

# **MODIFICACIONES FOTO-OXIDATIVAS DE LAS PRINCIPALES PROTEÍNAS LÁCTEAS**

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

Por

**Lic. Geraldine Larsen**

Prof. Dra. Silvia Clara Kivatinitz

**Directora**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
ARGENTINA**

RESUMEN .....	7
ABREVIATURAS .....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
Lactosuero y caseína.....	11
1.1 Historia .....	11
1.2 Productos lácteos en Argentina .....	12
<b>Figura 1.</b> Exportaciones lácteas argentinas por producto.....	13
La leche.....	14
2.1 Composición de la leche.....	14
<b>Figura 3.</b> Esquema de la composición y distribución de los componentes de la leche.....	14
<b>Tabla 1.</b> Perfil de ácidos grasos de la leche producida por la Cuenca Lechera Central de la Argentina.....	15
2.2 Proteínas de la leche .....	16
<b>Figura 4.</b> Esquema de Rowland de partición de proteínas de leche de vaca .....	16
<b>Tabla 2.</b> Proteínas de la leche de vaca y otros componentes con nitrógeno, separados por el método de Rowland y determinados por Kjeldahl. ....	17
<b>Tabla 3.</b> Propiedades de las proteínas lácteas que se encuentran en mayor proporción.....	17
2.2.1 Estructura y características funcionales de $\beta$ -Lactoglobulina .....	17
<b>Figura 5.</b> Modelo estructural de $\beta$ -lactoglobulina. ....	18
<b>Figura 6.</b> Estructura primaria de $\beta$ -lactoglobulina.....	18
<b>Figura 7.</b> Mecanismo simplificado de autoensamblaje de $\beta$ -lactoglobulina .....	19
2.2.2 Estructura y características de $\beta$ -caseína .....	20
<b>Figura 8.</b> Estructura primaria de $\beta$ -caseína.....	20
<b>Figura 9.</b> Modelo estructural de $\alpha$ 1(A), $\alpha$ 2 (B) y $\beta$ -caseína (C) .....	20
2.2.3 Estructura y características de $\alpha$ -caseína .....	21
<b>Figura 10.</b> Estructura primaria de $\alpha$ 1-caseína .....	22
<b>Figura 11.</b> Estructura primaria de $\alpha$ 2-caseína .....	22
Procesamiento tecnológico de la leche y de sus principales componentes .....	23
3.1 Caseína.....	23
<b>Figura 12.</b> Método convencional para la fabricación de caseinatos.....	24
3.2 Lactosuero .....	25
<b>Tabla 4.</b> Composición aproximada del suero en porcentaje .....	26
<b>Figura 13.</b> Tratamientos que sufre el lactosuero en la industria alimentaria.....	26
Tratamientos para reducir la carga microbiana en alimentos .....	28
Almacenaje de la leche en góndolas iluminadas con luz fluorescente .....	29
Oxidación de proteínas .....	31

<b>Figura 14.</b> Vías de oxidación de proteínas .....	31
4.1 Cambios en la estructura primaria de la proteína. Oxidación de aminoácidos.....	32
<b>Tabla 5.</b> Productos de oxidación de aminoácidos.....	32
<b>Figura 15.</b> Estructuras químicas de grupos carbonilos proteicos .....	33
4.2 Oxidación de proteínas por luz.....	34
4.3 Oxidación de residuos triptófano.....	35
<b>Figura 16.</b> Formación de productos de oxidación del triptófano.....	36
4.4 Oxidación de residuos tirosina .....	36
<b>Figura 17.</b> Formación de ditirosina produciendo el enlace entre dos moléculas proteicas distintas .....	37
4.5 Formación de polímeros, oligómeros y agregados .....	37
Bibliografía.....	39
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	44
RESULTADOS .....	46
CAPÍTULO 1. CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES PROTEICAS .....	47
1.1 Dosaje y composición química de las muestras .....	47
<b>Tabla 1.1</b> Composición de las muestras sin ningún tratamiento previo. ....	47
1.2 Verificación de la composición proteica de las muestras analizadas .....	47
<b>Tabla 1. 2</b> Composición proteica de WPI y CN sin ningún tratamiento previo. ...	48
<b>Figura 1.1</b> Análisis de composición elemental CHN. ....	48
1.3 Pureza e integridad de las proteínas .....	48
<b>Figura 1.2</b> Perfiles proteicos de las muestras sin irradiar.....	49
1.4 Revisión de los métodos colorimétricos para dosar proteínas lácteas.....	50
<b>Figura 1.3.</b> Cuantificación de proteínas lácteas.....	50
1.5 Conclusiones.....	51
CAPÍTULO 2. CAMBIOS ESTRUCTURALES DE LAS PROTEÍNAS LÁCTEAS SOMETIDAS A IRRADIACIÓN UV-C .....	52
2.1 Fragmentación, polimerización y agregación de $\beta$ -CN y $\beta$ -LG .....	52
<b>Figura 2.1</b> Cinética de proteólisis y de agregación de $\beta$ -CN y de $\beta$ -LG sometidas a irradiación UV-C. ....	53
2.2 Modificaciones en aminoácidos y cambios en la estructura terciaria y cuaternaria en $\beta$ -CN y $\beta$ -LG.....	53
<b>Figura 2.2</b> Cinética de decaimiento de la fluorescencia de triptófano para $\beta$ -LG (panel A) y $\beta$ -CN (panel B). ....	54
<b>Figura 2.3</b> Cinética de la formación de fluorescencia de ditirosina (410 nm) para $\beta$ -LG (panel A) y $\beta$ -CN (panel B). ....	55
<b>Tabla 2.1</b> Análisis cinético de la oxidación de aminoácidos de $\beta$ -CN y $\beta$ -LG.....	56
2.3 Fragmentación, polimerización y agregación de CN y WPI.....	56

<b>Figura 2.4</b> Cinética de proteólisis y de agregación de CN y WPI sometidas a irradiación UV-C. ....	57
2.4 Modificaciones en aminoácidos y cambios en la estructura terciaria y cuaternaria de CN Y WPI.....	57
<b>Figura 2.5</b> Cinética de decaimiento de la fluorescencia de triptófano para WPI (panel A) y CN (panel B). ....	58
<b>Tabla 2.2</b> Análisis cinético de la oxidación de aminoácidos de CN y WPI. ....	58
<b>Figura 2.6</b> Cinética de de la formación fluorescencia de formación de ditirosina para WPI (panel A) y CN (panel B). ....	59
2.5 Mecanismo del cambio estructural de WPI y CN como consecuencia de los cambios oxidativos .....	60
<b>Figura 2.7</b> Fluorescencia de triptófano.....	60
2.6 Conclusiones.....	61
<b>Tabla 2.3</b> Resultados comparativos para las cuatro muestras.....	62
CAPÍTULO 3. OXIPROTEÓMICA DE LAS PROTEÍNAS LÁCTEAS .....	63
3.1 Integridad de la proteína nativa .....	64
<b>Figura 3.1</b> Composición polipeptídica de WPI .....	64
3.2.1 Péptidos fotolíticos identificados en $\beta$ -LG .....	65
<b>Tabla 3.1</b> Péptidos de $\beta$ -LG generados por radiación UV-C.....	65
<b>3.2.2 Péptidos fotolíticos identificados en <math>\beta</math>-CN</b> .....	65
3.2.3 Péptidos fotolíticos identificados en $\alpha$ -CN.....	65
<b>Tabla 3.2</b> Péptidos de CN generados por radiación UV-C. ....	67
3.3 Modificaciones en la secuencia primaria.....	67
3.3.1 Oxidación de Triptófano.....	67
3.3.1.1 $\beta$ -LG.....	67
<b>Figura 3.2</b> Modificaciones oxidativas del aminoácido triptófano en $\beta$ -LG.....	68
3.3.1.2 $\beta$ -CN y $\alpha$ -CN .....	69
<b>Figura 3.3</b> Modificaciones oxidativas del aminoácido triptófano en $\beta$ -CN y $\alpha$ -CN. ....	70
3.3.2 Oxidación en tirosina.....	71
3.3.2.1 Ditirosinas.....	71
3.3.3 Nitración de tirosina .....	71
3.3.3.1 $\beta$ -LG.....	71
<b>Figura 3.4</b> Formación de Nitrotirosinas por foto-oxidación en péptidos de $\beta$ -LG.72	
3.3.3.2 $\beta$ -CN y $\alpha$ -CN .....	73
<b>Figura 3.5</b> Formación de Nitrotirosinas por foto-oxidación en péptidos de $\beta$ -CN y $\alpha$ -CN. ....	74
3.3.4 Oxidación de metionina.....	75
3.3.4.1 $\beta$ -LG.....	75

<b>Tabla 3.3</b> Péptidos de $\beta$ -LG con modificaciones oxidativas en el aminoácido metionina.....	75
3.3.4.2 $\beta$ -CN .....	76
<b>Tabla 3.4</b> Péptidos de $\beta$ -CN con modificaciones oxidativas en el aminoácido metionina .....	76
3.3.4.3 $\alpha$ -CN .....	77
<b>Tabla 3.5</b> Péptidos de $\alpha$ -CN con modificaciones oxidativas en el aminoácido metionina.....	77
3.3.5 Oxidación de prolina .....	78
3.3.5.1 $\beta$ -LG.....	78
<b>Tabla 3.6</b> Péptidos de $\beta$ -LG con modificaciones oxidativas en el aminoácido prolina.....	79
3.3.5.2 $\beta$ -CN .....	79
<b>Tabla 3.7</b> Péptidos de $\beta$ -CN con modificaciones oxidativas en el aminoácido prolina.....	81
3.3.5.3 $\alpha$ -CN .....	81
<b>Tabla 3.8</b> Péptidos de $\alpha$ -CN con modificaciones oxidativas en el aminoácido prolina.....	83
3.4 Conclusiones.....	83
<b>Figura 3.6</b> Mecanismo de formación de nitrotirosina .....	85
Bibliografía.....	87
<b>CAPÍTULO 4. IMPACTO DE LA FOTO-OXIDACIÓN EN LAS PROTEÍNAS LACTEAS</b> .....	88
4.1 Cuantificación de proteínas industriales.....	88
4.1.2 Métodos no colorimétricos .....	88
<b>Tabla 4.1</b> Determinación de proteínas en muestras de WPI y CN .....	88
4.1.3 Métodos colorimétricos .....	89
<b>Figura 4.1</b> Cuantificación de proteínas lácteas por técnicas colorimétricas.....	89
4.2 Análisis de las secuencias peptídicas susceptibles de fragmentación fotolítica... 90	
4.2.1 $\beta$ -LG.....	90
<b>Figura 4.2.</b> Cortes fotolíticos de $\beta$ -LG después de 4 hs de irradiación UV-C.....	90
<b>Figura 4.3</b> Cortes fotolíticos de $\beta$ -LG después de 24 hs de irradiación UV-C.....	91
4.2.2 $\beta$ -CN .....	91
<b>Figura 4.4</b> Cortes fotolíticos de $\beta$ -CN después de 4 hs de irradiación UV-C. ....	91
<b>Figura 4.5</b> Cortes fotolíticos de $\beta$ -CN después de 24 hs de irradiación UV-C. ....	92
4.2.3 $\alpha$ -CN .....	92
<b>Figura 4.6</b> Cortes fotolíticos de $\alpha$ s1-CN después de 4 hs de irradiación UV-C....	92
<b>Figura 4.7</b> Cortes fotolíticos de $\alpha$ s1-CN después de 24 hs de irradiación UV-C..	93
<b>Figura 4.8.</b> Cortes fotolíticos de $\alpha$ s2-CN después de 4 hs de irradiación UV-C... 93	

<b>Figura 4.9</b> Cortes fotolíticos de $\alpha$ 2-CN después de 24 hs de irradiación UV-C..	94
4.3 Desaparición de la cripticidad de los sitios trípticos por foto-oxidación .....	94
4.3.1 $\beta$ -LG.....	94
<b>Figura 4.10</b> Cortes trípticos teóricos ( $\lambda$ ) y efectivos ( $\checkmark$ ) en $\beta$ -LG.....	94
4.3.2 CN.....	95
<b>Figura 4.11</b> Cortes trípticos teóricos ( $\lambda$ ) y efectivos ( $\checkmark$ ) en $\beta$ -CN. ....	95
4.3.3 $\alpha$ -CN .....	95
<b>Figura 4.12</b> Cortes trípticos teóricos ( $\lambda$ ) y efectivos ( $\checkmark$ ) en $\alpha$ 1CN. ....	95
<b>Figura 4.13</b> Cortes trípticos teóricos ( $\lambda$ ) y efectivos ( $\checkmark$ ) en $\alpha$ 2CN. ....	96
4.4 Fotólisis: generación de péptidos bioactivos .....	96
<b>Tabla 4.2</b> Péptidos fotolíticos con bioactividad descripta .....	97
4.5 Conclusiones.....	97
Bibliografía.....	100
DISCUSIÓN.....	101
Aportes al conocimiento de la foto-oxidación y estructura de las proteínas lácteas	102
Fragmentación y polimerización proteica por acción fotolítica y su relación con la estructura terciaria .....	107
Efectos de la foto-oxidación en la funcionalidad de las proteínas estudiadas como sustrato de una enzima proteolítica .....	108
Efectos de la foto-oxidación en la generación de péptidos bioactivos .....	109
Conclusiones finales .....	110
Bibliografía.....	111
MATERIALES Y MÉTODOS.....	114
Materiales .....	115
Modelo experimental.....	115
Métodos analíticos.....	116
Bibliografía.....	119

## RESUMEN

El caseinato (CN) y la proteína aislada de suero (WPI) son dos de los productos industriales más importantes derivados de la leche, ampliamente utilizados como ingredientes alimenticios y suplementos dietarios.

El objetivo de esta tesis fue estudiar la oxidación de las fracciones proteicas de la leche de vaca (caseinato y suero), y de las proteínas aisladas de ésta ( $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) y  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -CN)) por un agente de relevancia industrial, como la radiación lumínica. Los objetivos específicos fueron: caracterizar las fracciones industriales de proteínas del suero y caseínas utilizadas, composición química, pureza e integridad de la cadena de aminoácidos; determinar la integridad de las proteínas y grado de proteólisis; entender la relación entre estado oxidativo, la formación de agregados y polímeros con la calidad del producto final; determinar los cambios oxidativos a nivel de secuencia primaria, identificando los aminoácidos afectados, utilizando oxiproteómica como herramienta y determinar cambios en la funcionalidad de las fracciones proteicas: alteración en la cuantificación de proteínas, especificidad como sustratos de la tripsina y generación de péptidos bioactivos.

En cuanto a la composición relativa de proteínas se observó que los preparados industriales que se utilizaron en la presente tesis fueron semejantes a las proteínas puras (Sigma) tanto en composición como en integridad, sobretodo en el caso de WPI y  $\beta$ -LG. Cuando las proteínas puras y las industriales fueron sometidas a irradiación UV-C se observó disminución de triptófano, aparición de NFK (N-formilkinurenina) y formación de ditirosina en todos los casos. Las velocidades y niveles de reacción fueron distintos según las proteínas fueran puras o industriales y si eran proteínas séricas o caseinatos. La proporción de agregados y proteólisis fue muy distinta en las proteínas industriales respecto de las puras.

La oxiproteómica demostró ser una técnica útil en la observación de péptidos fotolíticos y en la generación de cambios en el estado de oxidación de los aminoácidos tirosina, triptófano, metionina y prolina. Los cambios observados permitieron relacionar la estructura terciaria con la susceptibilidad a los distintos cambios foto-oxidativos (generación de fragmentos fotolíticos, polimerización, destrucción de motivos con funcionalidad biológica específica).

Se describe como la foto-oxidación afectó la estructura primaria de las proteínas estudiadas, alterando así la capacidad de formar polímeros, generar péptidos bioactivos y unir moléculas pequeñas.

Esta tesis se inscribe en la corriente que está utilizando la proteómica alimentaria para analizar los alimentos ricos en proteínas y las modificaciones inducidas por el procesamiento. Nuestros resultados contribuyen demostrando que las proteínas lácteas industriales contienen alteraciones a nivel de aminoácidos que son producto del proceso de elaboración. También muestra las alteraciones a nivel de aminoácidos producidos por irradiación UV-C, tecnología que es utilizada en la industria como método para reducir la carga bacteriana.

## ABSTRACT

Caseinate (CN) and whey protein isolate (WPI) are two of the most important industrial products derived from milk, both are widely used as food ingredients and dietary supplements.

The goal of this thesis was to study the oxidation of the protein fractions of cow's milk (caseinate and serum), and of isolated proteins ( $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -LG) and  $\beta$ -casein ( $\beta$ -CN)) by a procedures of industrial relevance, such as light radiation.

The specific objectives were: to characterize the industrial fractions of whey proteins and caseins used, chemical composition, purity and integrity of the primary sequence; analyze the relationship between the integrity of the proteins (degree of proteolysis, the formation of aggregates and polymers) to understand the relationship between oxidative state and the quality of the final product; to determine the oxidative changes at the primary sequence level, to identify the affected amino acids, using oxiproteomics as a tool. Finally, to determine changes in the functionality of the protein fractions caused by photooxidation as alteration in the quantification of proteins, specificity as substrates of the enzyme trypsin and the generation of bioactive peptides.

Regarding the relative composition of proteins, it was observed that the industrial preparations used in this thesis were similar to the pure proteins (Sigma) both in composition and integrity, especially in the case of WPI and  $\beta$ -LG. When pure and industrial proteins were subjected to UV-C irradiation, a decrease in tryptophan, the appearance of NFK (N-formylkinurenine) and the formation of dityrosine were observed in all cases. The speeds and reaction levels were different depending on whether the proteins were pure or industrial and whether they were serum proteins or caseinates. The proportion of aggregates and proteolysis was very different in industrial proteins compared to pure ones.

Oxiproteomics proved to be a useful technique to identify photolytic peptides and the changes in the oxidation state of the amino acids tyrosine, tryptophan, methionine and proline. The observed changes allowed to establish a relationship between the tertiary structure and the different photo-oxidative effects (generation of photolytic fragments, polymerization, destruction of motifs with specific biological functionality).

It is described how photo-oxidation affected the primary structure of the proteins studied, thus altering the ability to form polymers, generate bioactive peptides and bind small molecules.

This thesis give further sustent to the use of food proteomics in analyzing protein-rich foods and the modifications induced by industrial processing. Our results contribute to demonstrate that industrial milk proteins contain alterations at the level of amino acids that are a product of the manufacturing process. It also shows alterations at the level of amino acids produced by UV-C irradiation, technology that is used in the industry as a method to reduce bacterial load.



## ABREVIATURAS

CN: Caseinato de sodio

WPI: Aislado de proteína de suero

WPC: Concentrado de proteína de suero

$\beta$ -LG:  $\beta$ -lactoglobulina

$\alpha$ -LA:  $\alpha$ -lactoalbúmina

$\beta$ -CN:  $\beta$ -caseína

$\alpha_{s1}$ -CN:  $\alpha_{s1}$ -caseína

$\alpha_{s2}$ -CN:  $\alpha_{s2}$ -caseína

$\kappa$ -CN:  $\kappa$ -caseína

BSA: Albúmina sérica bovina

NFK: *N*-formilquinurenina

KYN: quinurenina

SDS: dodecilsulfato de sodio

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

SEM: error estándar del promedio

UV: radiación ultravioleta

UV-C: radiación ultravioleta longitudes de onda entre 280 a 100 nanómetros

Aminoácidos

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

## INTRODUCCIÓN

## Lactosuero y caseína

### 1.1 Historia

Se conoce el lactosuero desde hace 3000 años aproximadamente. Históricamente se lo consideraba como un desecho industrial de la fabricación de queso y de caseína. Estas circunstancias condujeron a que las compañías lácteas desarrollen diferentes maneras de desechar este producto poco deseado: pulverización del suero, descarga en ríos, lagos o el océano. Estas alternativas se consideran contaminantes debido al alto contenido de materia orgánica. Otra alternativa era vender el suero como alimento para animales con un bajo beneficio. Todas estas formas de tratar de desechar el suero de leche se basaron en que éste era un producto con poco valor y por lo tanto necesitaban eliminarlo de la manera más económica posible [1].

El alto poder contaminante del suero de leche, con una demanda biológica de oxígeno (DBO) 175 veces superior a los efluentes típicos, llevó a gobiernos y otras autoridades reguladoras a restringir o prohibir la eliminación de suero no tratado. Esto, más la presión de la sociedad, obligó a las fábricas lecheras a reformular el manejo de los grandes volúmenes de suero generados [1].

Los adelantos científicos y tecnológicos han abordado muchas de las limitaciones descritas anteriormente y han ayudado a establecer una base sólida para la moderna industria de suero, el uso generalizado de proteína de suero y de otros ingredientes (por ejemplo, lactosa) en la industria alimentaria y afines [1].

La tecnología para el tratamiento del lactosuero fue mejorando a medida que se fue comprendiendo el comportamiento de los sólidos durante la concentración, fraccionamiento y deshidratación. Las técnicas que se utilizan para obtener lactosuero desmineralizado en polvo son: cromatografía, electrodiálisis y técnicas de filtración por membrana (como nano filtración) [2-3]. Teniendo en cuenta que, en Latinoamérica, aproximadamente un 20% de la población vive por debajo de la línea de pobreza y presenta diferentes grados de deficiencias alimentarias, destinar el lactosuero a la alimentación animal y no incorporarlo al circuito de alimentación humana, sería desaprovechar el suero como opción para que esta importante fuente nutricional pueda ser utilizada como alimento para las comunidades más desfavorecidas. Es importante resaltar que mil litros de lactosuero contienen 9 kg de proteína de alto valor biológico, 50 kg de lactosa y 3 kg de grasa de leche, esto equivale a los requerimientos diarios de proteína para 130 personas y de energía para más de 100 personas [4]. Estos polvos suelen ser utilizados como suplementos dietarios en alimentos o en formulaciones como ingredientes.

Las técnicas de procesado con membranas de microfiltración, ultra y diafiltración han ayudado a obtener un suero rico en proteínas y bajo en grasas. Estas preparaciones comprenden los concentrados de suero (WPC) y los aislados de suero (WPI). La introducción al mercado comercial de estos preparados condujo a que el lactosuero sea utilizado como ingrediente de otros productos. El avance de nuevas técnicas de concentración facilitó la obtención de suero en polvo con diversas características físico químicas (solubilidad, gelación, aireación, unión con el agua y emulsificación) que permitió otros usos aumentando el valor nutricional y funcional del producto.

WPC y WPI son una excelente fuente de proteínas, lípidos, vitaminas, minerales y lactosa, estas propiedades son las que han impulsado que el lactosuero sea un co-producto (by-product) valioso de la industria láctea [5].

