng.2011.08.018>.
- Ashokkumar, Muthupandian, Lee, J., Kentish, S., & Grieser, F. (2007). Bubbles in an acoustic field: An overview, *Ultrason sonochem*, 14, 470–475. doi:10.1016/j.ultsonch.2006.09.016
- Ashokkumar, Lee, J., Zisu, B., Bhaskarcharya, R., Palmer, M., & Kentish, S. (2009). Hot topic: sonication increases the heat stability of whey proteins. *J. Dairy Sci.*, 92(11), 5353–6.
- Badui, D. S, (2006), *Química de los Alimentos*, Cuarta Ed. Editorial Pearson Educación México. 12: 609-614.
- Barraza, O. A., Del Toro-Sanchez, C. L., Ruiz-Cruz, S., & Márquez-Ríos, E. (2016). Effects of high-energy ultrasound on the functional properties of proteins. *Ultrasonics Sonochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.02.007>
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>
- Behrouzian, F., Razavi, S. M. A., & Karazhiyan, H. (2014). Intrinsic viscosity of cress (*Lepidium sativum*) seed gum: effect of salts and sugars. *Food Hydrocolloids*, 35(0), 100e105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.04.019>.
- Brownlow, S., Morais Cabral, J. H., Cooper, R., Flower, D. R., Yewdall, S. J., Polikarpov, I., et al. (1997). Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution— Still an enigmatic lipocalin. *Structure*, 5, 481–495.

- CANILEC. (2016), Cámara Nacional de Industriales de la Leche. Disponible en <http://www.canilec.org.mx/revista.html>
- Cicvárek, J., et al., Effect of caseinomacropeptide concentrate addition on the growth of Bifidobacteria. *Czech J. Food Sci.*, 2010. 28(6): p. 485-494.
- Considine, T., Patel, H. A., Anema, S. G., Singh, H., & Creamer, L. K. (2007). Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments - A Review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.08.003>
- Cullen, P., Tiwari, B. K., & Valdramidis, V. (Eds.). (2012). Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods (Primera). Estados Unidos de América: Academic Press.
- Chandrapala J, Zisu B, Palmer M, Kentish S, Ashokkumar M. 2011. Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrason Sonochem* 18(5):951–7.
- Chen, W. L., M. T. Huang, H. C. Liu, C. W. Li, and S. J. T. Mao. 2004. Distinction between dry and raw milk using monoclonal antibodies prepared against dry milk proteins. *J. Dairy Sci.* 87:2720–2729.
- Chen, W. L., Hwang, M. T., Liao, C. Y., Ho, J. C., Hong, K. C., & Mao, S. J. T. (2005). β -Lactoglobulin is a Thermal Marker in Processed Milk as Studied by Electrophoresis and Circular Dichroic Spectra. *Journal of Dairy Science*, 88, 1618–1630.
- Chevallier, M., Riaublanc, A., Lopez, C., Hamon, P., Rousseau, F., & Croguennec, T. (2016). Aggregated whey proteins and trace of caseins synergistically improve the heat stability of whey protein-rich emulsions. *Food Hydrocolloids*, 61, 487–495. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.009>.
- Creamer, L. K., S. M. Loveday, and L. Sawyer. (2011) Milk proteins: β -Lactoglobulin. Pages 787–794 in *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2nd ed. J. W. Fuquay, ed. Acad. Press, San Diego, CA.
- Damodaran, N. S. (1996). Amino Acids, peptides and proteins. In O. R. Fennema (Ed.), *Food chemistry* (3rd ed.). (p. 321). New York, NY, USA: Marcel Dekker.
- Farnsworth, J.P., Li, J., Hendricks, G.M., & Guo, M.R. (2006). Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. *Small Ruminant Research*, 65, 113–121. doi:10.1016/j.smallrumres.2005.05.036.