Las caseínas, son un grupo de fosfoproteínas específicas de la leche y representan el 80% de las proteínas totales de la leche bovina. Debido a su importancia comercial, las caseínas se han estudiado con mucho detalle y es probablemente el alimento mejor caracterizado en cuanto a sus propiedades físicas y químicas. Inicialmente, las partículas de caseína eran llamadas "caseinato de calcio/ partículas de fosfato de calcio". El término "micela de caseína" fue introducido en 1921 y los dos términos se utilizaron indistintamente durante varios años, pero desde aproximadamente 1960, el último término ha sido utilizado exclusivamente. Se ha sugerido que el calcio "caseinato de calcio/ partículas de fosfato de calcio" no son verdaderas micelas. El término "micela" fue introducido por Nägeli y Schwendener [Nägeli, C.W., & Schwendener, W. (1877)] para micropartículas de celulosa en células vegetales visibles en el microscopio óptico; más tarde, fue utilizado para varios otros tipos de agregados.

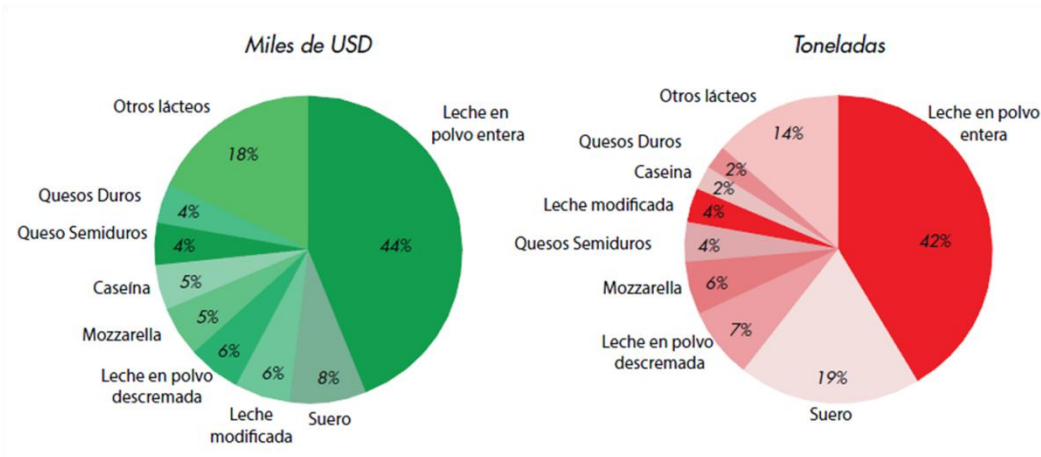
Debido a la importancia de las micelas de caseína para muchas de las propiedades fisicoquímicas de la leche y los productos lácteos, su estructura, propiedades, efectos de composición y factores de procesamiento sobre el mismo se han estudiado ampliamente. Desde el descubrimiento de la proteína estabilizadora de micelas,  $\kappa$ -caseína en 1956, se han propuesto y pulido varios modelos de la micela de caseína [6]. Las películas preparadas con caseína demostraron que estas películas podrían tener aplicaciones potenciales en el envasado. Además, estos materiales demostraron ser una barrera física adecuada contra la contaminación microbiológica, que podría aprovecharse como material de protección para los alimentos [7-8].

## **1.2 Productos lácteos en Argentina**

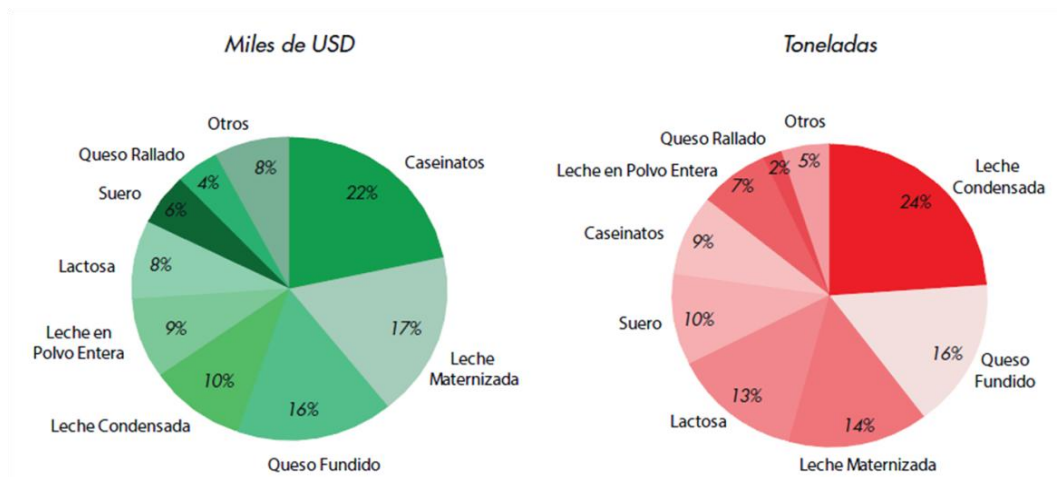
En lo que respecta a estadísticas generales del sector, puede decirse que en el año 2015 Argentina alcanzó una participación cercana al 1,8% de la producción global de leche (alrededor de 11 millones de toneladas), una cifra que, por otro lado, viene manteniéndose más o menos constante en la última década. Es además, el segundo productor de Latinoamérica después de Brasil (país que alcanza una participación del 5% de la producción global con algo más de 34 millones de toneladas del producto) y el decimoquinto a nivel mundial, luego de países como EE.UU. (1°), India (2°), China (3°), Brasil (4°) o Nueva Zelanda (8°) (KPMG, indicador económico 2016). Las provincias que reúnen la mayor parte de esta actividad, son Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba. La producción de quesos se inicia en los 13.000 tambos que remiten leche a las más de 870 queserías existentes en el país, con una amplia diversidad de tamaños que va desde algunos cientos de litros por día a cientos de miles de litro por día. El consumo per cápita doméstico de este producto ronda los 20,0 kilos incluyendo todos los tipos de quesos. De hecho, el 50% de la leche que se consume es a través de quesos. Los datos de la categoría se refieren al sector minorista, más precisamente, a los supermercados. El consumidor argentino se decanta, sobre todo, por los quesos blandos, que se llevan el 68,5% del volumen. Luego, le siguen los semiduros (22,8%) y los duros (5%; los de mayor precio) (Infotambo, 2015).

Las exportaciones de productos lácteos del país arrojan una notable dependencia de la leche en polvo entera, representando USD 496.027.000, esto es el 44% del total facturado para el 2015 (Figura 1).

Con una marcada diferencia y en orden decreciente, se destacan productos como suero, leche modificada, leche en polvo descremada, caseína, seguidos de los quesos de pasta semidura y dura. Esto muestra que la diversificación de productos no es balanceada, implicando que una baja de las exportaciones de la leche en polvo entera, genera dificultades económicas para el sector, ya que su reemplazo por otros productos es muy difícil por la lejanía de sus valores que presentan frente a la leche en polvo entera.



**Figura 1.** Exportaciones lácteas argentinas por producto (porcentaje en miles de USD y toneladas) 2015.



**Figura 2.** Importaciones lácteas argentinas por producto (porcentaje en miles de USD y toneladas) 2015.

Las importaciones lácteas argentinas en dólares CIF se aglutinan en un conjunto limitado de productos. Los tres más destacados son caseinatos, leche maternizada y queso fundido, alcanzando el 55%. Sin embargo, si se le adicionan la leche condensada, leche en polvo entera y lactosa, la suma de los seis principales derivados de la lechería alcanzan el 82,2% del total importado a valores dólares CIF (Figura 2).

La producción de caseína comestible solo es económicamente factible cuando el suero se utiliza de manera eficiente y económica. Esta ha sido una de las razones principales por las que la caseína comestible no se produce a gran escala y se termina importando [9].

## La leche

La leche es un fluido secretado por la glándula mamaria de todas las especies de mamíferos, principalmente para cumplir con los requerimientos nutricionales completos del neonato. Los principales requerimientos son energía, aminoácidos esenciales, ácidos grasos esenciales, vitaminas, agua y elementos inorgánicos [10].

Además de servir para la nutrición y otros requerimientos del neonato, como la inmunidad en los primeros meses de vida mediada por inmunoglobulinas (IgA) materna que son secretadas a la leche, la leche y los productos lácteos son los principales componentes de la dieta humana en muchas partes del mundo [10].

### 2.1 Composición de la leche

La leche está compuesta principalmente por proteínas, lípidos, lactosa, agua y minerales, y por componentes minoritarios (vitaminas, enzimas y elementos trazas). La leche argentina presenta valores de composición diferentes de los indicados por la bibliografía internacional para la leche de otros países. Este hecho no es sorprendente ya que la composición de la leche es afectada por muchos factores: tipo de alimentación del ganado, agua que beben, clima, y estación del año [10-11].

La leche es un coloide acuoso complejo cuyos componentes se encuentran en tres fases, solución (los minerales así como los glúcidos se encuentran disueltos en el agua), suspensión (las proteínas están en suspensión con el agua) y emulsión (la grasa en agua se presenta en una emulsión). La mayor parte del coloide es una solución de lactosa, sales orgánicas e inorgánicas, vitaminas y otras pequeñas moléculas. En esta solución acuosa hay proteínas dispersas, algunas en forma molecular (proteínas del suero) y otras formando complejos supramoleculares del tamaño de 50 a 600 nm de diámetro (caseínas). Los lípidos forman parte de los glóbulos grasos, cuyo tamaño es de 0.1 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro [10]. En la Figura 3 se muestra un esquema de los componentes de la leche y luego, en los párrafos posteriores, se procede a describirlos individualmente.

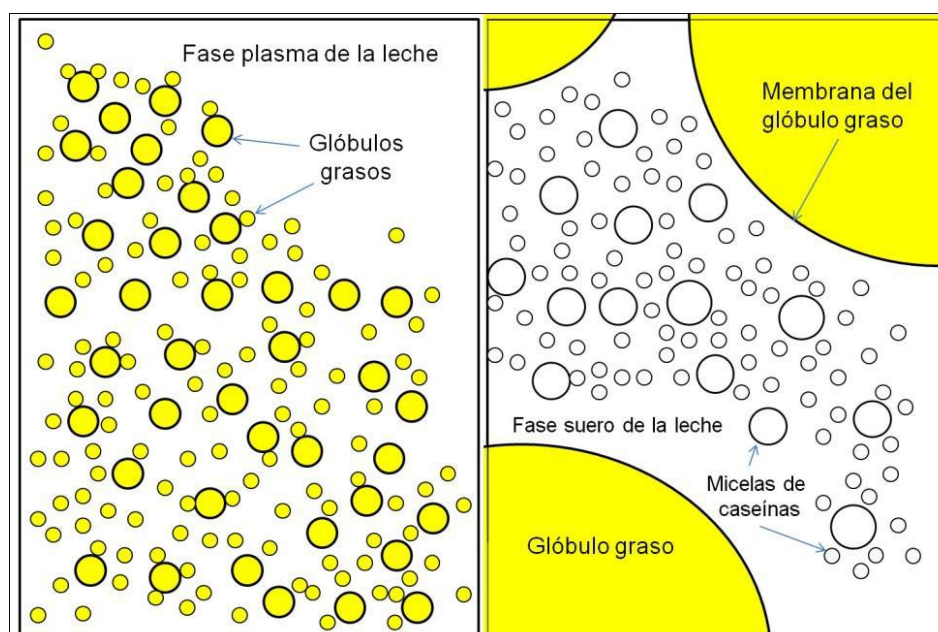


Figura 3. Esquema de la composición y distribución de los componentes de la leche

**Sólidos totales:** Son todos los sólidos de la leche (lípidos, proteínas, lactosa, minerales y vitaminas, y otros compuestos químicos no volátiles) [10].

**Lactosa:** es un disacárido reductor compuesto por glucosa y galactosa, unidas por un enlace glicosídico  $\beta \rightarrow 4$ , que se encuentra exclusivamente en la leche de los mamíferos. Su contenido es muy poco variable. Es sintetizada en la glándula mamaria a partir de la glucosa y galactosa de la sangre por el complejo enzimático lactosa sintetasa que contiene la  $\alpha$ -lactalbúmina, una proteína de la leche [12].

**Lípidos:** se presentan en forma de glóbulos grasos cuyo diámetro promedio varía entre 2,5 y 5  $\mu$ m. Su función es proveer energía al neonato, ácidos grasos esenciales y vitaminas liposolubles (A, D, E, K). La mayor parte de los lípidos son triglicéridos (98%), el resto son fosfolípidos (0,6%), diacilgliceroles y monoacilgliceroles (0,39%), colesterol (0,31%), y ácidos grasos libres (0,03%) [10]. La concentración de materia grasa en leche y su composición están sujetas a importantes variaciones, como se dijo anteriormente, debidas a factores alimenticios, fisiológicos, sanitarios y genéticos [10]. En la Tabla 1 se muestra el perfil de ácidos grasos en leches de la Cuenca Lechera Central Argentina.

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

**Tabla 1.** Perfil de ácidos grasos de la leche producida por la Cuenca Lechera Central de la Argentina [11].

**Proteínas:** Su concentración cambia significativamente durante la lactancia, y principalmente los primeros días posteriores al parto. La principal función de las proteínas de la leche es la de aportar al neonato los aminoácidos esenciales para la producción de sus propias proteínas y el desarrollo de tejidos [10]. En la próxima sección “Proteínas de la leche” se dan más detalles.

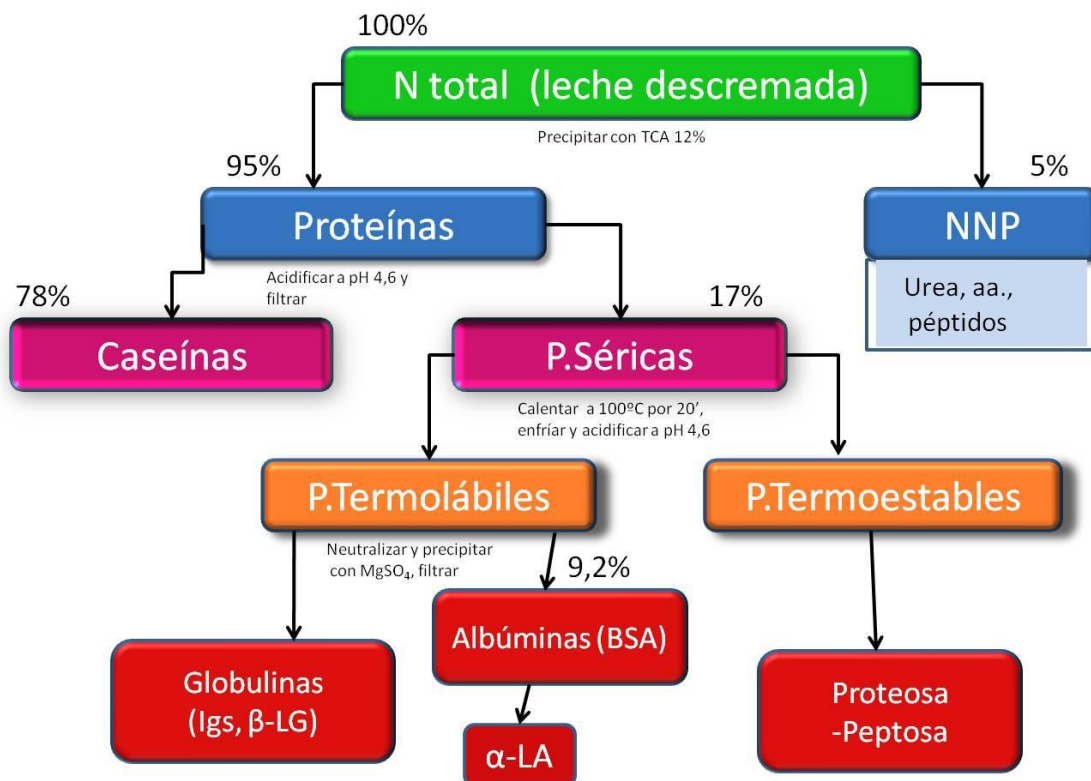
**Sales y minerales:** son principalmente, fosfatos, citratos, cloruros, sulfatos, carbonatos y bicarbonatos de sodio, potasio, calcio y magnesio. Se han encontrado otros elementos en cantidades trazas, como cobre, hierro, silicio, zinc y yodo. Los elementos mayoritarios tienen importancia nutricional, participan en la estructura y estabilidad de proteínas y son cofactores de algunas enzimas de la leche. El 65% del calcio, el 60% del magnesio y el 50% del fósforo se encuentran asociados a las caseínas en forma coloidal. El sodio, el potasio y el cloruro están en solución [10].

## 2.2 Proteínas de la leche

### Clasificación

Los primeros trabajos sobre proteínas de leche datan del 1814. El primer método para separar proteínas por precipitación ácida fue descrito en 1838 por J.G. Mulder, quien utilizó por primera vez el término “proteína” acuñado especialmente por Berzelius. La proteína precipitada por ácido se llamó caseína o caseinógeno y fue tomada universalmente como la proteína que precipita de la leche a pH 4,6. Entre los años 1918 y 1936 se realizaron experimentos basados en la solubilidad en soluciones de etanol, donde se observó que la caseína precipitada por ácido no era una fracción homogénea, sino una mezcla de proteínas lo cual se confirmó por ultracentrifugación analítica y electroforesis. El líquido que quedaba como sobrenadante de la precipitación isoeléctrica de la caseína se lo llamó “suero”, el cual es una solución de proteínas (las “proteínas del suero”, que se encuentran en un 0,7% en la leche bovina), lactosa, sales inorgánicas, vitaminas y componentes en cantidades traza [10].

Las proteínas de la leche se clasifican generalmente utilizando el esquema de fraccionamiento diseñado por Rowland para la partición de las proteínas de leche bovina por métodos de separación fisicoquímicos, Figura 4 [13].



**Figura 4.** Esquema de Rowland de partición de proteínas de leche de vaca [13-14]. Cada una de las fracciones proteicas fue cuantificada por el método de Kjeldahl para nitrógeno proteico.  $\alpha$ -LA:  $\alpha$ -lactolbúmina,  $\beta$ -LG:  $\beta$ -lactoglobulina, BSA: albúmina sérica bovina, Igs: inmunoglobulinas, NNP: fracción de nitrógeno no proteico, y P: proteínas. TCA: ácido tricloroacético



La composición de los componentes nitrogenados de la leche y la cuantificación del nitrógeno se muestra en la Tabla 2 [13-14].

<b>PROTEÍNAS DE LA LECHE DE VACA</b>			
<b>PROTEÍNAS</b>	<b>Concentración (g/L)</b>	<b>Concentración Porcentual</b>	<b>Peso Molecular (kDa)</b>
Proteínas Totales	33,0	100,0	
<b>CASEÍNAS TOTALES</b>	26,0	79,5	
$\alpha_{s1}$ -caseína	10,0	30,6	23,5
$\alpha_{s2}$ -caseína	2,6	8,0	24,0
$\beta$ -caseína	9,3	28,4	24,0
$\kappa$ -caseína	3,3	10,1	19,0
<b>PROTEÍNAS SÉRICAS</b>	6,3	19,3	
$\alpha$ -lactalbúmina ( $\alpha$ -LA)	1,2	3,7	14,0
$\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG)	3,2	9,8	18,3
Albúmina sérica bovina (BSA)	0,4	1,2	69,0
Inmunoglobulinas	0,7	2,1	150,0
Proteosa peptona	0,8	2,4	4-200
Nitrógeno no proteico (NNP)	0,7	6,0	

**Tabla 2.** Proteínas de la leche de vaca y otros componentes con nitrógeno, separados por el método de Rowland y determinados por Kjeldahl.

La concentración total y la composición de las proteínas de la leche varían según la raza, la etapa de lactancia, número de lactancia, temporada, alimentación y la salud de la vaca [10].

Las caseínas de la leche actúan como emulsionantes naturales, lo que les provee de una amplia gama de aplicaciones en el procesamiento de alimentos, incluyendo espumas y emulsiones [15].

Las caseínas forman alrededor de 80% de las proteínas totales de la leche, que comprende cuatro principales proteínas:  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseína.

La estructura molecular y las condiciones de procesamiento influyen las propiedades funcionales de estas proteínas [15]. Las caseínas se encuentran formando complejos macromoleculares llamados “micelas de caseína”. Las caseínas poseen la capacidad para asociarse a los lípidos de la leche [89].

En la Tabla 3 se resumen las características de las proteínas más importantes de la leche, las caseínas ( $\beta$ ,  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ) y las proteínas del suero ( $\beta$ -LG).

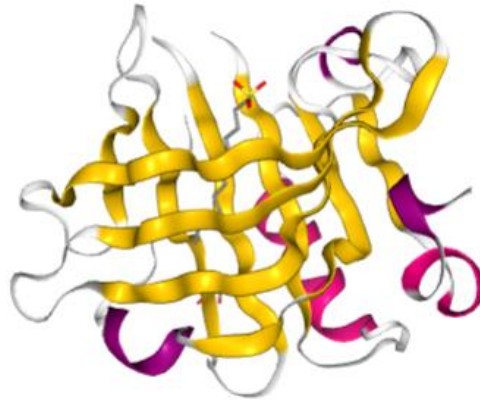
<b>Proteínas</b>	<b>Caseínas</b>			<b>Lactosuero</b>
	<b><math>\beta</math>-CN</b>	<b><math>\alpha_{s1}</math>-CN</b>	<b><math>\alpha_{s2}</math>-CN</b>	<b><math>\beta</math>-LG</b>
<b>Estructura</b>	reomórfica	reomórfica	reomórfica	globular
<b>Peso Molecular (kDa)</b>	23.98	23.61	25.23	18.36
<b>Tyr</b>	4	10	12	4
<b>Trp</b>	1	2	2	2

**Tabla 3.** Propiedades de las proteínas lácteas que se encuentran en mayor proporción.

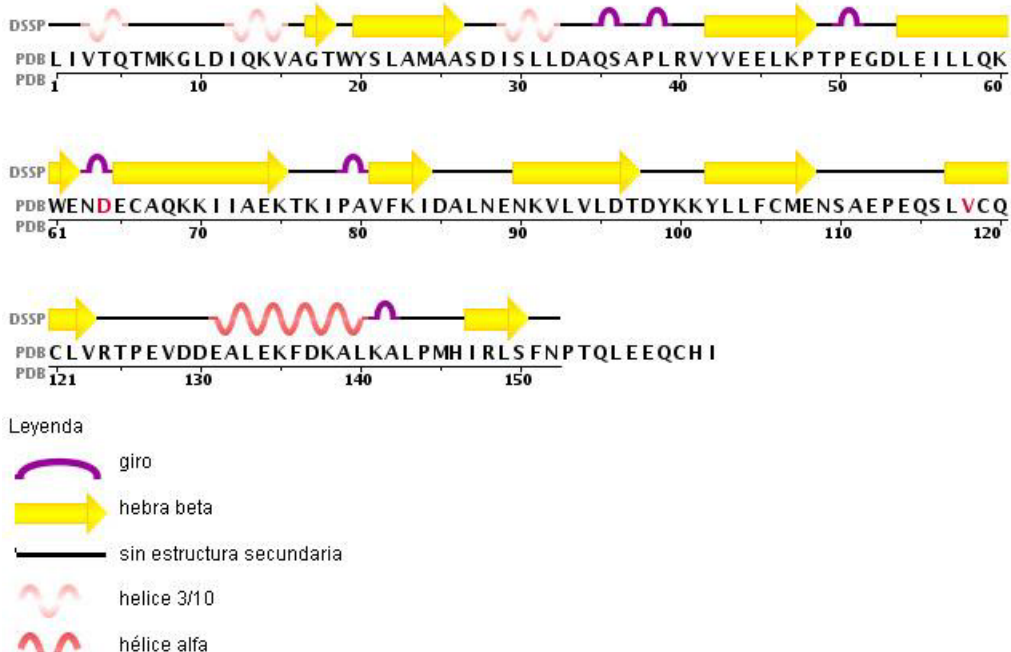
### 2.2.1 Estructura y características funcionales de $\beta$ -Lactoglobulina

**$\beta$ -Lactoglobulina** sufre algunos cambios de conformación entre pH 2 y pH 9, el más importante es la transición de Tanford N $\leftrightarrow$ R, que ocurre en el rango de pH fisiológico

[90]. La  $\beta$ -lactoglobulina bovina se encuentra como dímero bajo condiciones fisiológicas [16]. La secuencia de aminoácidos de la  $\beta$ -lactoglobulina muestra homología con las proteínas del suero de unión a retinol [17], y también es miembro de la familia de lipocaína ya que posee similitud en su estructura terciaria [18]. Se caracteriza por tener una cavidad central hidrofóbica y un sitio de unión para moléculas pequeñas, por lo que se cree que su función sería la de transporte [10]. En la Figura 5 y 6 se puede observar un modelo tridimensional de la estructura terciaria de  $\beta$ -lactoglobulina, y la estructura primaria (secuencia de aminoácidos) y la estructura secundaria, respectivamente.



**Figura 5.** Modelo estructural de  $\beta$ -lactoglobulina. Programa Jmol. Protein Data Bank (UniProtKB P02754)



**Figura 6.** Estructura primaria de  $\beta$ -lactoglobulina B (nativa). Figura tomada del Protein Data Bank (UniProtKB P02754).

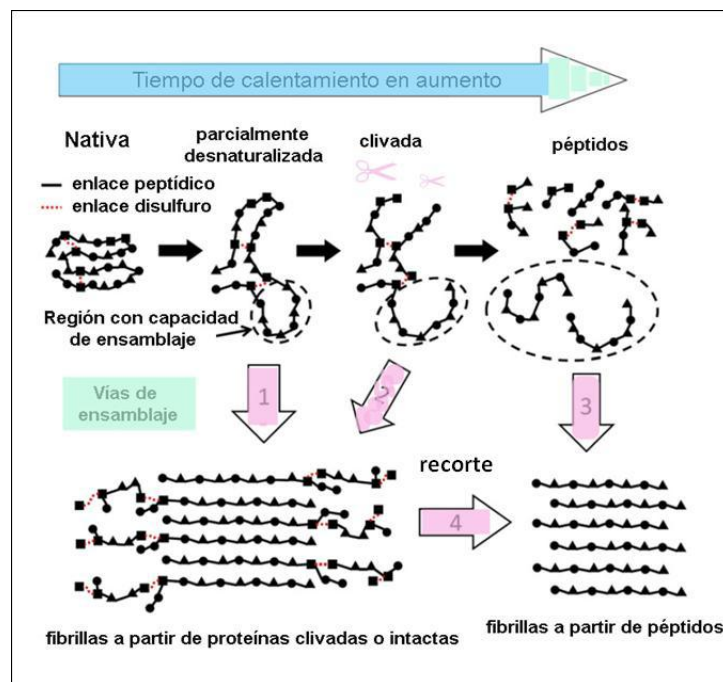
$\beta$ -Lactoglobulina posee dos variantes genéticas más comunes: A y B. La variante B difiere en dos aminoácidos respecto de A. En la posición 64 posee ácido aspártico en

lugar de glicina y en la 118 valina en lugar de alanina. La estructura del monómero consiste en nueve hebras antiparalelas de hojas  $\beta$ , ocho de ellas se colocan formando un barril cónico plano, o un cáliz, cerrado en un extremo, entre otras cosas por un Trp posición 19 en la cadena primaria. Posee una alfa hélice y dos hélices 3/10 [16].

**Desnaturalización de la  $\beta$ - lactoglobulina:** La  $\beta$ -LG bovina se desnaturaliza a través de una disociación inicial del dímero seguida de un cambio en la conformación de la cadena polipeptídica, y de agregación [16].

**Función:** Se desconoce la función de la  $\beta$ - lactoglobulina. Se sabe que su composición de aminoácidos le provee resistencia a la digestión por pepsina y ácido, y que es capaz de unir retinol y vitamina D2 [16].

**Formación de fibrillas de amiloide:**  $\beta$ -LG bovina es capaz de autoensamblarse en estructuras no aleatorias. Cuando el largo es mucho mayor al ancho, las estructuras autoensambladas se denominan “fibrillas”. Cuando las fibrillas están compuestas por estructuras hojas  $\beta$  que están dispuestas de forma perpendicular respecto del eje de la fibrilla, se las llama amiloide, o tipo amiloide [19].  $\beta$ - lactoglobulina tiene la capacidad de formar fibrillas de amiloide cuando es calentada a bajo pH y baja fuerza iónica, por lo cual, los geles de  $\beta$ - lactoglobulina fabricados a pH menores a pH 4 poseen una micro estructura de finas hebras [19]. Las nano fibrillas de proteínas lácteas son de interés para la industria alimenticia por su potencial para aumentar la viscosidad y formar geles a más bajas concentraciones de proteínas que con agregados al azar [20]. También pueden tener aplicaciones en biomedicina y ciencias de los materiales. Evidencia reciente mostró que las fibrillas inducidas por calentamiento de  $\beta$ -lactoglobulina están compuestas por péptidos en vez de monómeros intactos (Figura 7) [21].



**Figura 7.** Mecanismo simplificado de autoensamblaje de  $\beta$ -lactoglobulina.

## 2.2.2 Estructura y características de $\beta$ -caseína

### Estructura de $\beta$ -caseína

La secuencia primaria de  $\beta$ -caseína se puede ver en la Figura 8, con sus distintas variantes genéticas. De todas las caseínas,  $\beta$ -caseína es la más hidrofóbica. El dominio N-terminal contiene un grupo de fosfoserinas aniónicas y es muy distinto del dominio C-terminal muy hidrofóbico.

1	10	20
Arg- Glu- Leu- Glu- Glu- Leu-Asn- Val- Pro- Gly- Glu- Ile- Val- Glu- SerP- Leu- SerP-SerP-SerP- Glu-		
21	30	40
Glu- Ser- Ile- Thr- Arg- Ile- Asn- Lys- Lys- Ile- Glu- Lys- Phe- Gln- SerP- Glu- Glu- Gln- Gln- Gln-		
41	50	60
Thr- Glu-Asp- Glu- Leu- Gln- Asp- Lys- Ile- His- Pro- Phe- Ala- Gln- Thr- Gln- Ser- Leu- Val- Tyr-		
61	70	80
Pro- Phe- Pro- Gly- Pro- Ile- Pro- Asn- Ser- Leu- Pro- Gln- Asn- Ile- Pro- Pro- Leu- Thr- Gln- Thr-		
81	90	100
Pro- Val- Val- Val- Pro- Pro- Phe- Leu- Gln- Pro- Glu- Val- Met- Gly- Val- Ser- Lys- Val- Lys- Glu-		
101	110	120
Ala- Met- Ala- Pro-Lys- His- Lys- Glu- Met- Pro- Phe- Pro- Lys- Tyr- Pro- Val- Glu- Pro- Phe- Thr-		
121	130	140
Glu- Ser- Gln- Ser-Leu- Thr- Leu- Thr- Asp- Val- Glu- Asn- Leu- His- Leu- Pro- Leu- Pro- Leu- Leu-		
141	150	160
Gln- Ser- Trp-Met- His- Gln- Pro- His- Gln- Pro- Leu- Pro- Pro- Thr- Val- Met- Phe- Pro- Pro- Gln-		
161	170	180
Ser- Val- Leu- Ser-Leu- Ser- Gln- Ser- Lys- Val- Leu- Pro- Val- Pro- Gln- Lys- Ala- Val- Pro- Tyr-		
181	190	200
Pro- Gln- Arg- Asp- Met- Pro- Ile- Gln- Ala- Phe- Leu- Leu- Tyr- Gln- Glu- Pro- Val- Leu- Gly- Pro-		
201		
Val- Arg- Gly- Pro- Phe- Pro- Ile- Ile- Val		

Figura 8. Estructura primaria de  $\beta$ -caseína

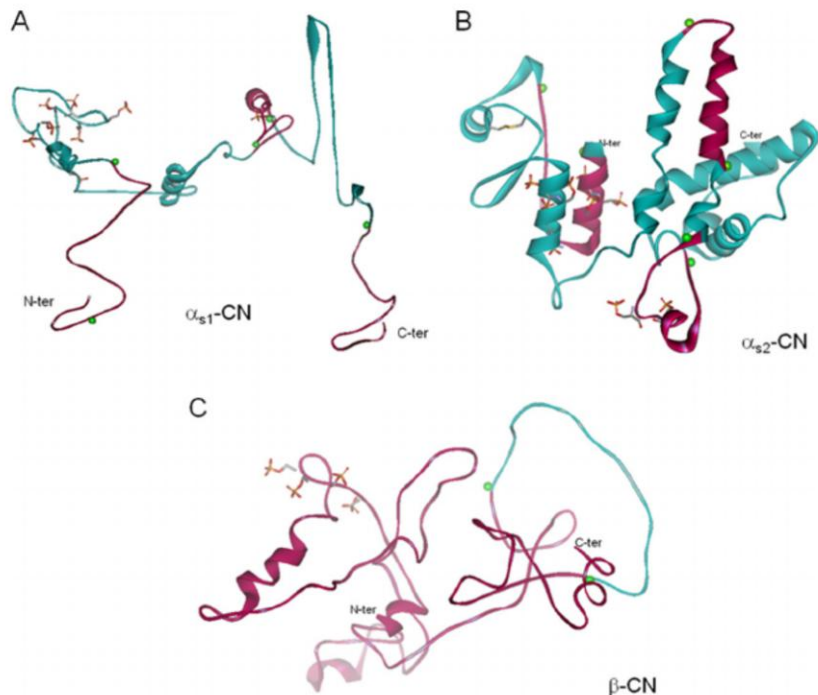


Figura 9. Modelo estructural de  $\alpha_1$ (A),  $\alpha_2$  (B) y  $\beta$  -caseína (C). [23]

Es una molécula muy anfifílica con una región polar conteniendo en un décimo de la cadena peptídica, un tercio de la carga total. Esta proteína es rica en prolina, por lo que posee una estructura terciaria abierta desestructurada (Figura 9).  $\beta$ -CN es una proteína flexible poco estructurada a las que se las ha denominado reomórficas [22].

### **Funcionalidad de la $\beta$ -caseína**

$\beta$ -caseína forma alrededor del 30% de las caseínas y es una de las más solubles y más activa en superficie [15], por su naturaleza anfifílica puede formar agregados de tipo surfactantes o submicelas [15]. El equilibrio entre la  $\beta$ -caseína libre o molecular y su forma micelar está fuertemente influenciada por la concentración de  $\beta$ -caseína, la temperatura y el calcio contenido [15]. A bajas concentraciones de  $\beta$ -caseína, las repulsiones son predominantes, de manera que los monómeros se dispersan en la solución. Sin embargo, a la concentración micelar crítica (CMC),  $\beta$ -caseína interacciona a través de interacciones hidrofóbicas y forma micelas de  $\beta$ -caseína con un núcleo hidrofóbico y una capa externa hidrofílica menos densa. El número de micelas y sus tamaños depende de la temperatura, debido a las interacciones hidrofóbicas aumentan al incrementarse la temperatura. Por lo tanto, a bajas temperaturas  $\beta$ -caseína está en un estado molecular. La estabilidad de una solución micelar es la consecuencia de la repulsión electrostática entre micelas debido a su capa externa hidrofílica. La adición de calcio induce la agregación de micelas a través de la asociación con fosfo-serinas localizadas en la parte hidrofílica de la caseína [15].

### **2.2.3 Estructura y características de $\alpha$ -caseína**

#### **Caseína $\alpha_{s1}$**

La caseína  $\alpha_{s1}$  es la mayoritaria en la leche de vaca. La variante más común tiene 199 aminoácidos en su secuencia, con 8 ó 9 grupos fosfato (Figura 10). Desde el punto de vista estructural, está formada por tres regiones hidrofóbicas, con dos de ellas situadas en los extremos (aminoácidos 1-41, 90-113 y 132-199), y una zona muy polar (entre los aminoácidos 42 y 80), en la que se encuentran todos los grupos fosfato menos uno, lo que le da una carga neta negativa muy importante al pH de la leche (alrededor de 6,6). La caseína  $\alpha_{s1}$  de vaca contiene 17 restos de prolina (Pro), distribuidos a lo largo de toda la cadena, lo que hace que tenga muy pocas zonas con estructura secundaria organizada (Figura 8). La asociación con otras moléculas de caseína se produce a través de interacciones hidrofóbicas en las que está implicada fundamentalmente la zona situada entre los aminoácidos 136 y 196 [10].

#### **Caseína $\alpha_{s2}$**

Esta caseína está formada, en la leche vacuna, por 207 aminoácidos. Se conocen varias variantes genéticas, y también varias variantes en el grado de fosforilación (Figura 11). La máxima fosforilación afecta a 12 serinas y una treonina. Esta caseína tiene un puente disulfuro entre las cisteínas que ocupan las posiciones 36 y 40 de la secuencia, y es más hidrofílica que la caseína  $\alpha_{s1}$ , con tres regiones de carga neta negativa, una de ellas en el extremo N-terminal (Figura 11). En la zona del extremo C-terminal se sitúan aminoácidos hidrofóbicos y con carga neta positiva [10].

1 Glu-Val-Leu-Asn-Glu-Asn-Leu-  
 H. Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln- .....  
 21  
 Leu-Arg-Phe-Phe-Val-Ala-(Variants B,C,D,E)  
 -Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys-Glu-Lys-Val-Asn-Glu-Leu  
 ..... (Variant A)

41 Ala (Variants A,B,C,E) Gln (variants A,B,  
 Ser-Lys-Asp-Ile-Gly-*SerP*-Glu-*SerP*-Thr-Glu-Asp-Gln- -Met-Glu-Asp-Ile-Lys- -Met  
*Thrp* (Variant D) *Glu* (Variant E)

61  
 Glu-Ala-Glu-*SerP*-Ile-*SerP*-*SerP*-*SerP*-Glu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-*SerP*- Val-Glu-Gln-Lys-His-

81  
 Ile-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg-

101  
 Leu-Lys-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-*SerP*-Ala-Glu-Glu-Arg-Leu-

121  
 His-Ser-Met-Lys-Glu-Gly-Ile-His-Ala-Gln-Gln-Lys-Glu-Pro-Met-Ile-Gly-Val-Asn-Gln-

161  
 Ser-Gly-Ala-Trp-Tyr-Tyr-Val-Pro-Leu-Gly-Thr-Gln-Tyr-Thr-Asp-Ala-Pro-Ser-Phe-Ser-

181 Glu (Variant A,B,D) 199  
 Asp-Ile-Pro-Asn-Pro-Ile-Gly-Ser-Glu-Asn-Ser- -Lys-Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp. OH  
 Gly (Variant C,E)

**Figura 10.** Estructura primaria de  $\alpha_1$ -caseína. Se muestra la sustitución de aminoácidos en la principal variante genética [88].

1  
 H. Lys-Asn-Thr-Met-Glu-His-Val-*SerP*-*SerP*-*SerP*-Glu-Glu-Ser-Ile-Ile-*SerP*-Gln-Glu-Thr-Tyr-

21  
 Lys-Gln-Glu-Lys-Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro-Ser-Lys-Glu-Asn-Leu-Cys-Ser-Thr-Phe-Cys-

41  
 Lys-Glu-Val-Val-Arg-Asn-Ala-Asn-Glu-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ile-Gly-*SerP*-*SerP*-*SerP*-Glu-Glu-

61  
*SerP*-Ala-Glu-Val-Ala-Thr-Glu-Glu-Val-Lys-Ile-Thr-Val-Asp-Asp-Lys-His-Tyr-Gln-Lys-

81  
 Ala-Leu-Asn-Glu-Ile-Asn-Gln-Phe-Tyr-Gln-Lys-Phe-Pro-Gln-Tyr-Leu-Gln-Tyr-Leu-Tyr-

101  
 Gln-Gly-Pro-Ile-Val-Leu-Asn-Pro-Trp-Asp-Gln-Val-Lys-Arg-Asn-Ala-Val-Pro-Ile-Thr-

121  
 Pro-Thr-Leu-Asn-Arg-Glu-Gln-Leu-*SerP*-Thr-*SerP*-Glu-Glu-Asn-Ser-Lys-Lys-Thr-Val-Asp-

141  
 Met-Glu-*SerP*-Thr-Glu-Val-Phe-Thr-Lys-Lys-Thr-Lys-Leu-Thr-Glu-Glu-Glu-Lys-Asn-Arg-

181  
 Lys-Thr-Val-Tyr-Gln-His-Gln-Lys-Ala-Met-Lys-Pro-Trp-Ile-Gln-Pro-Lys-Thr-Lys-Val-  
 (Leu)

201 207  
 Ile-Pro-Tyr-Val-Arg-Tyr-leu. OH

**Figura 11.** Estructura primaria de  $\alpha_2$ -caseína. Se muestra nueve sitios fosforilados de 10-13 [88].

## Procesamiento tecnológico de la leche y de sus principales componentes

### 3.1 Caseína

#### Coagulación enzimática

La propiedad más importante de las micelas de caseína a nivel industrial es su capacidad de coagular por acción de enzimas o acidificación, lo cual permite separarlas de las proteínas del suero. La coagulación de las caseínas es una de las formas de evaluar la funcionalidad de las proteínas de la leche, ésta se realiza mediante la determinación del rendimiento del coágulo húmedo y seco [24]. En el proceso de fabricación de quesos, la coagulación de las caseínas de la leche es la primera etapa del proceso. En esta etapa se utilizan diversas enzimas de origen animal (renina, que contiene quimosina y pepsina), recombinante (quimosina pura) o de origen vegetal, que al ser agregadas a la leche, corta en una secuencia específica de las  $\kappa$ -caseínas sobre los residuos Phe y Met (105 y 106), liberando la región hidrofílica rica en glúcidos de la  $\kappa$ -caseína (glicomacropéptido), y dejando la parte hidrofóbica (para- $\kappa$ -caseína). Esto produce la desestabilización de las micelas y su agregación, comenzando el proceso de coagulación [25]. Las micelas de para- $\kappa$ -caseína son inestables frente a las concentraciones de calcio iónico normalmente presentes en la leche (1,5- 2 mM) [25].



Para que la actividad de quimosina sea óptima, es preciso que haya suficiente concentración de iones calcio en el medio y condiciones adecuadas de pH, temperatura y concentración de la enzima. La quimosina tiene una temperatura óptima comprendida entre 40-42°C. A temperaturas superiores o inferiores, el tiempo de coagulación aumenta. A temperaturas de refrigeración, la hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína tiene lugar, pero para que ocurra la coagulación se requieren temperaturas superiores a 20 °C. El pH óptimo de la quimosina se encuentra en valores en los que la leche se coagula por acidez (pH 4,7) por alcanzar el punto isoeléctrico. Sin embargo, en medio alcalino la enzima llega a inactivarse, primero de forma reversible (pH 7,3) y luego de forma irreversible (pH 8) [10, 25].

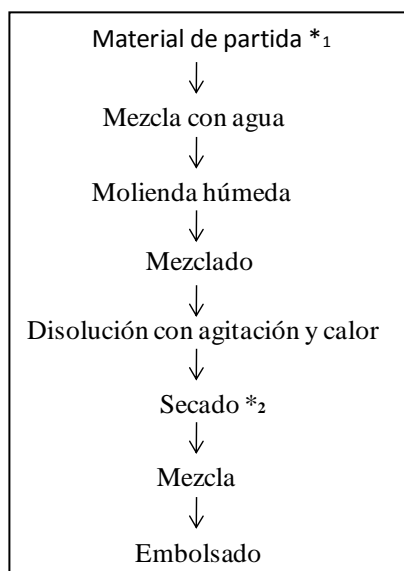
#### Procesamiento

La caseína es la proteína dominante en la leche de vaca, constituyendo el 80% del contenido total proteico. Durante la elaboración de quesos precipita por acción del cuajo o de ácidos. La lactosa y las sales minerales quedan atrapadas en el coágulo formado. La caseína se obtiene a partir de la leche desnatada. Es necesario eliminar hasta donde sea posible la grasa, sales y lactosa de la leche, durante el proceso de elaboración, ya que dichas sustancias reducen la calidad de la caseína y sus posibilidades de conservación. La caseína se conserva relativamente bien y se utiliza en la fabricación de otros alimentos y de productos químicos [26].

#### Método de fabricación de caseinatos

El caseinato se prepara a partir de cuajada de caseína ácida recién precipitada o de caseína ácida seca por reacción con soluciones alcalinas diluidas (Figura 12). El

caseinato de sodio es la forma de caseína más comúnmente utilizada, y se utiliza en una amplia gama de productos alimenticios procesados como fuente de proteínas, y por sus propiedades fisicoquímicas, nutricionales y funcionales. Junto al caseinato de sodio, el caseinato de calcio es común y encuentra su uso tanto en preparaciones farmacéuticas como ingrediente alimentario. Funciona como proveedor de calcio y proteína. Las especificaciones de este producto varían con su uso final, pero con frecuencia incluyen una limitación del contenido de calcio en el rango de 1,0-1,5% [27].



**Figura 12.** Método convencional para la fabricación de caseinatos. \*1: cuajada de caseína fresca, ácida o caseína seca. \*2: de forma manual en spray o con rodillos.

### Proceso de fabricación

Se prefiere como materia prima la cuajada de caseína ácida fresca a la caseína seca porque la primera produce caseinatos con un sabor más suave que la última. La caseína debe tener un bajo contenido de calcio (0,15% base seca) para producir una solución de caseinato con baja viscosidad y bajo contenido de lactosa (0,2% en base seca), con el objetivo de obtener un caseinato de sodio con el mejor color, sabor y valor nutricional. El control de las características de la cuajada también es importante para asegurar una disolución rápida.