- FAO (2011). Leche y productos lácteos, Organización Mundial de la Salud, Organización de las Naciones Unidas Para La Alimentación Y La Agricultura, Roma, consultada el 01-02-2108, disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i2085s.pdf>
- Gallegos Pineda, A. B. (2015). *Efectos del pretratamiento de termosonicación en la elaboración y maduración de queso chihuahua*. (Tesis de maestría). Facultad de Ingeniería química. BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA.
- Gelamo, E. L., Silva, C. H., Imasato, H., & Tabak, M. (2002). Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: Spectroscopy and modelling. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1594,84–99
- Gelamo, E. L., & Tabak, M. (2000). Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants. *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 56, 2255–2271.
- Gibbens, J,P, (2016). Aplicación de termosonicación e incorporación de proteínas séricas en leche bovina para el mejoramiento de características fisicoquímicas de queso fresco reducido en grasa. (Tesis nivel maestría) Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ingeniería Química.
- Gimel, J.-C., Durand, D.,&Nicolai, T. (1994). Structure and distribution of aggregates formed after heat-induced denaturation of globular proteins. *Macromolecules*, 27, 583–589.
- Guingamp, M.F., Humbert, G. & Linden, G. (1993). Determination of sulfhydryl groups in milk using Ellman's procedure and clarifying reagent. *Journal of Dairy Science*, 76, 2152- 2155. v
- Han, X., Yang, Z., Jing, X., Yu, P., Zhang, Y., Yi, H., & Zhang, L. (2016). Improvement of the Texture of Yogurt by Use of Exopolysaccharide Producing Lactic Acid Bacteria. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7945675>
- Haque, M. A., Chen, J., Aldred, P., & Adhikari, B. (2015). Denaturation and Physical Characteristics of Spray-Dried Whey Protein Isolate Powders Produced in the Presence and Absence of Lactose, Trehalose, and Polysorbate-80. *Drying Technology*, 33(10), 1243–1254. <https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1023311>
- Havea, P., Singh,H., Creamer, L. K.,&Campanella,O.H. (1998). Electrophoretic characterization of the protein products formed during heat treatment of whey protein concentrate solutions. *Journal of Dairy Research*, 65,79–91

- Hayes, M. G., & Kelly, A. L. (2003). High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. *J. Dairy Res.*, 70(3), 297–305.
- Helgason, T., Gislason, J., McClements, D. J., Kristbergsson, K., & Weiss, J. (2009). Influence of molecular character of chitosan on the adsorption of chitosan to oil droplet interfaces in an in vitro digestion model. *Food Hydrocolloids*, 23, 2243e2253.
- Hidalgo ME, Pires MS, Risso PH. (2010). A study on bovine kappa- casein aggregation after the enzymatic action of chymosin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* ;76(2):556-563.
- Hoover, D.G. (2000). Ultrasound- Supplement: Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies. *J. Food Sci.* P.93
- Hong, Y. H., & Creamer, L. K. (2002). Changed protein structures of bovine b-lactoglobulin B and a-lactalbumin as a consequence of heat treatment. *International Dairy Journal*, 12, 345e359
- Hurtado Díaz, S. (2013). Efecto de la aplicación de ultrasonidos en vegetales: Impacto sobre la. Barcelona: Universidad Politécnica de Catalunya.
- Ikeda, S., & Morris, V. J. (2002). Fine-stranded and particulate aggregates of heat-denatured whey proteins visualized by atomic force microscopy. *Biomacromolecules*, 3, 382–389.
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Paniwnyk, L., & Herceg, Z. (2014). Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. *Journal of Food Engineering*, 121,15–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.08.012>.
- Jayat, D., Gaudin, J. C., Chobert, J. M., Burova, T. V., Holt, C., McNae, I., et al. (2004). A recombinant C121S mutant of bovine β -lactoglobulin is more susceptible to peptic digestion and to denaturation by reducing agents and heating. *Biochemistry*, 43, 6312–6321.
- Jiang, Z, Yao, G., Xiangying Y., Zhishen M., Zengli G., Juncai H., Lianzhou J.(2017). Effects of ultrasound treatment on physicochemical, functional properties and antioxidant activity of whey protein isolate in the presence of calcium lactate. <https://doi.org/10.1002/ldr.2981>
- Kinsella, J. E. (1985). Proteins from whey: Factors affecting functional behavior and uses. *Proc. IDF Semin. New Dairy Prod. Via New Technol.*, Belgium, p. 87
- Kuldiloke, J. (2002). Effect of ultrasound, temperature and pressure treatments on enzyme activity and quality indicators of fruit and vegetable juices. PhD TU-Berlin