### Caseinato de sodio

La fabricación de caseinato de sodio consiste en la formación de una suspensión de caseína, en su solubilización usando hidróxido de sodio y por último en el secado del caseinato producido.

- **Suspensión de caseína y solubilización:** Las principales dificultades experimentadas en la conversión de caseína ácida en caseinato de sodio son las siguientes:
  - \* muy alta viscosidad de la solución de caseinato de sodio limita el contenido de sólidos para el secado por pulverización al 20%.



\*formación de un revestimiento viscoso, similar a la gelatina, relativamente impermeable en la superficie de las micelas de caseína impide su disolución al añadir el álcali.

Para superar la dificultad anterior, es esencial que el pH y la temperatura se controlen durante la conversión, ya que estos influyen en la viscosidad. El último desafío se puede superar reduciendo el tamaño de partícula pasando la caseína y la mezcla de agua a través de un molino coloidal antes de la adición del álcali.

Después del lavado final con caseína, la cuajada se deshidrata a aproximadamente 45% de sólidos y luego se mezcla con agua (hasta 25-30% de sólidos) antes de entrar al molino coloidal. La temperatura de la lechada emergente, que tiene una consistencia pastosa, debe estar por debajo de 45°C, porque se ha observado que la cuajada molida se puede reaglomerar a temperaturas más altas.

- **Adición de álcali y control de pH:** El álcali comúnmente utilizado en la producción de caseinato de sodio es el hidróxido de sodio en forma de solución 2,5 M. La cantidad de álcali requerida es generalmente de 1,7-2,2% en peso de los sólidos de caseína. Se pueden usar otros álcalis tales como bicarbonato de sodio o fosfatos de sodio, pero las cantidades requeridas y sus costos son ambos mayores que los del hidróxido de sodio. Por lo tanto, se usan solo para fines específicos, como la fabricación de caseinato citrado. La adición del álcali diluido, preferiblemente mediante dosificación en la línea de recirculación justo antes de la bomba, debe controlarse cuidadosamente con el objetivo de alcanzar un pH final de caseinato de 6,6-7,0.
- **Disolución:** La viscosidad de las soluciones de caseinato de sodio se puede expresar como una función logarítmica de la concentración total de sólidos. Cada cubeta de disolución, por lo tanto, debe estar equipada con un potente agitador y una bomba de recirculación de alta velocidad. Además de la concentración, la temperatura y el pH, el contenido de calcio de la cuajada, el tipo de álcali utilizado y los factores estacionales y genéticos también afectan la viscosidad del producto. Una vez que se ha agregado el álcali a la caseína, es importante elevar la temperatura lo más rápido posible a 60-70 ° C, para reducir la viscosidad. Durante la operación de disolución, la incorporación de aire debe mantenerse al mínimo, porque las soluciones de caseinato forman espumas muy estables.
- **Secado:** La solución homogénea de caseinato de sodio generalmente se deshidrata en una corriente de aire caliente. Para asegurar una atomización eficiente de la solución de caseinato de sodio, la solución debe tener una viscosidad constante a medida que se alimenta al secador. Es una práctica común minimizar la viscosidad precalentando la solución a una temperatura de 90-95 °C justo antes del secado por pulverización. Se debe tener cuidado para minimizar el tiempo donde la solución de caseinato se encuentra a alta temperatura.

### 3.2 Lactosuero

El lactosuero es un co-producto del queso y de la caseína en la industria láctea. Éste es obtenido luego de la separación de la cuajada (caseína) para la posterior formación de queso. Representa el 80-90% del volumen total de la leche que entra en el

proceso y contiene un 50% de los sólidos de la leche, esencialmente el 100% de la lactosa y el 20% de las proteínas. El suero, como subproducto de la elaboración de quesos blandos, duros o semiduros y de la producción de la caseína al cuajo, es conocido como suero dulce y tiene un pH de 5,9-6,3. La fabricación de caseína precipitada por ácidos minerales da lugar a un suero ácido con un pH de 4,3-4,6. En la Tabla 4 se observa la composición de los dos tipos de suero que se obtienen de la industria láctea [28] [29].

Constituyentes	Suero de quesería	Suero de caseína
Sólidos totales	6,3	6,5
Agua	93,7	93,5
Grasa	0,5	0,04
Proteínas	0,8	0,75
Lactosa	4,8	4,9
Sales minerales	0,5	0,8
Acido láctico	0,05	0,4

Tabla 4. Composición aproximada del suero en porcentaje

Independientemente del tratamiento posterior, la primera etapa que se efectúa en el procesamiento del suero es la separación de la grasa y de los finos de caseína. Ello se hace en parte para aumentar el rendimiento económico y también porque éstos interfieren con los tratamientos posteriores. Los procesos que más predominan obtienen como resultado, suero en polvo, suero en polvo desmineralizado, lactosa y suero en polvo deslactosado, que representa el 90% del volumen de suero que es sometido a tratamiento industrial, en la Figura 13 se pueden ver los diferentes tratamientos por los cuales transita el lactosuero.

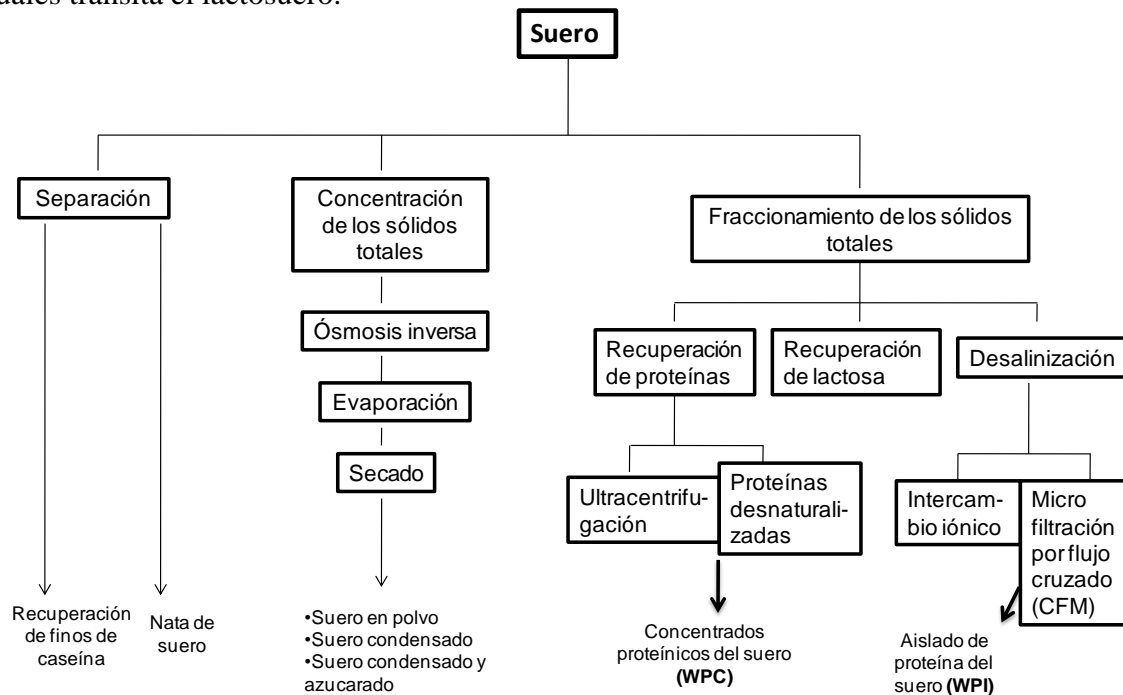


Figura 13. Tratamientos que sufre el lactosuero en la industria alimentaria [28].

## **Procesamiento**

El suero debe ser procesado tan pronto como sea posible después de su recogida, ya que por su temperatura y composición se puede producir el crecimiento de bacterias

### **Recuperación de finos de caseína y separación de la grasa**

En el suero siempre se encuentran presentes finas partículas de caseína. Estas tienen un efecto adverso en el proceso de separación de la grasa, por eso deben ser separadas en primer lugar. Para ello, se utilizan diversos tipos de filtros, ciclones y separadoras centrífugas. Esta última también se utiliza para la recuperación de la grasa.

### **Enfriamiento y pasteurización**

El suero que va a ser almacenado antes de su tratamiento debe ser enfriado o pasteurizado tan pronto como sea separado de la grasa contenida en el mismo. Cuando el almacenamiento va a ser corto (10-15 horas), el enfriamiento es suficiente para reducir la actividad bacteriana. Si va a estar almacenado por períodos de tiempos más largos es necesario proceder a su pasteurización.

### **Concentración**

La concentración del suero se realiza bajo vacío en un evaporador de capa descendente con dos o más efectos. En muchas industrias se utiliza la ósmosis inversa para efectuar una concentración previa antes de que el suero pase al evaporador donde alcanza la concentración final. Después de alcanzar un contenido de sólidos entre 45-65%, el concentrado se enfría rápidamente hasta unos 30 ° C en un aparato de placas, y se pasa a un depósito encamisado para su enfriamiento a 15-20 ° C durante el proceso de agitación. Dicha agitación continúa durante 6-8 horas con objeto de obtener cristales de las menores dimensiones posibles.

### **Secado**

El suero se seca de la misma forma que se realiza con la leche, es decir, en secadores de tambor o atomizadores (el más utilizado en la actualidad). Antes de ser secado, el concentrado de suero se suele someter a un tratamiento térmico con el fin de formar pequeños cristales de lactosa, lo que hace que se obtenga un producto no higroscópico, que no tiene tendencia a formar grumos ni tampoco tiene tendencia a la absorción de humedad.

### **Desmineralización**

Si se reduce su contenido en sustancias minerales, el suero es un excelente alimento para consumo humano. Las proteínas del suero, que constituyen alrededor del 13% de los sólidos secos del mismo, tienen un considerable valor nutricional que, junto con el valor energético y dietético de la lactosa, así como de la vitamina B, hacen del suero un producto atractivo. En la desmineralización se procede a la extracción de cloruro de sodio y de nitratos. Esto se puede hacer de dos formas: por electrodiálisis y por intercambio iónico.

### **Microfiltración por Flujo Cruzado (CFM)**

El método de procesamiento emplea una técnica a baja temperatura de microfiltrado del suero de leche para obtener un alto contenido de proteínas como resultado, siendo

superior al 90%. Asimismo, se mantienen intactas la integridad de las fracciones proteicas, además de vitaminas y minerales; se consiguen niveles extremadamente bajos de grasa y lactosa, y una proteína no desnaturalizada (mantienen la estructura molecular primaria). A diferencia de otros métodos que emplean agentes químicos, como el Intercambio de Iones, la técnica CFM utilizan filtros cerámicos de óptimo resultado, desechando los elementos no deseados, y permitiendo conseguir el más alto nivel de pureza proteica.

### **Recuperación de las proteínas del suero**

Se pueden utilizar varios métodos para concentrar las proteínas del suero. Según el método utilizado las proteínas se obtendrán de forma desnaturalizada o no.

#### ***-Recuperación de proteínas por medio de ultrafiltración (UF)***

La ultrafiltración puede emplearse para dividir el suero en una fracción rica en proteínas y otro pobre de éstas, conocidas como concentrado y permeado, respectivamente. La separación tiene lugar bajo presión, a través de una delgada membrana que permite pasar a los más pequeños constituyentes del suero (sales minerales, lactosa), mientras que las partículas más grandes (proteínas) son retenidas. Aproximadamente el 95% del suero se recoge como permeado, y el producto concentrado se puede secar hasta contenidos proteínicos de un 70% (calculado sobre el contenido de materia seca).

#### ***-Recuperación de las proteínas desnaturalizadas del suero***

De forma general, podemos decir que las proteínas del suero no pueden ser precipitadas por la enzima del cuajo o por ácidos. Sin embargo, es posible precipitar dichas proteínas con ácidos, si en primer lugar son desnaturalizadas por calor. El proceso se divide en dos etapas:

- Precipitación (desnaturalización) de las proteínas por medio de una combinación de tratamiento térmico y ajuste del pH.
- Concentración de las proteínas por separación

Las proteínas desnaturalizadas del suero pueden mezclarse con leches destinadas a la elaboración de quesos, antes de la aplicación del cuajo, siendo entonces retenidas en la estructura formada por las moléculas de caseína durante la coagulación. La estructura del coagulo se hace más fina y más uniforme que en los métodos convencionales. Las proteínas del suero procesadas son más hidrófilas que la caseína.

### **Tratamientos para reducir la carga microbiana en alimentos**

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

se calienta a 121 °C por varios minutos [30]. Los tratamientos térmicos utilizados para reducir la carga microbiana producen una disminución en la calidad de sus componentes, modificando las características, tanto sensoriales (textura, sabor y color), como nutricionales (pérdidas de vitaminas, principalmente) del alimento [31-32]. La demanda creciente de alimentos sin procesamientos severos ni aditivos sintetizados químicamente ha incentivado la búsqueda de tecnologías alternativas al tratamiento térmico para la conservación y reducción de la carga microbiana en alimentos. Los distintos métodos de conservación de alimentos procuran incrementar la vida útil de los productos durante su almacenamiento, aplicando técnicas que impidan alteraciones microbiológicas y mantengan la calidad del producto. Se encuentran en desarrollo procesos no térmicos de conservación, entre ellos el tratamiento por luz UV y por alta presión [33-34].

El tratamiento UV se emplea para desinfectar aire, agua y superficies de materiales con posible contaminación biológica (virus, bacterias, esporas, mohos, levaduras) [35]. La radiación UV se utiliza en diferentes sectores de la industria de alimentos, debido al efecto nocivo que causa sobre el ADN de muchos microorganismos. La radiación UV se utiliza generalmente para la desinfección de aguas, y para desinfectar y aumentar la vida útil de jugos de frutas y verduras, y se ha probado como método alternativo a la pasteurización de la leche por calor [36-37]. Sin embargo, aún es necesario probar las condiciones óptimas de flujo y tiempo de exposición para lograr una pasteurización por UV adecuada sin producir alteraciones sensoriales de la leche [37]. El uso de la tecnología UV con fines de desinfección involucra a la región ultravioleta del espectro electromagnético, con un rango de longitud de onda entre 100 y 400 nm. Éste puede subdividirse en: a) UV de onda corta UV-C entre 200 y 280 nm (rango germicida), b) UV de onda media UV-B entre 280 y 315 nm, y c) UV de onda larga UV-A entre 315 y 400 nm. La máxima eficiencia para la desinfección se sitúa en 254 nm [35]. La radiación UV produce cambios fotoquímicos, cuyos efectos pueden variar según la especie de microorganismo que se trate. El mecanismo de acción letal depende de su absorción por el ADN, pudiendo detener el crecimiento celular y provocar la muerte. La radiación absorbida por el ADN produce cambios químicos en los nucleótidos timina y citosina. Esto produce distorsiones en la conformación del ADN interfiriendo en el apareamiento normal de las bases, produciendo como resultado el bloqueo de la síntesis del ADN y consecuentemente quedando afectadas las funciones celulares pudiendo provocar la muerte [35]. Los efectos en los enlaces cruzados son proporcionales al tiempo de exposición e intensidad de la luz UV [35, 37-38].

El tratamiento UV es elegido en la industria por la creencia de que se trata de un proceso que no altera las propiedades organolépticas de los productos y reduce el uso de sustancias químicas. Esto, no necesariamente es cierto, ya que se ha observado que la irradiación UV, así como por la luz fluorescente producen cambios químicos de los componentes de los alimentos irradiados, produciendo aromas y sabores desagradables [39-40]. El uso de la irradiación ultravioleta para aumentar la vida útil post elaboración, conlleva a un aumento de la oxidación lipídica [41] y a modificaciones proteicas.

### **Almacenaje de la leche en góndolas iluminadas con luz fluorescente**

La leche es comercializada en contenedores claros, translúcidos y opacos que son exhibidos en refrigeradores iluminados con luz fluorescente y que permiten el paso de la luz favoreciendo la oxidación lipídica [42]. La exposición lumínica de la leche causa la

aparición de lípidos y proteínas peroxidadas y disminuye la concentración de vitaminas y aminoácidos esenciales [43]. La oxidación de la leche por luz puede producir una disminución en su calidad nutricional y la generación de aromas y sabores desagradables que la hagan inaceptable para los consumidores [44-45].

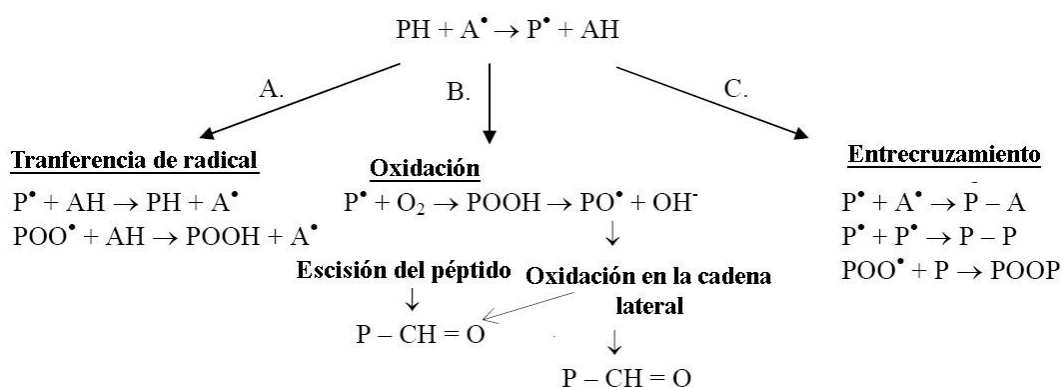
## Oxidación de proteínas

Frecuentemente, los aromas desagradables de la leche han sido atribuidos a la oxidación de lípidos [46-47] o a reacciones de Maillard con los consecuentes productos de glicosilación avanzada [48]. Se encuentra abundante literatura sobre la oxidación de los lípidos y azúcares y sus efectos biológicos [49-50]. Sin embargo, las proteínas, péptidos y aminoácidos también son susceptibles a cambios oxidativos [51]. Las características de la oxidación proteica pueden variar de acuerdo al oxidante utilizado y al tipo de leche expuesta, dependiendo de su composición química (cantidad y el tipo de lípidos, antioxidantes y prooxidantes, y condiciones de almacenamiento) [52]. La oxidación de las proteínas aisladas de leche por luz y por otros agentes oxidantes es un tema que ha sido muy poco estudiado, y en general, el conocimiento sobre las consecuencias de la oxidación de proteínas en los alimentos es escaso [53-54].

La producción de proteínas oxidadas y su acumulación está involucrada en el envejecimiento natural de las proteínas tisulares, así como en la patogénesis de la aterosclerosis, hiperlipemias, enfermedades inflamatorias y autoinmunes [55-56].

Las proteínas en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos son propensas a reacciones de oxidación. Se produce oxidación de los aminoácidos y las proteínas por medio de la reacción con radicales libres generados como subproductos de los procesos metabólicos normales, ó por factores externos tales como tratamientos físicos (calentamiento, presión, agitación y bombeo), reacciones fotoquímicas e irradiación ( $\gamma$ -, x-, y UV), la interacción con compuestos químicos ( $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , Glutación, HOCl,  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lípidos peroxidados), y enzimas oxidoreductasas [51, 57]. La oxidación de proteínas y aminoácidos es afectada por muchos factores como el pH, temperatura, actividad de agua, y la presencia de catalizadores o inhibidores [58]. Los radicales libres pueden reaccionar directamente con la proteína o pueden reaccionar con otras moléculas tales como lípidos y carbohidratos, formando productos que posteriormente reaccionan con las proteínas (Figura 14).

En la Figura 14 se muestran las vías más comunes por las cuales se oxidan las proteínas [59].



**Figura 14.** Vías de oxidación de proteínas a través de: A) la transferencia de los radicales libres, B) la oxidación, y C) formación de entrecruzamientos PH = proteína,  $\text{P}^\bullet$  = proteína radical, AH = cualquier molécula con átomos de hidrógeno que se puede abstraer.  $\text{A}^\bullet$  = radical no proteico,  $\text{PO}^\bullet$  = radical alcóxido,  $\text{POO}^\bullet$  = radical peróxido, POOH = hidroperóxido,  $\text{P}-\text{CH}=\text{O}$  = productos secundarios tales como los aldehídos.

Las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos son los sitios de oxidación de las proteínas. Estos pueden conducir a la fragmentación de la cadena polipeptídica, la formación de agregados proteína-proteína y a la formación de enlaces cruzados, que a menudo cambian la conformación, incluyendo la desnaturalización de la proteína funcional y por lo tanto la inactivación de la proteína [60]. Estos cambios producen frecuentemente aumento en la exposición de residuos hidrofóbicos de las proteínas, pudiendo modificar la capacidad intrínseca de la función proteica, tales como la unión a receptor o a ligandos y la interacción con bicapas lipídicas de membrana.

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

Durante la oxidación proteica se produce la oxidación de los grupos sulfhidrilos y se forman grupos carbonilos en las cadenas laterales. Las tirosinas pueden entrecruzarse, clorinarse, nitrosarse, o hidroxilarse, los triptófanos sufren modificaciones, se forman hidroperóxidos a partir de los aminoácidos alifáticos y se producen aductos de peroxidación lipídica. También se han informado casos de productos de oxidación formados a partir de la modificación de dos residuos adyacentes [61].

En la Tabla 5 se observan los productos de oxidación de aminoácidos conocidos [60].

Aminoácidos	Productos de Oxidación
Cys	cistina, ácido cístico
Met	sulfóxido de metionina, sulfona de metionina
Trp	2-, 4-, 5-, 6-, y 7-hidroxitriptofano, nitrotriptófano, quinurenina, 3-hidroxicinurina, N-formilquinurenina
Phe	2,3-dihidroxi-fenilalanina (DOPA), m- y o-hidroxi-fenilalanina, dímeros de aminoácidos hidroxilados
Tyr	3,4-dihidroxi-fenilalanina (DOPA), tirosina-tirosina (ditirosina) enlaces cruzados, Tyr-Tyr, nitrotirosina, clorotirosina
His	2-oxohistidina, asparagina, ácido aspártico
Arg	semialdehído glutámico, ácido 5-hidroxi -2-aminovalérico
Lys	$\alpha$ -semialdehídoaminoalifático, hidroperóxidos y hidróxidos de lisina
Pro	2-pirrolidona, 4- and 5-hidroxi-prolina, ácido piroglutámico, semialdehído glutámico, hidroperóxidos de prolina
Thr	2-amino-3-cetobutírico
Glu	ácido oxálico, ácido pirúvico, hidroperóxido de ácido glutámico
Val	hidroperóxidos y hidróxidos de valina, compuestos carbonílicos
Gly	ácido aminomalónico
Cadenas laterales de aminoácidos no aromáticos	compuestos carbonílicos

**Tabla 5.** Productos de oxidación de aminoácidos.

#### Formación de grupos carbonilos

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

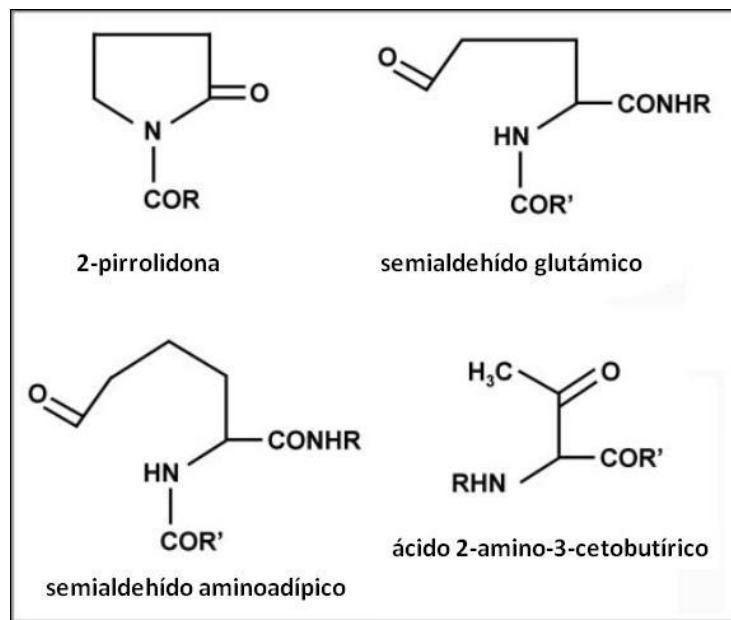
- Por clivaje oxidativo de la cadena de aminoácidos por la vía de reacción de la  $\alpha$ -amidación, o por el clivaje asociado con la oxidación de residuos glutámicos [62].



- Por reacciones secundarias de las cadenas laterales de aminoácidos con productos de oxidación lipídica, por medio de la formación de aductos de Michael con residuos lisina, histidina, y cisteína para formar productos finales de lipoxidación avanzada.
- Por reacciones de glicación/glicosilación de grupos amino de lisina (Lys), con azúcares reductores, formando productos finales de glicosilación avanzada [62-63]

Los grupos carbonilos proteicos generados por cualquiera de estos mecanismos pueden reaccionar además con grupos amino de residuos lisina en la misma u otra molécula de proteína para formar derivados con enlaces cruzados inter o intra-molécula de proteína [62].

Los carbonilos proteicos generados por la oxidación de las cadenas laterales de los aminoácidos son: 2-pirrolidona a partir de la oxidación directa de residuos Pro, semialdehído glutámico a partir de Pro y arginina (Arg), semialdehído aminoalifático a partir de Lys, ácido 2-amino-3-cetobutírico resultante de la oxidación directa de residuos treonina (Thr), y oxohistidina a partir de histidina (Hys) [64]. Los primeros cuatro productos se muestran en la Figura 15.



**Figura 15.** Estructuras químicas de grupos carbonilos proteicos producto de la oxidación directa de las cadenas laterales de aminoácidos proteicos. Se muestra la estructura de: 2-pirrolidona (resultante de la oxidación directa de residuos Pro), semialdehído glutámico (resultante de la oxidación directa de residuos Arg o Pro), semialdehído  $\alpha$ -aminoalifático (resultante de la oxidación directa de residuos Lys), y ácido 2-amino-3-cetobutírico (resultante de la oxidación directa de residuos Thr).

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

## 4.2 Oxidación de proteínas por luz

Cuando las proteínas se exponen a la luz UV o visible pueden darse dos procesos principales. El primero involucra la foto-oxidación directa debida a la absorción de radiación UV por la proteína (primeramente las cadenas laterales) y grupos cromóforos unidos, generando estados excitados (singlete ( $^1\Delta_g$ ) o triplete ( $^3\Sigma$ )) o radicales vía foto-ionización. Estos mecanismos son a menudo llamados “Procesos Tipo I” [65]. El segundo proceso principal implica la oxidación indirecta de la proteína por medio de la formación y subsecuente reacción del oxígeno singlete (oxígeno molecular en su primer estado de excitación  $^1\Delta_g$ ;  $^1O_2$ ) generado por la transferencia de energía del estado basal (triplete) del oxígeno molecular a los enlaces proteicos u otros cromóforos. Estas reacciones son conocidas como “Procesos de Tipo II”. El oxígeno singlete puede ser generado por diversas reacciones enzimáticas y no enzimáticas, incluyendo procesos mediados por proteínas hémicas, lipoxigenasas, y leucocitos activados, así como reacciones de terminación radicalaria. [51]

El estado  $^1\Delta_g$  del oxígeno molecular, que posee dos electrones en el mismo orbital molecular con espines apareados, se forma rápidamente y es solo  $94 \text{ kJmol}^{-1}$  por sobre el estado triplete basal ( $^3\Sigma$ ), y posee una larga vida de  $10^{-6} - 10^{-5} \text{ s}$  en ausencia de moléculas con las cuales pueda sufrir una reacción rápida. Otros estados oxidados pueden ser formados (por ej. El estado  $^1\Sigma_g$ , el cual posee los dos electrones de mayor energía en diferentes orbitales con espines apareados), pero estos son de mayor energía ( $\sim 158 \text{ kJ mol}^{-1}$  por arriba del estado triplete basal en el caso de  $^1\Sigma_g$ ), son de vida corta, y usualmente sufren rápido decaimiento (con  $k \approx 10^{11} \text{ s}^{-1}$ ) en vez de reacción química. El estado  $^1\Delta_g$  es por lo tanto el estado excitado más importante del oxígeno en reacciones de oxidación fotosensibilizadas en sistemas biológicos.

### Generación de oxígeno singlete por luz en presencia de sensibilizadores endógeno y exógeno

La formación de oxígeno singlete por absorción de luz solar por aminoácidos presentes dentro de la estructura proteica es un proceso limitado en ausencia de cromóforos. La proteína no posee usualmente ningún grupo funcional que absorba a longitudes de onda mayores a 320 nm. Los principales aminoácidos cromóforos presentes en las proteínas son triptófano (Trp), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), histidina (His) cisteína (Cys), y cistina (dímero de dos cisteínas) [66]. Los demás aminoácidos no absorben de forma significativa a longitudes de onda mayores a 230 nm, y los enlaces peptídicos  $-C(O)-NH-$  solo exhiben una pobre banda de absorción a 210 nm-220 nm, la absorción de la cadena polipeptídica es despreciable [67]. La fotoquímica directa de las proteínas es dominada por las cadenas laterales de aminoácidos y ninguna de estas especies es muy eficiente para la generación de oxígeno singlete a partir de sus estados excitados [68]. Algunos productos de oxidación (particularmente del Trp), o sus derivados son más eficientes para la formación de oxígeno singlete [68]. Además, la formación de oxígeno singlete puede ser sensibilizada por las cadenas laterales de los aminoácidos presentes en la estructura proteica, en general esto es ineficiente y contribuye sólo en una forma minoritaria al flujo total de oxígeno singlete que puede ser generado dentro de una célula o tejido bajo circunstancias normales. En contraste, la exposición a luz UV o visible de una amplia gama de compuestos aromáticos (ej: derivados del naftaleno y antraceno) ó alquenos conjugados (ej: porfirinas, una amplia variedad de moléculas colorantes) genera estados excitados que pueden sufrir transferencia de energía rápida y

eficiente del  $O_2$  para producir  $^1O_2$  [68].

La transferencia de energía para producir  $^1O_2$  usualmente compite con la transferencia de electrones, por lo cual muchos fotosensibilizadores dan tanto  $^1O_2$  así como radicales  $O_2\cdot$  (anión superóxido). Las constantes de velocidad para la transferencia de energía para generar  $^1O_2$  ( $k \approx 1-3 \times 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) son generalmente más altas que aquellas para la transferencia de electrones para producir  $O_2\cdot$  ( $k \leq 1 \times 10^7 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), por lo que el proceso de formación predomina. El rendimiento de  $^1O_2$  versus el radical, como es  $O_2\cdot$ , es muy dependiente del sensibilizador, la longitud de onda de excitación, y de las condiciones de reacción. El  $^1O_2$  puede interactuar con blancos potenciales por dos vías principales: desactivación (quenching) física y reacción química.

La mayoría de las reacciones de  $^1O_2$  con aminoácidos, péptidos y proteínas se producen a través de vías químicas en lugar de vías físicas [69]. Para los residuos de Trp, las constantes de velocidad de reacción física y química son de magnitud similar [69], siendo afectadas las contribuciones relativas de estos procesos por un número de factores que incluyen el medioambiente local [51].

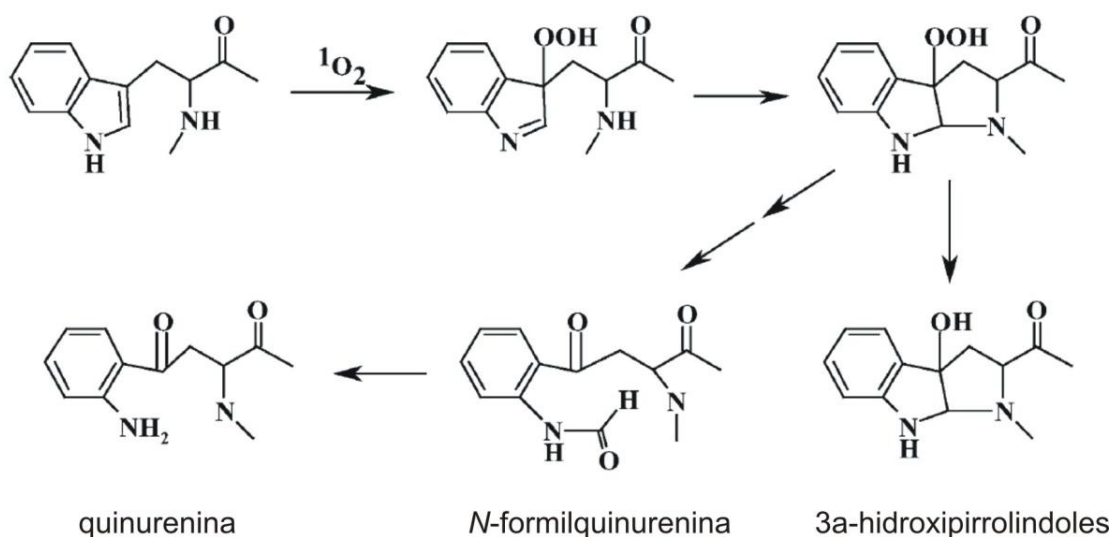
La presencia y la posición de los sustituyentes en el anillo indólico del Trp también afecta a la velocidad de estos procesos [70].

Las constantes de velocidad para la reacción química del  $^1O_2$  con las cadenas laterales de otros aminoácidos libres varían dramáticamente, lo que resulta en el daño selectivo de residuos particulares. De los aminoácidos comunes sólo His, Tyr, Met, Cys, y cistina, además de Trp, reaccionan a velocidades significativas a valores de pH fisiológicos [51, 71-72]. Todas las otras cadenas laterales de aminoácidos reaccionan mucho más lentamente, con constantes de velocidad menores a  $0,7 \times 10^7 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a valores de pH neutro [71]. A valores de pH altos, que es improbable que se encuentren fisiológicamente, Arg y Lys reaccionan rápidamente a través de sus formas no protonadas.

### 4.3 Oxidación de residuos triptófano

La reacción inicial de  $^1O_2$  con Trp se cree que produce ya sea un dioxetano a través del enlace C2-C3 o un doble hidroperóxido a C3 [73-74]. Se ha reportado posterior descomposición de estos intermediarios a través de la escisión del enlace C2-C3 para dar N-formilquinurenina, mientras que el cierre del anillo da lugar a 3 $\alpha$ -hidroperoxipirrolindol y 3 $\alpha$ -hidroxipirrolindol [73] (Figura 16). La descomposición de 3 $\alpha$ -hidroperoxipirrolindol a 3 $\alpha$ -hidroxipirrolindol también produce N-formilquinuranina [73-74]. La descomposición de los peróxidos iniciales puede implicar reacciones no radicalarias o ruptura homolítica de enlace -O-O- para formar radicales. La reducción de dos electrones de 3 $\alpha$ -hidroperoxipirrolindol da como resultado una conversión relativamente limpia a 3 $\alpha$ -hidroxipirrolindol [75]. Se ha demostrado que los iones metálicos y la luz UV catalizan la descomposición de los peróxidos a radicales [76]. La formación de 3 $\alpha$ -hidroperoxipirrolindol (y por lo tanto 3 $\alpha$ -hidroxipirrolindol) requiere una reacción de cierre de anillo que implica el grupo  $\alpha$ -amino de los aminoácidos libres, que estarían menos disponibles en péptidos y en proteínas debido a su participación en la formación del enlace peptídico. Sin embargo, derivados de 3 $\alpha$ -hidroperoxipirrolindol son formados en péptidos protegidos y especies similares pueden ser formadas en proteínas. N-formilquinurenina y quinurenina son mejores

fotosensibilizadores que el Trp y son más eficientes en la formación de  $^1\text{O}_2$  durante la exposición a la luz. Además, la formación de N-formilquinurenina y quinurenina en proteínas puede resultar en la propagación del daño. La exposición UV prolongada exacerba el daño por medio de la descomposición de endo- e hidro-peróxidos iniciales [51]. Los productos de oxidación del triptófano tienen un máximo de emisión de fluorescencia ( $E_m$ ) distinto a la del triptófano, cuando éste se excita a 295nm emite a 360 nm, N-formilquinurenina (NFK)  $E_m$  420 nm y Quinurenina  $E_m$  465 nm. Generalmente se acepta que el hidroxitriptófano es producto de la incorporación de una molécula de oxígeno, la NFK de la incorporación de dos átomos de oxígeno y la quinurenina resultaría de la decarboxilación de esta última. La incorporación de un oxígeno a la quinurenina resultaría en la formación de la hidroxiquinurenina [77].

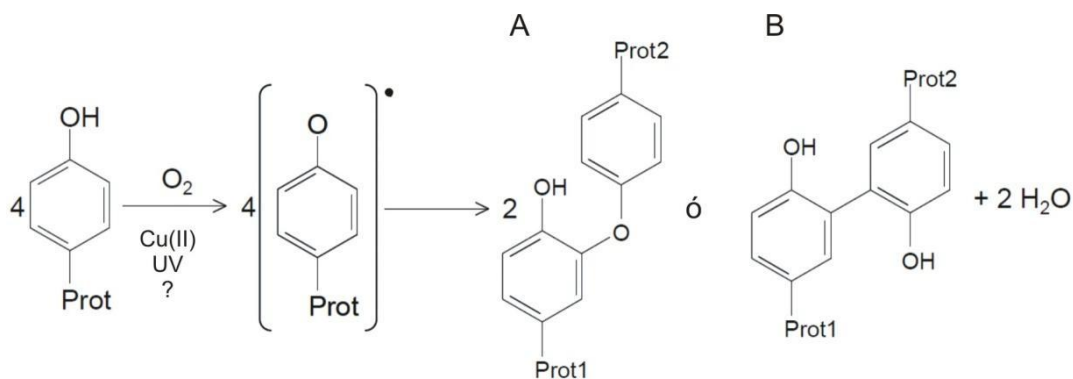


**Figura 16.** Formación de productos de oxidación del triptófano

#### 4.4 Oxidación de residuos tirosina

En estudios *in vitro* se ha identificado o-tirosina y m-tirosina como productos estables de la reacción entre un radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) y una fenilalanina [78]. o,o'-ditirosina es el producto final cuando los radicales hidroxilos reaccionan entre sí formando una unión entre dos tirosinas (Figura 17). La gran estabilidad de los enlaces ditirosinas “*in vivo*” [79] e “*in vitro*” [80] ha sido utilizada como marcador de oxidación proteica en algunos casos, ya que se requiere la existencia de aminoácidos tirosinas susceptibles de ser alcanzados por la acción de la luz y/o de los metales. La caseína es una de las proteínas con mayor cantidad relativa de tirosinas por lo tanto la formación de ditirosina en caseínas es un tema importante en el estudio de la oxidación de las proteínas lácteas.

La generación de enlaces ditirosina se produce *in vitro* por distintos agentes: irradiación UV, radicales  $\text{OH}\bullet$  y  $\text{N}_3\bullet$ ,  $\text{NO}_2$ , peroxinitrito  $-\text{ONOO}\bullet^-$ , e hidroperóxidos lipídicos [81]. También se produce ditirosina por el tratamiento con enzimas peroxidasa del rábano y mieloperoxidasa [81].



**Figura 17.** Formación de ditirosina produciendo el enlace entre dos moléculas proteicas distintas (Prot1 y Prot 2). A) o,o' -ditirosina B) iso-ditirosina.

La exposición de proteínas a rayos gama o a sistemas Fenton produce también otros productos de oxidación de tirosina en las proteínas como la 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) [82]. Este producto específico de la tirosina, en contraste con la formación de grupos carbonilos, puede estar presente en cantidades muy bajas.

La tirosina en las proteínas también puede formar productos carbónicos proteicos por oxidación [62]. En lipoproteínas de baja densidad, hay aproximadamente 1 DOPA por cada 1600 residuos Tyr [62]. Es normal que la determinación de DOPA en tejidos, de valores con órdenes de magnitud menores que los asociados a carbonilos proteicos en la misma muestra [62].

#### 4.5 Formación de polímeros, oligómeros y agregados

Hay evidencia considerable de la fácil formación de oligómeros y agregados de alto peso molecular en las proteínas expuestas a la luz [51]. Algunos de estos agregados pueden surgir de las reacciones de terminación radical-radical Tyr- radicales fenoxilo para dar ditirosina [51]. La agregación a través de formación de puentes disulfuros intermoleculares parece ser un proceso común [51]. Otras reacciones también pueden dar lugar a la formación de agregados, y se ha informado que pueden surgir enlaces cruzados como resultado de reacciones secundarias u "oscuras" independiente de la formación continua de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> [51].

Se ha propuesto que los productos formados como resultado de la foto-oxidación de residuos His pueden reaccionar con Lys, Cys u otros residuos His para dar entrecruzamientos, que pueden ser análogos a las bases de Schiff/productos de Amadori detectados en reacciones de compuestos carbonílicos de bajo peso molecular con cadenas laterales de residuos Lys y Arg [51].

La formación de polímeros proteicos entre proteínas del suero y caseínas ha sido descrita para leche tratada por calor [83]. La desnaturalización de β-LG parece ser el fenómeno clave inicial para la formación de polímeros [84] y ha sido propuesto como marcador de leche procesada por calentamiento [85]. El calor induce un cambio conformacional que resulta en la exposición de un grupo tiol reactivo, el cual forma puentes disulfuro con otras proteínas que contienen cisteína como BSA, o con proteínas que poseen puentes disulfuro como α-LA, κ-CN, y αs2-CN [86]. El tratamiento térmico de la leche produce una mezcla compleja de proteínas del suero nativas y desnaturalizadas presentes como agregados de proteína del suero, agregados de CN con proteínas del suero, y micelas de caseína cubiertas de agregados de proteína de suero

[87]. Aún no se conoce el efecto de la irradiación UV en la generación de oligómeros y agregados de las proteínas de la leche.

## Bibliografía

1. Smithers, G.W., *Whey and whey proteins—From 'gutter-to-gold'*. International Dairy Journal, 2008. **18** (7): p. 695-704.
2. Eriksson, P., *Nanofiltration Extends the Range of Membrane Filtration*. Vol. 7. 1988. 58-62.
3. Suárez, E., et al., *Demineralization of whey and milk ultrafiltration permeate by means of nanofiltration*. Desalination, 2009. **241** (1): p. 272-280.
4. INTI, a.e.-S.M.I.N.d.T.I.-. ed. *Valorización del lactosuero*. ed. P.J.c.p.G.B.M.M.L.C.p.d.P.J.G.B. Muset. 2017.
5. Huertas, R.A.P., *Lactosuero: importancia en la industria de alimentos whey: importance in the food industry*. Revista facultad nacional de agronomía, 2009. **62** (1): p. 4967-4982.
6. Fox, P. and A. Brodtkorb, *The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance*. International Dairy Journal, 2008. **18** (7): p. 677-684.
7. SAEZ-ORVIZ, S., et al., *Approaches for casein film uses in food stuff packaging*. Afinidad, 2017. **74** (577).
8. Bonnaillie, L.M., et al., *Casein films: The effects of formulation, environmental conditions and the addition of citric pectin on the structure and mechanical properties*. Polymers, 2014. **6** (7): p. 2018-2036.
9. (OIR), I.y.E.E.d.C.d.P.O.I.d.I.R., *Estadísticas del sector lácteo a nivel nacional*. Agosto 2016, Universidad de Villa María. Instituto de Extensión.: Córdoba, República Argentina.
10. Fox, P.F., P.L. Mc Sweeney, and L. Paul, *Advanced Dairy chemistry and biochemistry*. 3<sup>rd</sup>. ed., edd De Kruif CG H.C. 2003, Kluwer Academic/Plenum: New York. 233-76.
11. Taverna, M., et al., *Composición química de la leche producida en la Cuenca Lechera Central de la Argentina*. 2001. Arg. Prod. Anim., 21 (1). **271**.
12. Smit, G., *Dairy processing: improving quality*. 2003: Elsevier.
13. Rowland, S.J., *176. The Determination of the nitrogen distribution in milk*. Journal of Dairy Research, 1938. **9** (1): p. 42-46.
14. Kjeldahl, J., *En ny Methode til Kvaelstofvestemmelse i organiske Stoffer*. Z. Anal. Chem, 1883. **22**: p. 366-382.
15. Dauphas, S., et al., *The supramolecular organisation of  $\beta$ -casein: effect on interfacial properties*. Food Hydrocolloids, 2005. **19** (3): p. 387-393.
16. McSweeney, P.L. and P.F. Fox, *Advanced dairy chemistry: volume 3: lactose, water, salts and minor constituents*. Vol. 3. 2009: Springer.
17. Godovac-Zimmermann, J., *The structural motif of  $\beta$ -lactoglobulin and retinol-binding protein: a basic framework for binding and transport of small hydrophobic molecules?* Trends in biochemical sciences, 1988. **13** (2): p. 64-66.
18. Flower, D.R., *The lipocalin protein family: structure and function*. Biochemical Journal, 1996. **318** (1): p. 1-14.
19. Loveday, S., et al., *Tuning the properties of  $\beta$ -lactoglobulin nanofibrils with pH, NaCl and CaCl<sub>2</sub>*. International Dairy Journal, 2010. **20** (9): p. 571-579.
20. Graveland-Bikker, J.F., et al., *Influence of calcium on the self-assembly of partially hydrolyzed  $\alpha$ -lactalbumin*. Langmuir, 2004. **20** (16): p. 6841-6846.
21. Akkermans, C., et al., *Micrometer-sized fibrillar protein aggregates from soy glycinin and soy protein isolate*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55** (24): p. 9877-9882.