- Knorr, D., Froehling, A., Jaeger, H., Reineke, K., Schlueter, O., & Schoessler, K. (2011). Emerging technologies in food processing. *Annual Rev Food Sci Technol.* 2, 203–235.
- Lam, R. S. H., & Nickerson, M. T. (2015). The effect of pH and temperature pre-treatments on the physicochemical and emulsifying properties of whey protein isolate. *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.031>
- Liu, Z., Juliano, P., Williams, R.P.W., Niere, J., Augustin, M.A., (2014). Ultrasound effects on the assembly of casein micelles in reconstituted skim milk. *J. Dairy Res.* 81, 146e155. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022029913000721>.
- Lorenzen, P. C., & Schrader, K. (2006). A comparative study of the gelation properties of whey protein concentrate and whey protein isolate. *Le Lait*, 86, 259–271.
- Lucey, J.A., Rennet-Induced Coagulation of Milk, in *Encyclopedia of Dairy Sciences*, J.W. Fuquay, P.F. Fox, and P.L.H. McSweeney, Editors. 2011, Academic Press. Elsevier.
- Lam, R.S.H. and Nickerson, M.T. (2014) The Effect of pH and Temperature Pre-Treatments on the Physicochemical and Emulsifying Properties of Whey Protein Isolate. *LWT—Food Science and Technology*, 173, 163-170.
- Malvern Instruments. (2012). A basic guide to particle characterization. England, Traducido por D. Jesús Carlos Puebla IESMAT, S.A. España, Ref: IESMATNA 1. 1-9.
- Marangoni, A.G., S. Barbut, S.E. McGauley, M. Marcone, and S.S. Narine. 2000. On the structure of particulate gels--the case of salt-induced cold gelation of heat-denatured whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*. 14(1): 61-74.
- Morr, C. V., & Ha, E. Y. W. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33,431e476.
- Murayama K, Tomida M (2004) Heat-induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 43:11526–11532.
- Muro, C., Díaz, C.,García, B.,Zavala, R. E.,Ortega, R.E., Álvarez, R. y Riera, F. (2010). Recuperación de los componentes del lactosuero residual de una industria elaboradora de queso utilizando membranas. *Afinidad: Revista de química teórica y aplicada*, 67(547), 212-220.

- Mulcahy, E. M., Mulvihill, D. M., & O'Mahony, J. A. (2016). Physicochemical properties of whey protein conjugated with starch hydrolysis products of different dextrose equivalent values. *International Dairy Journal*, 53, 20–28.
- Mulcahy, E. M., Fargier-Lagrange, M., Mulvihill, D. M., & O'Mahony, J. A. (2017). Characterisation of heat-induced protein aggregation in whey protein isolate and the influence of aggregation on the availability of amino groups as measured by the ortho-phthaldialdehyde (OPA) and trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) methods. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.155>
- McSweeney, P. L. H., & Fox, P. F. (2013). Quantitation of Proteins in Milk and Milk Products. In *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects* (4a ed.). New York, USA: Springer.
- N.A. Nevskaya, Y.N. Chirgadze. (1976), Infrared spectra and resonance interactions of amide-I and II vibrations of α -helix, *Biopolymers* 15 637–648.
- Nicolai, T., Britten, M., & Schmitt, C. (2011). ??-Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1945–1962. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.006>
- Nicolai, T., & Durand, D. (2013). Controlled food protein aggregation for new functionality. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 18(4), 249–256. <http://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.03.001>
- Oria, R. (1991). *Ciencia y tecnología de la leche. Principios y aplicaciones*. Zaragoza – España. Editorial Acirbia S.A. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77088-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77088-0)
- O'Sullivan, J., Arellano, M., Pichot, R., & Norton, I. (2014). The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of dairy proteins. *Food Hydrocolloids*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.011>
- Papiz, M. Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E. E., North, A. C. T., Findlay, J. B. C., Sivaprasadarao, R., Jones, T. A., Newcomer, M. E. & Kraulis, P. J. (1986) The structure of α -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol binding protein, *Nature* 324, 383-385
- Patist, A., & Bates, D. (2008). Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 147-154.
- Pelegrine, D. H. G., & Gasparetto, C. A. (2005). Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.03.013>

- Pérez-Mata, M. G. (2014). Cambios en propiedades funcionales de queso tipo Mozzarella elaborado con leche tratada por termosonicación. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.-S., & Chemat, F. (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control*, 31(2), 593–606.
- Protein date bank in Europe, consultado el 26 de octubre del 2016. Disponible en <http://europepmc.org/articles/PMC3013808/>
- Rae, J., Ashokkumar, M., Eulaerts, O., von Sonntag, C., Reisse, J., & Grieser, F. (2005). Estimation of ultrasound induced cavitation bubble temperatures in aqueous solutions. *Ultrason Sonochem.*, 12(5), 325–9.
- Reiter, B. 1985. The biological significance and exploitation of the non-immunoglobulin protective proteins in milk: Lysozyme, lactoferrin, lactoperoxidase, xanthine oxidase. *IDF Bull.* (191). 2.
- Robles Ozuna, L., & Ochoa Martínez, L. (2012). Ultrasonido y sus Aplicaciones en el procesamiento de Alimentos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 13(2), 109-122.
- Ruvalcaba, G. J. . (2015). Determinación del Efecto de la Formación de Agregados de β -Lactoglobulina sobre las Características Físico-químicas del Queso Adobera. (Tesis nivel maestría) INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, Centro de Investigación en biotecnología aplicada.
- Ryan, K.N., et al., Stability and mechanism of whey protein soluble aggregates thermally treated with salts. *Food Hydrocolloids*, 2012. 27: p. 411- 420.
- Salazar, J., Antoni, T., Chávez, J., & García - Hernández, M. (2012). Process Design Involving Ultrasound. *Food Proc. Desig.* pp. 1107–1155. Blackwell Publishing.
- Silva, L. (2005). Imaging Proteins with Atomic Force Microscopy: An Overview. *Current Protein & Peptide Science*, 6(4), 387–395. <https://doi.org/10.2174/1389203054546389>
- Singh, R. P., & Heldman, D. R. (2009). Introduction to Food Engineering (Cuarta.). Estados Unidos de América: Academic Press
- Schmitt, C., Bovay, C., Rouvet, M., Shojaei-Rami, S., & Kolodziejczyk, E. (2007). Whey protein soluble aggregates from heating with NaCl: Physicochemical, interfacial, and foaming properties. *Langmuir*, 23(8), 4155–4166. <https://doi.org/10.1021/la0632575>

- Shen, X., Shao, S., & Guo, M. (2016). Ultrasound-induced changes in physical and functional properties of whey proteins. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(2), 381–388. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13292>
- Shen, X., Fang, T., Gao, F., & Guo, M. (2017). Effects of ultrasound treatment on physicochemical and emulsifying properties of whey proteins pre- and post-thermal aggregation. *Food Hydrocolloids*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.003>
- Shen, X., Zhao, C., & Guo, M. (2017). Effects of high intensity ultrasound on acid-induced gelation properties of whey protein gel. *Ultrasonics Sonochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.05.039>
- Shi, J., Li, D., & Zhao, X. H. (2016). Atributos cualitativos del yogur desnatado preparado con aislado proteínico de lactosuero con reticulación enzimática o polimerizado térmico. *CYTA - Journal of Food*, 15(1), 34–40. <https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1200673>
- Strom , M. B., Rekdal , O. and Svendsen , J. S. (2000). Antibacterial activity of 15-residue lactoferricin derivatives. *Journal of Peptide Research*, 56, 265 – 74
- Strom , M. B.,Haug, B. E.,Rekdal , O. , Skar , M. L. , Stensen , W. and Svendsen , J. S. (2002). Important structural features of 15-residue lactoferricin derivatives and methods for improvement of antimicrobial activity.*Biochemistry and Cell Biology* , 80, 65 –74
- Torkamani, A. E., Juliano, P., Ajlouni, S., & Singh, T. K. (2014). Impact of ultrasound treatment on lipid oxidation of Cheddar cheese whey. *Ultrason Sonochem.*, 21(3), 951–7.
- Updegrave, K. (2005). Human Milk Banking in the United States Newborn and Infant Nursing. 5 (1), 27 - 33.
- Walstra, P. and R.M.O. Almudí, (2001). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*: Acribia, Editorial, S.A.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M., & Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology. Facilities* (Vol. 4). <https://doi.org/9780824727635>
- Wang, W., Zhong, Q., & Hu, Z. (2013). Nanoscale understanding of thermal aggregation of whey protein pretreated by transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf304506n>