22. Holt, C. and L. Sawyer, *Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of primary and secondary structures of the  $\alpha$ S1-,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins*. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, 1993. **89** (15): p. 2683-2692.
23. Sadat-Mekmene, L., et al., *Simultaneous Presence of PrtH and PrtH<sub>2</sub> Proteinases in Lactobacillus helveticus Strains Improves Breakdown of the Pure s1-Casein*. Vol. 77. 2010. 179-86.
24. El-Gawad, M.A. and N.S. Ahmed, *Cheese yield as affected by some parameters review*. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 2011. **10** (2): p. 131-153.
25. Sbodio, O., et al., *Simultaneous interaction of pH, CaCl<sub>2</sub> addition, temperature and enzyme concentration on milk coagulation properties / Interacción simultánea del pH, CaCl<sub>2</sub> añadido, temperatura y concentración enzimática sobre la coagulación de la leche*. Food science and technology international, 1997. **3** (4): p. 291-298.
26. Schou, M., et al., *Properties of edible sodium caseinate films and their application as food wrapping*. LWT-food science and technology, 2005. **38**(6): p. 605-610.
27. Sawale, P., *Casein and caseinate: methods of manufacture*. Encycl Food Health, 2016. **1**: p. 676-682.
28. Instituto, T.L.S., ed. *Manual de industrias lácteas* 2003 (3ª Edición).
29. Ramos, O.L., et al., *Whey and whey powders: production and uses*. 2015.
30. Dergal, S.B., H.B. Rodriguez, and A.A. Morales, *Química de los alimentos*. 1981: Alhambra.
31. Albert, C., et al., *The effect of microwave pasteurization on the composition of milk*. Krmiva: Časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme, 2009. **51** (4): p. 213-222.
32. Tehrany, E.A. and K. Sonneveld, *7 Packaging and the Shelf Life of Milk Powders*. Food Packaging and Shelf Life: A Practical Guide, 2010: p. 404.
33. Orlien, V., L. Boserup, and K. Olsen, *Casein micelle dissociation in skim milk during high-pressure treatment: Effects of pressure, pH, and temperature*. Journal of Dairy Science, 2010. **93** (1): p. 12-18.
34. Gachovska, T., et al., *Ultraviolet and pulsed electric field treatments have additive effect on inactivation of E. coli in apple juice*. Journal of Food Science, 2008. **73** (9).
35. Sastry, S.K., A.K. Datta, and R.W. Worobo, *Ultraviolet light*. Journal of Food Science, 2000. **65**(s8): p. 90-92.
36. Smith, W.L., M.C. Lagunas-Solar, and J.S. Cullor, *Use of pulsed ultraviolet laser light for the cold pasteurization of bovine milk*. Journal of food protection, 2002. **65** (9): p. 1480-1482.
37. Guerrero-Beltrán, J. and G. Barbosa-Cánovas, *Advantages and limitations on processing foods by UV light*. Food science and technology international, 2004. **10** (3): p. 137-147.
38. Snowball, M. and I. Hornsey, *Purification of water supplies using ultraviolet light*. Developments in food microbiology, 1988.
39. Rosenthal, I., *Ultraviolet-visible radiation*, in *Electromagnetic Radiations*, in Food Science. 1992, Springer. p. 65-104.
40. Bosset, J., P. Gallmann, and R. Sieber, *Influence of light transmittance of packaging materials on the shelf-life of milk and dairy products—A review*, in *Food packaging and preservation*. 1994, Springer. p. 222-268.



41. Viljanen, K., et al., *Anthocyanin antioxidant activity and partition behavior in whey protein emulsion*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53** (6): p. 2022-2027.
42. Bergt, C., et al., *Lysine residues direct the chlorination of tyrosines in YXXK motifs of apolipoprotein AI when hypochlorous acid oxidizes high density lipoprotein*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279** (9): p. 7856-7866.
43. Van Aardt, M., et al., *Effect of antioxidant ( $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid) fortification on light-induced flavor of milk*. Journal of Dairy Science, 2005. **88**(3): p. 872-880.
44. Dunkley, W., R. Pangborn, and J. Franklin, *Effects of fluorescent light on flavor, ascorbic acid, and riboflavin in milk*. Food Technology, 1962. **16** (9): p. 112-&.
45. Marsili, R., *Comparison of Solid-Phase Microextraction and Dynamic Headspace Methods for the Gas Chromatographic—Mass Spectrometric Analysis of Light-Induced Lipid Oxidation Products in Milk*. Journal of chromatographic science, 1999. **37** (1): p. 17-23.
46. Biolatto, A., et al., *Seasonal variation in the odour characteristics of whole milk powder*. Food Chemistry, 2007. **103** (3): p. 960-967.
47. Lloyd, M., S. Hess, and M. Drake, *Effect of nitrogen flushing and storage temperature on flavor and shelf-life of whole milk powder*. Journal of Dairy Science, 2009. **92** (6): p. 2409-2422.
48. Birlouez-Aragon, I., et al., *Assessment of protein glycation markers in infant formulas*. Food Chemistry, 2004. **87** (2): p. 253-259.
49. Waraho, T., D.J. Mc Clements, and E.A. Decker, *Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions*. Trends in Food Science & Technology, 2011. **22**(1): p. 3-13.
50. Cardenia, V., et al., *Cholesterol photosensitized oxidation in food and biological systems*. Biochimie, 2013. **95** (3): p. 473-481.
51. Davies, M.J., *Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences*. Biochemical and biophysical research communications, 2003. **305** (3): p. 761-770.
52. Fenaille, F., et al., *Modifications of milk constituents during processing: A preliminary benchmarking study*. International Dairy Journal, 2006. **16** (7): p. 728-739.
53. Utrera, M. and M. Estévez, *Analysis of tryptophan oxidation by fluorescence spectroscopy: effect of metal-catalyzed oxidation and selected phenolic compounds*. Food Chemistry, 2012. **135** (1): p. 88-93.
54. Dalsgaard, T.K., et al., *Changes in structures of milk proteins upon photo-oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(26): p. 10968-10976.
55. Gutteridge, J.M. and B. Halliwell, *Iron toxicity and oxygen radicals*. Bailliere's clinical haematology, 1989. **2** (2): p. 195-256.
56. Levine, R.L., *Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease 2, 3*. Free Radical Biology and Medicine, 2002. **32** (9): p. 790-796.
57. Stadtman, E. and R. Levine, *Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins*. Amino acids, 2003. **25** (3-4): p. 207-218.
58. Kristensen, D., M.V. Kröger-Ohlsen, and L.H. Skibsted, *Radical formation in dairy products: Prediction of oxidative stability based on electron spin resonance spectroscopy*. 2002, ACS Publications.
59. Salminen, H., *Effect of phenolic-rich plant materials on protein and lipid oxidation reactions*. 2009.

60. Shanlin, F., R. Stocker, and M.J. Davies, *Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation*. *Biochemical Journal*, 1997. **324** (1): p. 1-18.
61. Viljanen, A.P., et al., *Rosiglitazone treatment increases subcutaneous adipose tissue glucose uptake in parallel with perfusion in patients with type 2 diabetes: a double-blind, randomized study with metformin*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2005. **90** (12): p. 6523-6528.
62. Stadtman, E.R. and R.L. Levine, *Protein oxidation*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000. **899** (1): p. 191-208.
63. Dalle-Donne, I., et al., *Biomarkers of oxidative damage in human disease*. *Clinical chemistry*, 2006. **52** (4): p. 601-623.
64. Levine, R.L., et al., *Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins*, in *Methods in enzymology*. 1990, Elsevier. p. 464-478.
65. Davies, M.J. and R.J. Truscott, *Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2001. **63** (1-3): p. 114-125.
66. Bensasson, R., E. Land, and T. Truscott, *Excited states and free radicals in biology and medicine: contributions from flash photolysis and pulse radiolysis*. 1993: Tokyo.
67. Pattison, D.I. and M.J. Davies, *Actions of ultraviolet light on cellular structures, in Cancer: cell structures, carcinogens and genomic instability*. 2006, Springer. p. 131-157.
68. Redmond, R.W. and J.N. Gamlin, *A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules*. *Photochemistry and photobiology*, 1999. **70** (4): p. 391-475.
69. Matheson, I., et al., *The quenching of singlet oxygen by amino acids and proteins*. *Photochemistry and photobiology*, 1975. **21** (3): p. 165-171.
70. Michaeli, A. and J. Feitelson, *Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides*. *Photochemistry and photobiology*, 1994. **59** (3): p. 284-289.
71. Wilkinson, F., W.P. Helman, and A.B. Ross, *Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation*. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 1995. **24** (2): p. 663-677.
72. Rougee, M., et al., *Deactivation of singlet molecular oxygen by thiols and related compounds, possible protectors against skin photosensitivity*. *Photochemistry and photobiology*, 1988. **47**(4): p. 485-489.
73. Nakagawa, M., et al., *A valid model for the mechanism of oxidation of tryptophan to formylkynurenine—25 years later*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977. **74** (11): p. 4730-4733.
74. Saito, I., et al., *Peroxidic intermediates in photosensitized oxygenation of tryptophan derivatives*. *Accounts of Chemical Research*, 1977. **10** (9): p. 346-352.
75. Langlots, R., et al., *Biological activities of phthalocyanines—iv. Type ii sensitized photooxidation of l-tryptophan and cholesterol by sulfonated metallo phthalocyanines*. *Photochemistry and photobiology*, 1986. **44** (2): p. 117-123.
76. Pattison, D.I., A.S. Rahmanto, and M.J. Davies, *Photo-oxidation of proteins*. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2012. **11** (1): p. 38-53.
77. Dyer, J., S. Bringans, and W. Bryson, *Characterisation of photo-oxidation products within photoyellowed wool proteins: tryptophan and tyrosine derived chromophores*. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2006. **5** (7): p. 698-706.

78. Huggins, T.G., et al., *Formation of o-tyrosine and dityrosine in proteins during radiolytic and metal-catalyzed oxidation*. Journal of Biological Chemistry, 1993. **268** (17): p. 12341-12347.
79. Artola, R.L., et al., *High-density lipoprotein from hypercholesterolemic animals has peroxidized lipids and oligomeric apolipoprotein: its putative role in atherogenesis*. Biochemical and biophysical research communications, 1997. **239** (2): p. 570-574.
80. Kivatinitz, S.C., *Relationship Between Protein Oxidation Markers and Oxidative Stress Biomarkers*, in *Inflammatory Diseases-Immunopathology, Clinical and Pharmacological Bases*. 2012, InTech.
81. Malencik, D.A., et al., *Dityrosine: preparation, isolation, and analysis*. Analytical biochemistry, 1996. **242** (2): p. 202-213.
82. Dalsgaard, T.K., et al., *Dityrosine, 3, 4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), and radical formation from tyrosine residues on milk proteins with globular and flexible structures as a result of riboflavin-mediated photo-oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59** (14): p. 7939-7947.
83. Singh, H., et al., *Acid-induced dissociation of casein micelles in milk: Effects of heat treatment*. Journal of Dairy Science, 1996. **79** (8): p. 1340-1346.
84. Anema, S.G., *Effect of milk concentration on the irreversible thermal denaturation and disulfide aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48** (9): p. 4168-4175.
85. Chen, W., et al.,  *$\beta$ -lactoglobulin is a thermal marker in processed milk as studied by electrophoresis and circular dichroic spectra*. Journal of Dairy Science, 2005. **88**(5): p. 1618-1630.
86. Roefs, S.P. and K.G. Kruif, *A Model for the Denaturation and Aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin*. The FEBS Journal, 1994. **226** (3): p. 883-889.
87. Vasbinder, A.J., A.C. Alting, and K.G. de Kruif, *Quantification of heat-induced casein–whey protein interactions in milk and its relation to gelation kinetics*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003. **31** (1-4): p. 115-123.
88. Farrell JR, H. M., et al. *Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision*. Journal of dairy science, 2004. **87** (6): p. 1641-1674.
89. Horne, D. S. *Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products*. International Dairy Journal, 1998. **8** (3): p. 171-177.
90. Sakurai, K., & Goto, Y. *Dynamics and mechanism of the Tanford transition of bovine  $\beta$ -lactoglobulin studied using heteronuclear NMR spectroscopy*. Journal of molecular biology, 2006. **356** (2), 483-496.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## HIPÓTESIS

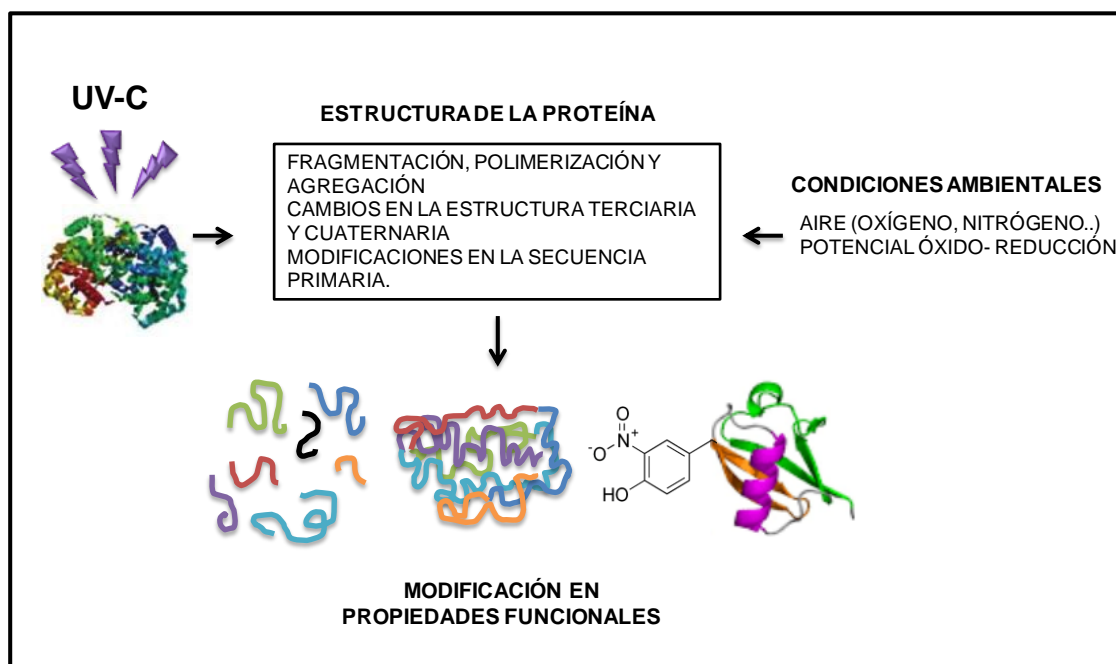
La oxidación de proteínas altera la estructura y las propiedades funcionales. Algunas de estas modificaciones son de interés biológico y tecnológico, impactando en sus propiedades como ingredientes alimentarios.

### OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS

Estudiar la oxidación de las fracciones proteicas de la leche (caseinato y suero), y de proteínas aisladas de la leche ( $\beta$ -lactoglobulina y  $\beta$ -caseína) por un agente de relevancia industrial, como la radiación lumínica.

Objetivos específicos

- 1- Caracterizar las fracciones industriales de proteínas del suero y caseínas utilizadas, composición química, pureza e integridad de la cadena de aminoácidos (CAPITULO 1).
- 2- Determinar la integridad de las proteínas y grado de proteólisis con la formación de agregados y polímeros para establecer la relación entre estado oxidativo y la calidad del producto final (CAPITULOS 2 y 3).
- 3- Determinar los cambios oxidativos a nivel de secuencia primaria, identificando los aminoácidos afectados, utilizando oxiproteómica como herramienta (CAPITULO 3).
- 4- Determinar cambios en la funcionalidad de las fracciones proteicas: alteración en la cuantificación de proteínas, especificidad como sustratos de la tripsina y generación de péptidos bioactivos (CAPITULO 4).



Resumen gráfico de la hipótesis

## **RESULTADOS**

## CAPÍTULO 1. CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES PROTEICAS

### 1.1 Dosaje y composición química de las muestras

En esta tesis se estudiaron las diferentes fracciones proteicas de la leche de vaca: Aislado de proteína de suero (WPI), Caseinato de sodio (CN),  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LA) y  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -CN). A continuación se detallan las principales características de cada una de estas preparaciones, las mismas se han descrito en detalle en el capítulo de INTRODUCCIÓN.

**WPI.** El suero de la leche es un líquido obtenido en el proceso de la fabricación del queso, éste es obtenido luego de la separación de la cuajada (caseína) para la posterior formación de queso, es decir que es el conjunto de todos los componentes de la leche que no se integran en el coágulo. Representa el 80 – 90 % del volumen total de la leche que va a ser procesada.

**CN.** El caseinato de sodio se obtiene por la coagulación ácida de la leche. Contiene cuatro tipos de proteínas,  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$  caseína, de las cuales el 50% aproximadamente corresponde a  $\alpha$ -caseína, 30% a  $\beta$ -caseína y 20% a  $\kappa$ -caseína.

**$\beta$ -LG.** Esta es una fracción purificada de la principal proteína que constituye el suero de la leche. Es una proteína poco flexible con una estructura globular. La empresa elaboradora SIGMA-ALDRICH certifica la composición.

**$\beta$ -CN.** Representa alrededor del 30% de las caseínas totales. De todas las caseínas,  $\beta$ -caseína es la más hidrofóbica. Es una proteína flexible poco estructurada denominada reomórfica. La empresa elaboradora SIGMA-ALDRICH certifica la composición.

	WPI	CN	$\beta$ -LG	$\beta$ -CN
Proteínas	90%	80%	90%	98%
Lípidos	nd	nd.	nd.	nd.
Lactosa	nd.	nd.	nd.	nd.

**Tabla 1.1** Composición de las muestras sin ningún tratamiento previo. Datos relevados de la rotulación. nd.: No detectado.

El primer estudio que se realizó fue caracterizar mejor los materiales de estudio. Se procedió a verificar la composición química, la concentración y el porcentaje de proteínas. Para ello se realizaron las determinaciones con el método patrón Kjeldahl. También se determinaron los niveles de lípidos y de lactosa.

En la Tabla 1.1 se pueden observar los datos que nos proporcionan los rótulos de cada muestra (Figura 1.1: datos de rótulo de WPI) y en la Tabla 1.2 los datos obtenidos de la verificación de la composición proteica con los distintos métodos.

### 1.2 Verificación de la composición proteica de las muestras analizadas

Se observó que la composición dada por el rótulo de la muestra no coincidió con los datos obtenidos con las diferentes técnicas empleadas (Tabla 1.2). Para WPI las tres técnicas detectaron entre el 83 y el 84 %, mientras que para CN dos de ellas detectaron

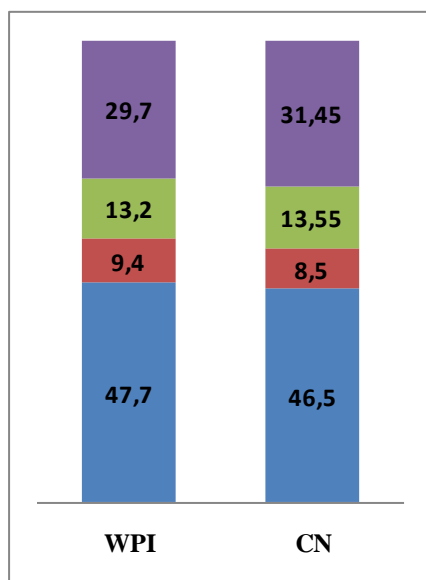
valores por encima de lo rotulado (Kjeldahl y CHN) y Milkoscan arrojó un valor inferior. Evidentemente en relación al WPI la rotulación fue inexacta, mientras que los resultados de CN demuestran que el Milkoscan no es una técnica adecuada para su valoración ya que los valores que arroja son un 13% inferior al obtenido por el método patrón. En esta tesis se consideraron correctos los valores obtenidos con la técnica patrón.

	WPI	CN
Rótulo	90%	80%
Kjeldahl	83%	85%
Milkoscan	83%	74,5%
Composición elemental (CHN)	84%	86%

**Tabla 1. 2** Composición proteica de WPI y CN sin ningún tratamiento previo. Los datos se expresan como porcentaje en masa de proteína en relación a la masa total, gramos de proteínas por 100 gr de muestra. Los métodos empleados fueron los de Kjeldahl, Milkoscan y composición elemental de carbono, hidrógeno y nitrógeno (CHN), comparados con la rotulación del empaque correspondiente.

La técnica de Milkoscan determina simultáneamente los otros componentes lácteos (lípidos y lactosa) permitiendo verificar que el contenido de lípidos era de 7% para WPI y 10% para CN; no se detectó lactosa en ninguna de las dos fracciones.

El análisis de composición elemental (Figura 1.1) demuestra que los valores relativos de CHN corresponden a muestras de proteínas y el dosaje se correspondió con el del método patrón. El contenido de N (nitrógeno) indica que las muestras no contienen lactosa.



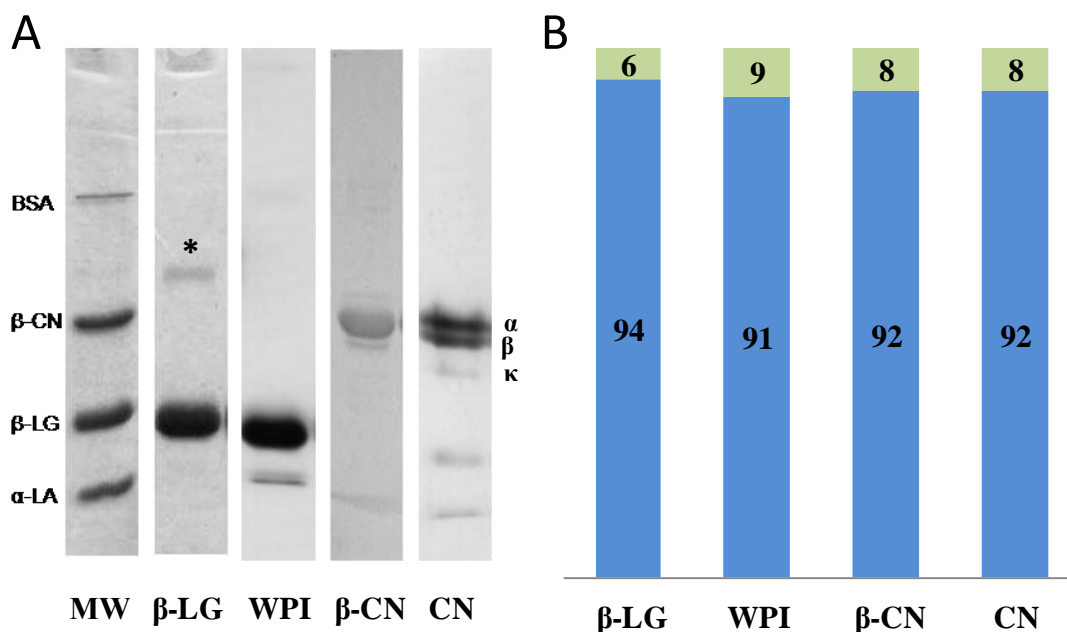
**Figura 1.1** Análisis de composición elemental CHN. Se grafica el porcentaje de carbono (azul), hidrógeno (rojo) y de nitrógeno (verde) de las muestras, el resto corresponde mayoritariamente a oxígeno (violeta).

### 1.3 Pureza e integridad de las proteínas

Se resolvieron las proteínas utilizando la técnica de geles de poliacrilamida en condiciones reductoras para determinar la pureza y la integridad de las muestras. En la



Figura 1.2 se observa la corrida de las muestras (Panel A) el cual fue analizado por el programa Gel analyser (ver MATERIALES Y MÉTODOS) donde se calcularon los porcentajes de cada proteína sin irradiación.



**Figura 1.2** Perfiles proteicos de las muestras sin irradiar. **A:** SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes y reductoras de β-LG, WPI, β-CN, y CN. MW: marcador estándar de peso molecular (las bandas corresponden a proteínas de 14.2, 18.4, 24 y 66.5 kDa). \*: dímero de β-LG; α, β y κ: las respectivas caseínas. **B:** cuantificación de las bandas de los carriles correspondientes al panel A realizado utilizando el programa GraphPad Prism 5. Azul: cantidad de proteína que coincide con los pesos moleculares de la proteína intacta. Verde: resto que falta para el 100%.

La composición de las proteínas puras fue similar a la informada en la hoja técnica provista por la empresa SIGMA-ALDRICH y no se observaron signos de proteólisis, los cuales aparecerían como una banda coincidente con el frente de corrida o como bandas difusas debajo de la mayoritaria. Para WPI y β-LG, se observa que el grueso de la proteína corresponde a una única banda con el peso molecular idéntico al testigo de β-LG. En el carril correspondiente a β-LG se detecta una banda minoritaria correspondiente al peso molecular del dímero de esta proteína, el mismo fue resistente a las condiciones reductoras del gel, por lo tanto no está formado por enlaces disulfuro. Más adelante en esta tesis se señalará que el mismo está formado por enlaces ditirosina.

El carril correspondiente a WPI muestra que esta preparación contenía α-LA en pequeñas cantidades. Es interesante que no se observaron dímeros y que por lo tanto, el WPI estaría menos oxidado que la proteína pura. Estas diferencias se deben a los distintos métodos de obtención que fueron detallados en la INTRODUCCIÓN.

La composición de β-CN resultó cercana al 98% como lo indica la rotulación, pero se observa contaminación con otras caseínas y con α-LA.

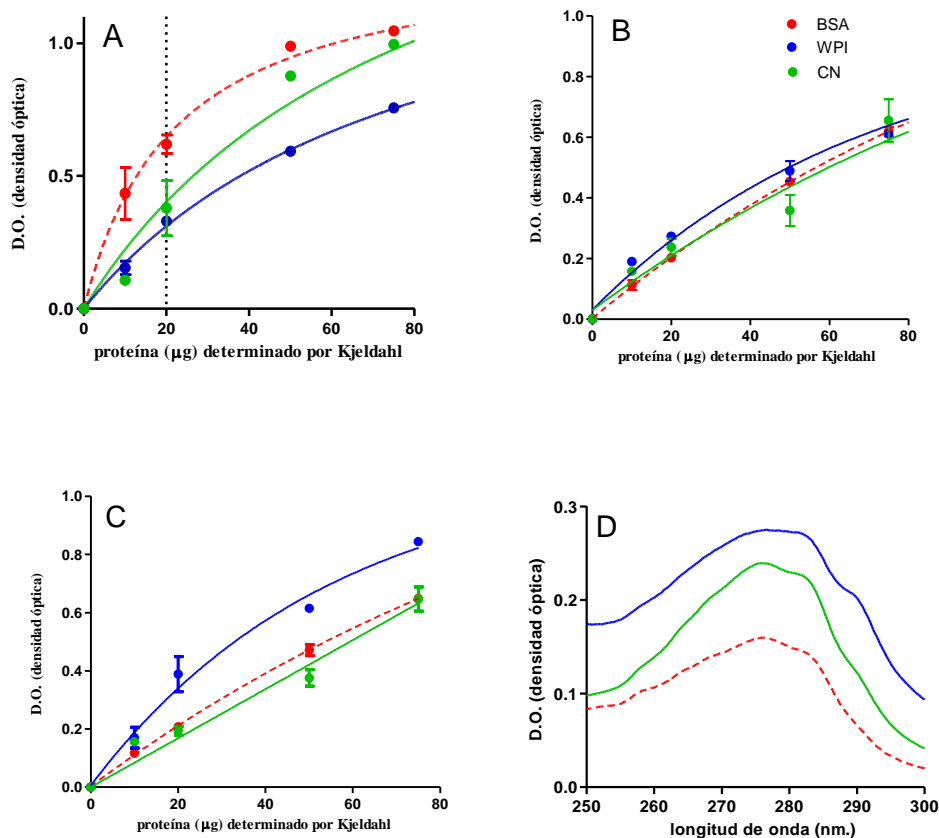
La fracción de CN industrial mostró que el contenido de caseínas fue del 92% (panel B) y se observó claramente la presencia de α, β y κ caseína (panel A). Siendo la proporción relativa de 40% α y 40% de β, el 20% restante corresponde al resto de las caseínas. El 8% restante (verde, panel B) correspondió a α-LA y un péptido de peso molecular

superior al de esta última e inferior al de la  $\kappa$ -CN (MATERIALES Y METODOS sección I).

#### 1.4 Revisión de los métodos colorimétricos para dosar proteínas lácteas

En el laboratorio las técnicas más usadas para dosar proteínas son métodos espectrofotométricos, ya sean por espectrofotometría de UV, que detecta los aminoácidos aromáticos, o por reacciones que dan un color específico, los más comunes son Lowry, Bradford y Bicincónico (BCA).

El método de Lowry cuantifica los aminoácidos aromáticos y además junto con BCA se basan en la conversión de  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  en condiciones alcalinas y el subsiguiente cambio de color en el reactivo de Folin o en el BCA. El método de Bradford se basa en el cambio de color del Coomassie blue cuando se une a una proteína. En Materiales y Métodos se detallan las tres metodologías y la espectrofotometría UV en guanidina HCl, condición en la que la absorción de los aminoácidos aromáticos no sufren influencia del plegamiento secundario y terciario de las proteínas. Se realizaron curvas de trabajo donde se analizó la respuesta de cada uno de estos métodos a cantidades crecientes de proteína cuantificada con el método patrón (Kjeldahl) (Figura 1.3).



**Figura 1.3.** Cuantificación de proteínas lácteas por Bradford (A), Lowry (B), Acido bicincónico (C) y por Espectrofotometría UV (D) en guanidina HCL 6 M. Se utilizó una concentración de 1 mg/ml para todas las muestras. BSA (Albúmina sérica bovina): rojo, WPI: azul y CN: verde.

El método de Bradford (panel A) subestimó al contenido de proteínas para todas las muestras ( $p < 0,01$  en todos los puntos). Los valores calculados, para  $20\mu\text{g}$  considerando BSA como el 100%, fueron 53% y 61% para WPI y CN respectivamente. Estos resultados muestran que la determinación de proteínas por este método no es eficaz para ninguno de los productos analizados. Los resultados indican que la cuantificación de WPI y CN cuando se realiza con Bradford requiere como estándar para la construcción de las curvas de trabajo las fracciones de cada una de las respectivas proteínas cuantificadas previamente por el método de Kjeldahl en lugar de BSA.

Las muestras cuantificadas por el método de Lowry (panel B) mostraron resultados similares a los del método de Kjeldahl usando BSA como estándar, aunque se encontraron diferencias significativas para WPI (0,07 unidad de absorbancia superior a BSA,  $p < 0,01$  para  $10\mu\text{g}$  y  $20\mu\text{g}$ ).

El método de BCA (panel C) mostró que WPI fue sobreestimado, por lo tanto este método resultó adecuado para evaluar el contenido de proteína de CN usando BSA como material de referencia pero no lo fue para WPI.

La absorbancia de WPI y CN fue casi el doble que la de BSA a  $280\text{nm}$  (0,27 vs. 0,14 densidad óptica para WPI y BSA, respectivamente) y por lo tanto es evidente que esta metodología sobreestimó su contenido (panel D).

Estos resultados demuestran que es necesario reflexionar sobre el contenido relativo de aminoácidos aromáticos cuando se decide cuantificar una fracción proteica purificada y que si se utiliza un método colorimétrico distinto del método de Kjeldahl, es necesario verificar si se puede utilizar BSA como material de referencia.

## 1.5 Conclusiones

Los resultados presentados permiten aportar nuevos conocimientos sobre estas fracciones proteicas en relación a los métodos de cuantificación y datos de su composición que no están descritos en la literatura.

Un dato relevante es que estas muestras fueron libres de lactosa, esto es importante ya que la industria requiere suplementos e ingredientes dietarios libres de lactosa para regímenes específicos.

En cuanto a la composición relativa de proteínas se concluye que los preparados industriales que se utilizaron en la presente tesis son semejantes a las proteínas puras de Sigma (Sección MATERIALES Y METODOS) tanto en composición como en integridad, sobretodo en el caso de WPI y  $\beta$ -LG.

En WPI se observa efectivamente que tiene menos proteínas de lo indicado en su rotulación (entre un 7 y 8 %). Si este se utiliza como suplemento dietario es necesario corroborar experimentalmente la concentración, para asegurarse de llegar al valor nutricional necesario.

Se concluye que para cuantificar proteínas lácteas, el método de Lowry es el que más se acerca a los datos del método patrón. La sobreestimación tanto por UV como por Lowry sería concordante con la diferencia en el contenido relativo de aminoácidos aromáticos de las proteínas lácteas, el cual es muy superior en relación al de la BSA.

## **CAPÍTULO 2. CAMBIOS ESTRUCTURALES DE LAS PROTEÍNAS LÁCTEAS SOMETIDAS A IRRADIACIÓN UV-C**

En el presente capítulo se describen los efectos de la foto-oxidación en los cuatro tipos de muestras analizadas en el capítulo anterior: WPI,  $\beta$ -LG, CN Y  $\beta$ -CN. Los efectos de la foto-oxidación se estudiaron utilizando la técnica de geles de poliacrilamida para evaluar la formación de polímeros, agregados y la fragmentación de la proteína, y también se utilizaron técnicas espectrofluorométricas para estudiar la cinética de transformación del triptófano y la formación de enlaces ditirosina.

### **2.1 Fragmentación, polimerización y agregación de $\beta$ -CN y $\beta$ -LG**

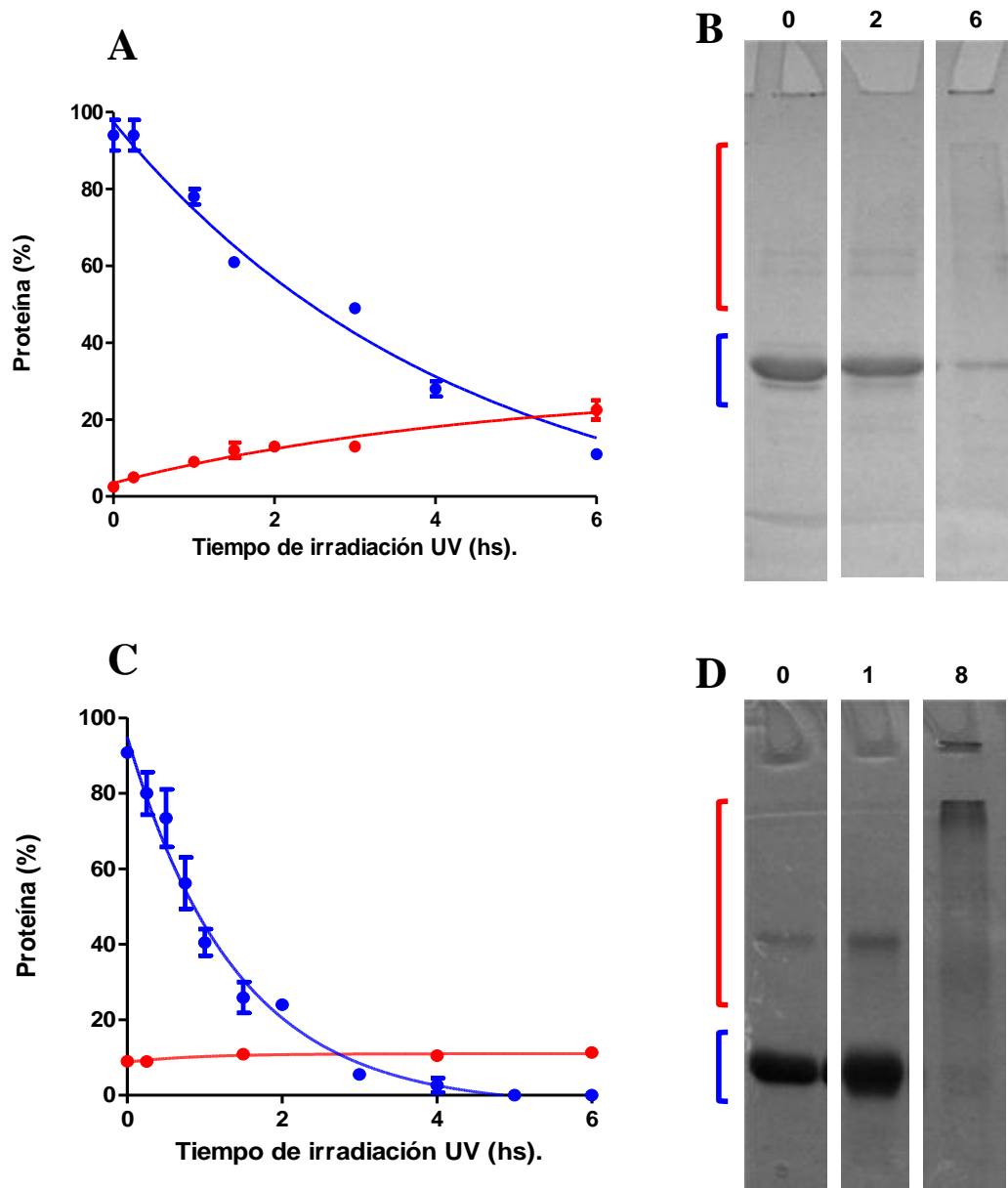
Se estudió la integridad de las proteínas puras sometidas a períodos crecientes de irradiación ultravioleta para identificar la cinética de fragmentación y polimerización.

En la Figura 2.1 se observa la cinética de cambio de porcentaje de la proteína nativa en relación al total de bandas observadas (panel A y C). En los paneles panel B y D se muestran como ejemplo imágenes de tiempos seleccionados.

Se observó que la banda correspondiente al peso molecular de la proteína nativa disminuyó con el tiempo de irradiación, tanto para  $\beta$ -CN como para  $\beta$ -LG. Esta disminución siguió una cinética acorde con un modelo monomolecular de pseudo primer orden, que ajustó con un  $r^2$  mayor o igual a 0,98 para las dos proteínas (ver MATERIALES Y MÉTODOS sección L).

La disminución observada en la proporción de proteínas nativas se correspondió principalmente con pérdida en la detección de proteína total en el gel, es decir las bandas sumadas no alcanzaron el 100%. Esto es más notable a tiempos superiores a las dos horas para las dos muestras. Esta pérdida de recuperación de proteína en los carriles se debería a la fragmentación en péptidos pequeños que no quedarían retenidos en el gel de corrida, y por lo tanto no son cuantificables.

También se observa la formación de oligómeros de mayor peso molecular, que en el caso de  $\beta$ -LG corresponde al dímero, principalmente a tiempos cortos (panel C y D) y de agregados a tiempos mayores que no penetran en el gel de corrida. Esta última observación es notable a partir de las 6 hs y 8 hs (panel B y D respectivamente).



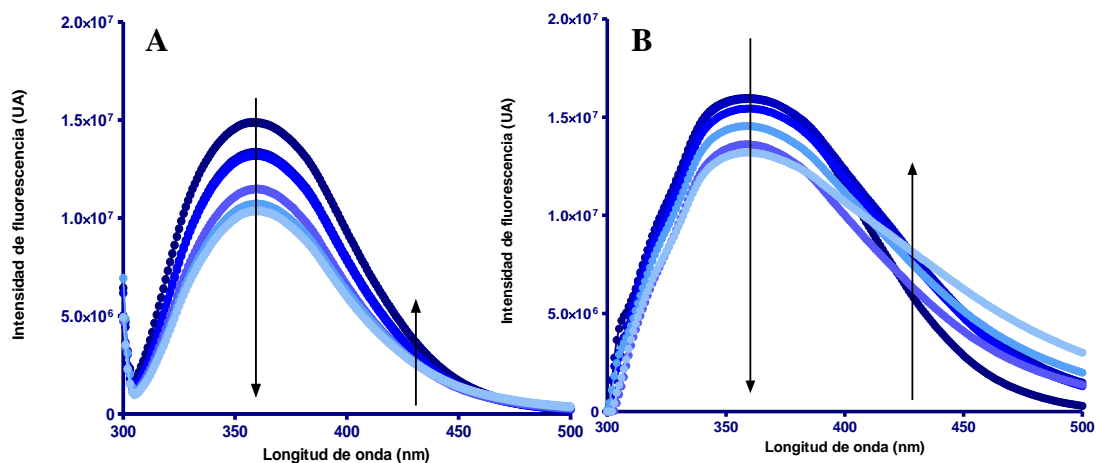
**Figura 2.1** Cinética de proteólisis y de agregación de  $\beta$ -CN y de  $\beta$ -LG sometidas a irradiación UV-C. Panel A y C: gráficos obtenidos de geles SDS-PAGE bajo condiciones reductoras (panel B y D). Proteína nativa (azul) y dímeros más oligómeros: rojo.  $\beta$ -CN: panel A y B.  $\beta$ -LG: panel C y D. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM de experimentos realizados por triplicado. Gráficos adaptados de trabajo científico publicado: *Oxidative consequences of UV irradiation on isolated milk proteins: effects of hydrogen peroxide and bivalent metal*. Scheidegger D, Larsen G, Kivatinitz S. C. *International Dairy Journal*, 2016.

## 2.2 Modificaciones en aminoácidos y cambios en la estructura terciaria y cuaternaria en $\beta$ -CN y $\beta$ -LG

Utilizando la técnica de espectroscopía de fluorescencia se determinó la oxidación de Tyr y Trp, midiendo la formación de N-formilquinurenina (NFK), producto de carbonilación del triptófano (Figura 2.2) y de enlaces ditirosina (Figura 2.3). Se observó la disminución de triptófano (pico máximo de emisión 360 nm) y simultáneamente la aparición de su producto de oxidación NFK (pico máximo de emisión de 435nm),

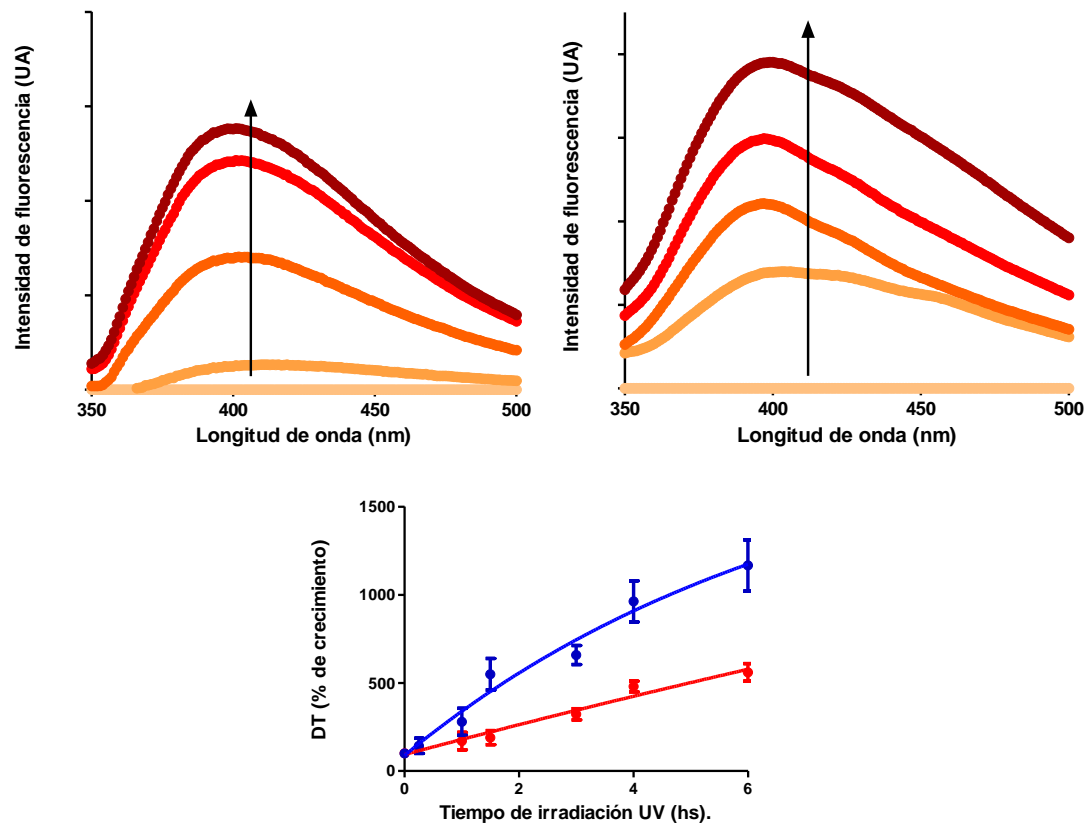
marcados con una flecha descendente y ascendente respectivamente. La desaparición del triptófano fue más rápida para  $\beta$ -LG (panel A) que para  $\beta$ -CN (panel B), y se observó una mayor formación de NFK para  $\beta$ -CN que para  $\beta$ -LG, sobre todo a tiempos más largos de irradiación (tonos más claros).

El análisis cinético de estos datos (Tabla 1) arrojó que la vida media de Trp fue mayor para  $\beta$ -CN que para  $\beta$ -LG, éste fue un hallazgo inesperado, ya que la generación de NFK a partir de  $\beta$ -CN fue mucho más rápida. La desaparición del Trp siguió una cinética acorde con un modelo monomolecular de pseudo primer orden (Tabla 2.1).