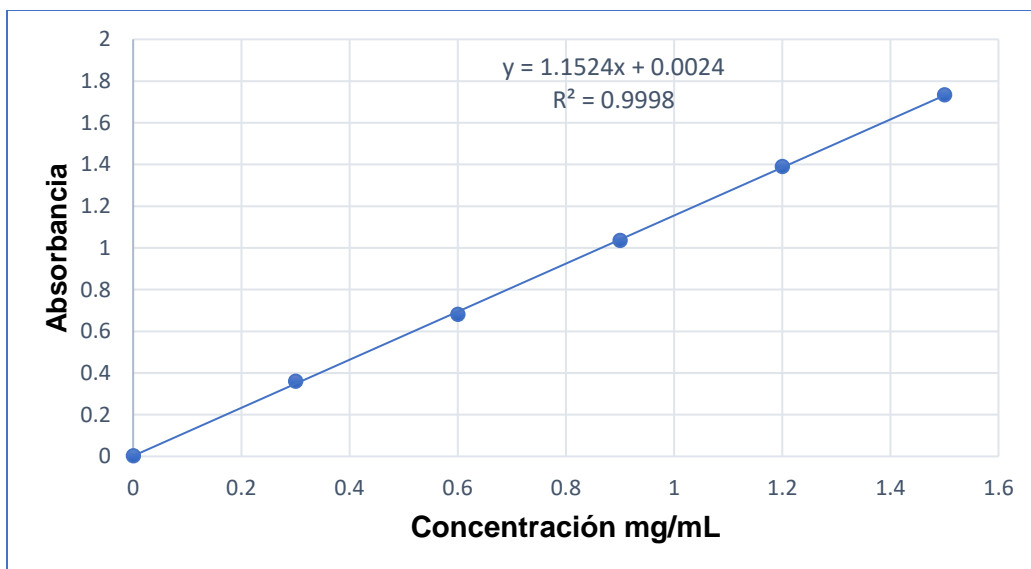
- Wang, C.-S., Chan, W.-Y., and Kloer, H. U. (1984). Comparative studies on the chemical and immunochemical properties of human milk, human pancreatic juice and bovine milk lactofemn. *Comp. Biochem. Physiol.* **78B**, 575.
- Wijayanti, H. B., Waanders, J., Bansal, N., & Deeth, H. C. (2015). Identification of the binding of b-lactoglobulin (b-Lg) with sulfhydryl (–SH) blocking reagents by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and electrospray ionisation/time of flight-mass spectrometry (ESI/TOF-MS). *LWT-Food Science and Technology*, 63, 934–938.
- Zimmerman-Stein, K., & Ruiz-Espinoza, H. (2010). Estructura y funcionalidad de proteínas lácteas: Efecto de modificaciones inducidas por métodos físicos, químicos y enzimáticos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*.

X. ANEXOS

10.1. Curva estándar de estándar de β -LG para la cuantificación de concentración cargada en cada pozo en el gel de PAGE.

A partir de una solución stock 10 mg /mL (10 mg de proteína en 1 mL de agua destilada). se preparó una serie de diluciones para obtener concentraciones finales de proteína de 1.5 mg/mL hasta 0 mg/mL. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific Evolution 600 (England EV6-171104) y una celda de cuarzo a una absorbancia de 280 nm. Los datos de concentración y absorbancia se graficaron para obtener el valor de R² y la ecuación para la cuantificación de concentración de proteína cargada en cada pozo.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia
1.5	1.73
1.2	1.377
0.9	1.034
0.6	0.678
0.3	0.351
0	0.002



10.2. Curva estándar de β -LG tomada en HPLC para la cuantificación de β -LG.

Para la curva se prepararon una serie de muestras de β -LG estándar (Sigma Aldrich) en dispersión. Las muestras se analizaron por HPLC de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 8.1.3 de este documento. En los cromatogramas se observan los dos picos correspondientes a las variantes A y B de β -LG así como las concentraciones totales de la proteína. En los gráficos se incluyen los valores de R2 y las ecuaciones generadas para la cuantificación de β -LG.

Concentracion (ppm)	Area pico 1.	Area pico 2.	Area total
5000	1.767E+04	2.034E+04	3.801E+04
4500	1.516E+04	1.779E+04	3.295E+04
4000	1.298E+04	1.504E+04	2.803E+04
3500	1.076E+04	1.246E+04	2.323E+04
3000	9.708E+03	1.117E+04	2.087E+04
2500	7.800E+03	8951.3584	1.675E+04
2000	5.976E+03	6788.17773	1.276E+04
1500	3.854E+03	4316.62842	8.171E+03
1000	2.291E+03	2854.04712	5.145E+03
500	7.412E+02	830.33966	1.572E+03