**Figura 2.2** Cinética de decaimiento de la fluorescencia de triptófano para  $\beta$ -LG (panel A) y  $\beta$ -CN (panel B). Las proteínas fueron expuestas a diferentes horas de irradiación UV (0-1-3-4-6 hs, azul oscuro al más claro). Las determinaciones se realizaron con guanidina. La flecha descendente describe la pérdida de triptófano en su punto máximo de emisión (360 nm) y la flecha ascendente describe la formación de N-formilkinurenina (435 nm). Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM de experimentos realizados por triplicado.

En la Figura 2.3 se muestra el espectro de fluorescencia de la formación de ditirosina (panel A y B) y el análisis cinético de aparición de la misma (panel C). Se observó que la formación de ditirosina (pico máximo de emisión: 410 nm) fue mayor para  $\beta$ -CN (panel B) que para  $\beta$ -LG (panel A) sobretodo en los tiempos más cortos de irradiación (colores más claros). El análisis de la cinética de la formación de ditirosina mostró que sigue una cinética de primer orden en ambos casos, siendo para  $\beta$ -CN (color azul) más rápida que para  $\beta$ -LG (color rojo) (Tabla 2.1). El análisis cinético demuestra que la formación final de ditirosina es el doble para  $\beta$ -CN que para  $\beta$ -LG (Tabla 2.1).



**Figura 2.3** Cinética de la formación de fluorescencia de ditirosina (410 nm) para  $\beta$ -LG (panel A) y  $\beta$ -CN (panel B). Las proteínas fueron expuestas a diferentes horas de irradiación UV (0-1-3-4-6 hs. Naranja claro al más oscuro). La flecha ascendente describe la formación de ditirosina con una longitud de onda de excitación de 315 nm y de 410 nm en su pico máximo de emisión. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM de experimentos realizados por triplicado. Panel C: Cinética de aparición de ditirosina sometidas a irradiación UV. Gráficos obtenidos de curvas espectrales.  $\beta$ -CN (azul),  $\beta$ -LG (rojo). Gráficos adaptados de trabajo científico publicado: *Oxidative consequences of UV irradiation on isolated milk proteins: effects of hydrogen peroxide and bivalent metal*. Scheidegger D, Larsen G, Kivatinitz S. C. *International Dairy Journal*, 2016

El análisis cinético de la formación de NFK siguió una cinética acorde con un modelo monomolecular de pseudo primer orden, mostrando un tiempo de vida media más lento para  $\beta$ -LG que para  $\beta$ -CN. En relación a la desaparición del Trp (Tabla 2.1) y aparición de NFK se encontró que son distintos para ambas proteínas (3,4 para  $\beta$ -CN y 0,13 para  $\beta$ -LG), sugiriendo que las vías de formación de NFK a partir de Trp son distintas.

	$\beta$ -CN			$\beta$ -LG		
	vida media (hs)	asíntota	$r^2$	vida media (hs)	asíntota	$r^2$
NFK	1.51	$4.4 \times 10^6 \pm 0.4 \times 10^6$	0.97	16.08	$6.6 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$	0.93
DT	4.00	$12.1 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$	0.94	16.08	$6.6 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$	0.95
Trp	5.12	$72 \pm 18$	0.78	2.08	$56 \pm 4$	0.99

**Tabla 2.1** Análisis cinético de la oxidación de aminoácidos de  $\beta$ -CN y  $\beta$ -LG. Las curvas se ajustaron a un modelo monomolecular.

### 2.3 Fragmentación, polimerización y agregación de CN y WPI

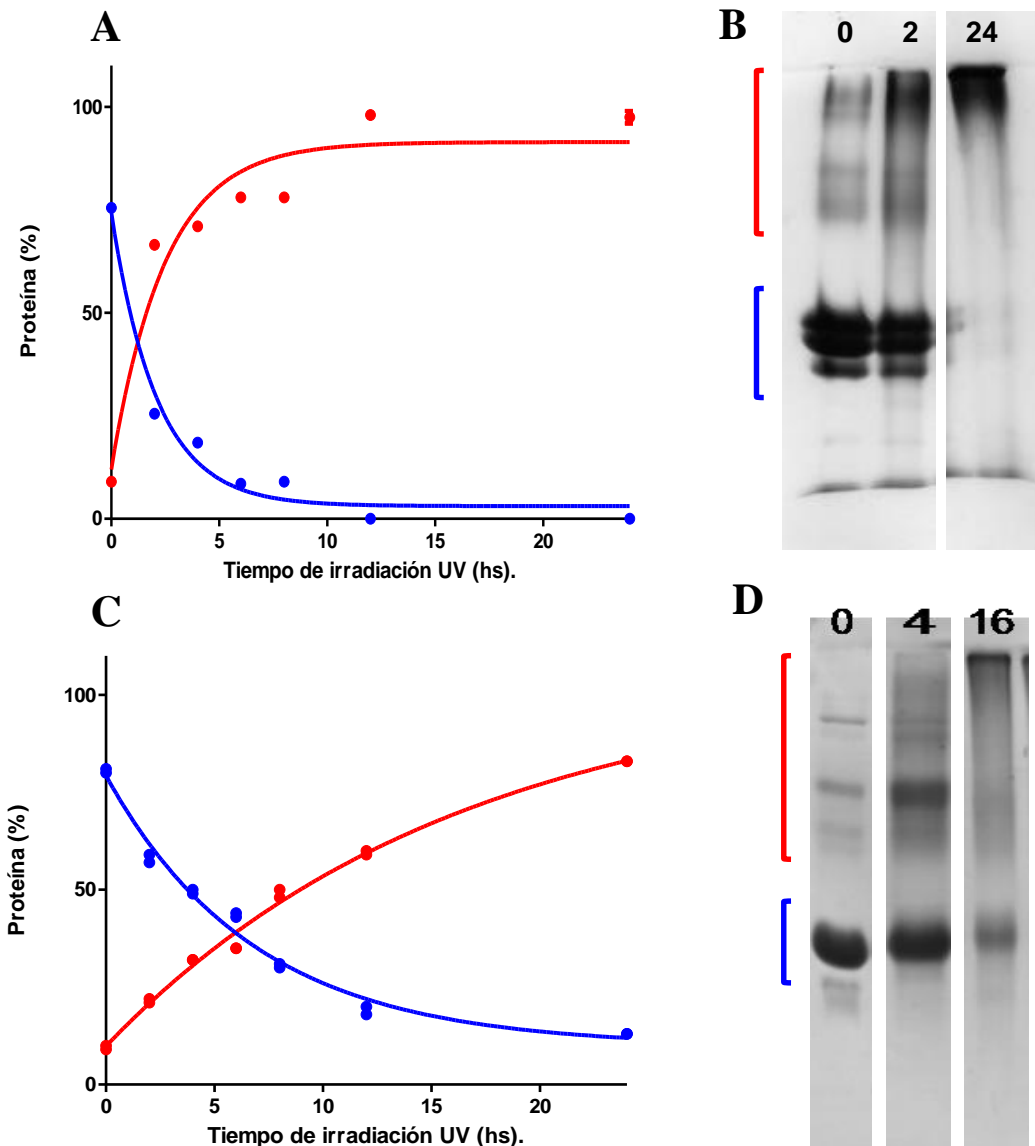
Se estudió la integridad de las proteínas industriales sometidas a períodos crecientes de irradiación ultravioleta para identificar la cinética de fragmentación y de polimerización.

En la Figura 2.4 se observa la cinética de cambio de porcentaje de la proteína nativa en relación al total de bandas observadas (panel A y C). En los paneles panel B y D se muestran como ejemplo imágenes a tiempos seleccionados.

Se observó que la banda correspondiente al peso molecular de la proteína nativa disminuyó con el tiempo de irradiación, tanto para CN como para WPI. Esta disminución siguió una cinética de pseudo primer orden, con un buen ajuste para CN y WPI ( $r^2$  de 0.92 y 0.99 respectivamente).

La disminución en el contenido de la proteína original se correspondió con el aumento de bandas de mayor peso molecular. Después de 24 hs de irradiación en las muestras de CN (panel B) toda la proteína se encontró formando agregados de muy alto peso molecular, esta observación fue similar para WPI a tiempos más cortos.



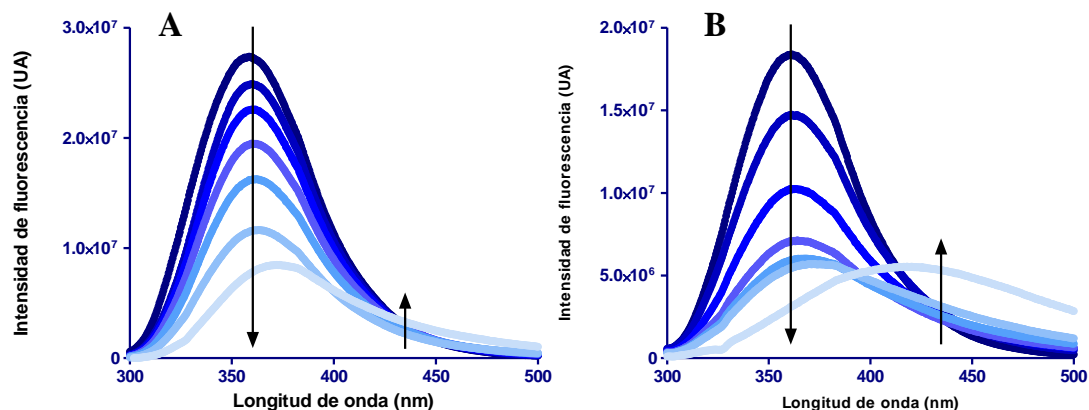


**Figura 2.4** Cinética de proteólisis y de agregación de CN y WPI sometidas a irradiación UV-C. Panel A y C: gráficos obtenidos de geles SDS-PAGE bajo condiciones reductoras (panel B y D). Proteína nativa (azul) y dímero más oligómeros: rojo. CN: panel A y B. WPI: panel C y D. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM de experimentos realizados por triplicado.

## 2.4 Modificaciones en aminoácidos y cambios en la estructura terciaria y cuaternaria de CN Y WPI

Utilizando la técnica de espectroscopía de fluorescencia se determinó la formación de ditirosina, la desaparición de Trp y la aparición de NFK para las proteínas industriales de manera similar a lo que se describió, en la sección 2.1 de este capítulo, para las proteínas puras. En la Figura 2.5 se observa la oxidación del triptófano (360 nm), en función de las horas de irradiación con UV, flecha descendente. También se observa la aparición de su producto de oxidación NFK (máximo de emisión 435nm cuando la luz incidente es de 295 nm) señalado con flechas ascendentes.

Se observó una mayor formación de NFK en CN (panel derecho) que en WPI (panel izquierdo) sobre todo en los tiempos más largos de irradiación (tonos más claros). Se observó también que WPI es más resistente a la destrucción de Trp por UV con un tiempo de vida mayor que CN (Tabla 2.2).



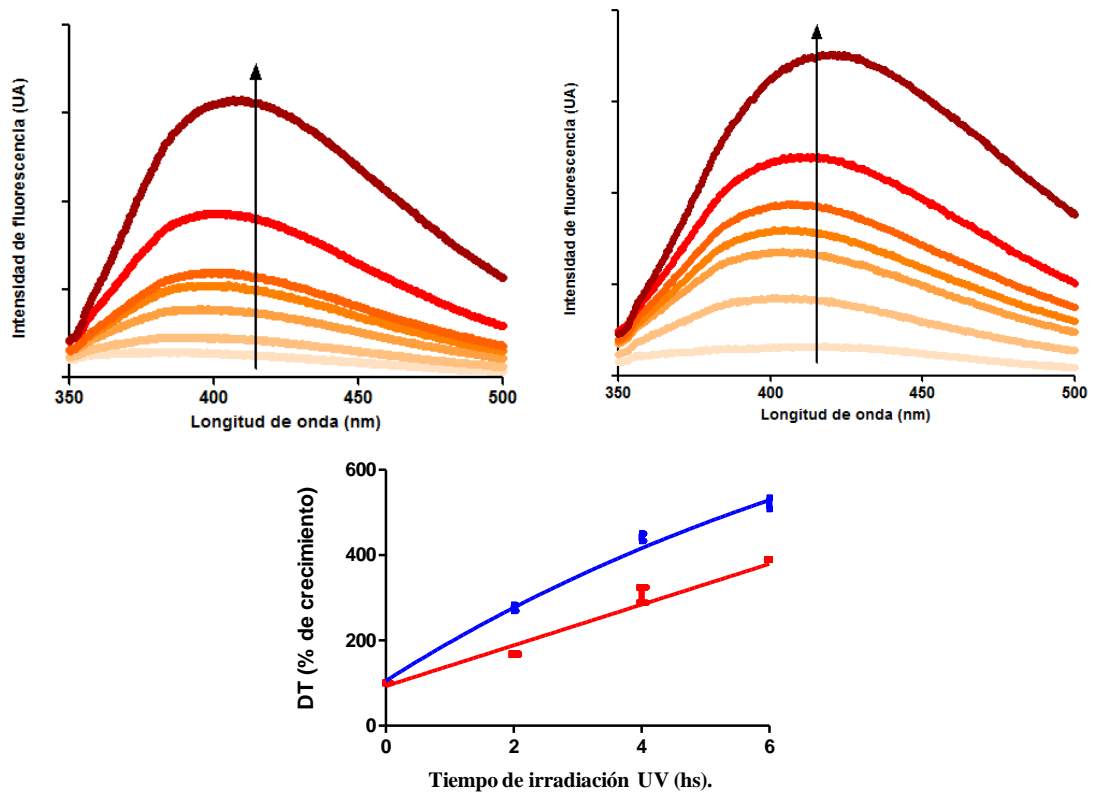
**Figura 2.5** Cinética de decaimiento de la fluorescencia de triptófano para WPI (panel A) y CN (panel B). Las proteínas fueron expuestas a diferentes períodos de irradiación UV (0-1-2-4-6-8-12 y 24 hs. Azul oscuro al más claro). La flecha descendente señala la pérdida de triptófano en su punto máximo de emisión (360 nm) y la flecha ascendente la formación de NFK (435 nm). Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM de experimentos realizados por triplicado.

En la Figura 2.6 se muestran los espectros de fluorescencia de formación de ditirosina (panel A y B) y el análisis cinético de aparición de las mismas (panel C). Se observó que la formación de ditirosina (pico máximo de emisión: 410 nm) fue mayor para CN (panel B) que para WPI (panel A) sobre todo a los tiempos más cortos de irradiación (colores más claros). El análisis de la cinética de la formación de ditirosina mostró que la misma, para CN, sigue una ecuación de primer orden (color azul) y para WPI sigue un modelo de regresión lineal o de orden cero (Tabla 2.2).

	WPI		CN	
NFK	16.2 <sup>(c)</sup>	$5.5 \times 10^6 \pm 0.8 \times 10^6$ <sup>(d)</sup>	$118600 \pm 68$ <sup>(a)</sup>	$21940 \pm 706$ <sup>(b)</sup>
DT	6.7 <sup>(c)</sup>	$1019 \pm 0.76 \times 10^6$ <sup>(d)</sup>	$47.75 \pm 1.7$ <sup>(a)</sup>	$92.94 \pm 11.56$ <sup>(b)</sup>
Trp	3.5 <sup>(c)</sup>	$2.31 \pm 0.55 \times 10^6$ <sup>(d)</sup>	8.64 <sup>(c)</sup>	$3.69 \times 10^6 \pm 0.34 \times 10^6$ <sup>(d)</sup>

**Tabla 2.2** Análisis cinético de la oxidación de aminoácidos de CN y WPI. Las curvas se ajustaron a un modelo regresión lineal: (a) pendiente, (b) ordenada al origen; o a un modelo monomolecular (c) vida media, (d) asíntota. Se muestran los mejores resultados teniendo en cuenta los valores de  $r^2$  y de  $Sy,x$ . El  $r^2$  para el ajuste fue superior 0,98 para todos los casos.

El análisis cinético de la formación de NFK mostró que siguió una cinética acorde con un modelo de regresión lineal.



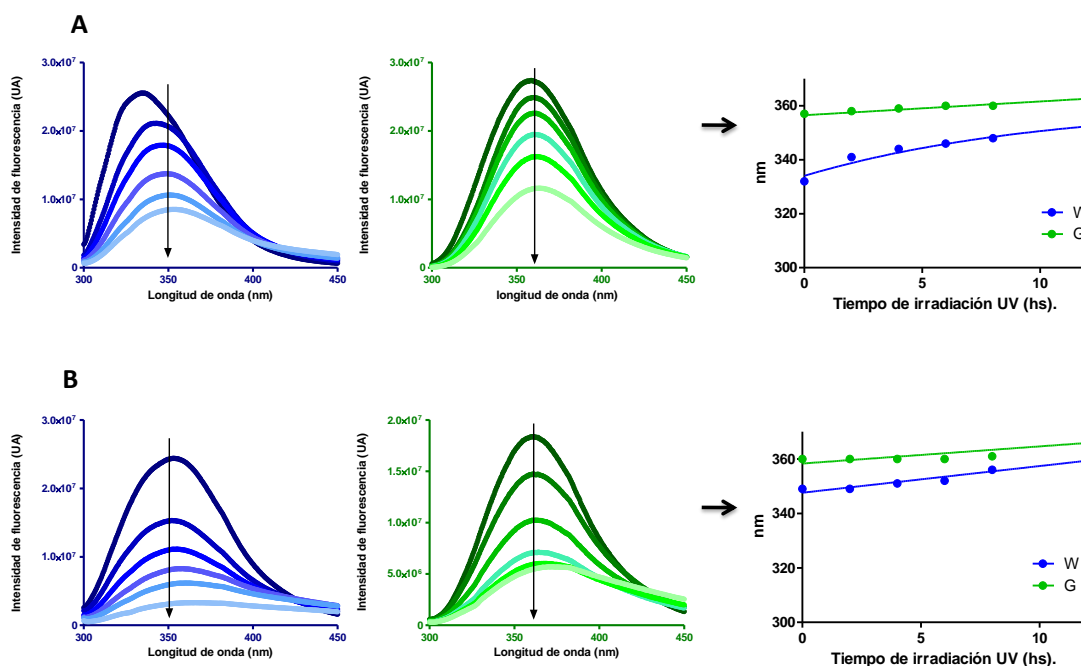
**Figura 2.6** Cinética de de la formación fluorescencia de formación de ditirosina para WPI (panel A) y CN (panel B). Las proteínas fueron expuestas a diferentes horas de irradiación UV (0-1-2-4-6-8-12 y 24 hs. Naranja claro al naranja oscuro). La flecha ascendente describe la formación de ditirosina con una longitud de onda de excitación de 315 nm y de 410 nm en su pico máximo de emisión. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM de experimentos realizados por triplicado. Panel C: cinética de aparición de ditirosina en función del tiempo de irradiación UV. Gráficos fueron obtenidos de curvas espectrales. CN (azul), WPI (rojo).

## 2.5 Mecanismo del cambio estructural de WPI y CN como consecuencia de los cambios oxidativos

Las muestras fueron analizadas por espectrofluorimetría, utilizando el corrimiento espectral del aminoácido triptófano como indicador de un cambio en la constante dieléctrica del solvente que lo rodea. Cuando el Trp se encuentra en un bolsillo hidrofóbico de la proteína sensa un medio ambiente de constante dieléctrica muy inferior que cuando la proteína se despliega y queda expuesto al agua. El máximo de emisión de este aminoácido, cuando es excitado a 295 nm, varía entre 308 a 352 nm dependiendo de la constante dieléctrica. Las mediciones se realizaron en agua destilada y en hidrocloreuro de guanidina, un caotrópico utilizado como desnaturante proteico (Figura 2.7).

Se observó un desplazamiento del máximo de emisión del triptófano de 330 nm a 360 nm cuando las mediciones se realizaron utilizando como disolvente agua y guanidina, respectivamente, para las muestras de WPI (panel A) no irradiadas. A medida que los tiempos de exposición a irradiación uv aumentaron las curvas obtenidas se asemejaron entre sí y a la de control sin irradiar en los experimentos realizados en guanidina.

Por lo tanto se concluye que con el transcurso de irradiación recibida la proteína se desenrolla exponiendo el triptófano a un medio de mayor constante dieléctrica y consecuentemente las curvas fueron similares a las realizadas en guanidina. Con CN (panel B) se obtuvo un resultado similar al descrito para WPI, pero en este caso el corrimiento espectral entre las curvas fue menor. Estas observaciones estarían relacionadas con las diferencias de estructura terciarias de las proteínas nativas: el CN tiene una estructura reomórfica (flexible poco estructurada) mientras que, WPI posee una estructura globular compacta.



**Figura 2.7** Fluorescencia de triptófano de WPI (panel A) y de CN (panel B). Realizadas con agua (azul) y guanidina (verde). Se observa una respuesta espectral diferente del triptófano dependiendo del medio donde sea medido.

## 2.6 Conclusiones

Cuando las proteínas puras y las industriales fueron sometidas a irradiación UV-C se observó disminución de triptófano, aparición de NFK y formación de ditirosina en todos los casos. Las velocidades y niveles de reacción fueron distintos según las proteínas fueran puras o industriales y si eran proteínas séricas o caseinatos. La proporción de agregados y proteólisis fue muy distinta en las proteínas industriales respecto de las puras.

### 2.6.1 Cinética de oxidación. Diferencias entre $\beta$ -LG y WPI

El tiempo de vida media de desaparición de Trp fue cuatro veces más lento para WPI que para  $\beta$ -LG. Es interesante notar que para  $\beta$ -LG sólo uno de los dos Trp fue lábil a la foto-oxidación (56%), mientras que para WPI la desaparición fue casi completa a las 24 hs (14%). La cinética de formación de NFK no se correlacionó con la desaparición del Trp. En la proteína pura se observó la formación de NFK después de una hora y media de irradiación y con un máximo de formación a las 4 hs. Para la proteína industrial se observó una cinética de orden cero sugiriendo que no depende de la concentración de Trp remanente y que se realiza sobre la misma molécula (proceso de autooxidación).

La formación de enlaces ditirosina mostró una velocidad de unión idéntica a la de aparición de NFK para  $\beta$ -LG (16 hs, Tabla 2.1). Para la proteína impura, la cinética también se asemejó a la de NFK, ajustándose a un modelo de orden cero.

La velocidad de desaparición de la proteína nativa fue casi cinco veces más lenta para WPI que para  $\beta$ -LG. El patrón de proteólisis vs. oligomerización fue distinto para WPI y  $\beta$ -LG ya que para WPI se observó que la desaparición de la banda correspondiente a la proteína nativa se correlacionó directamente con la aparición de bandas de mayor peso molecular que forman un color azul esfumado, indicativo de que los péptidos que se liberaron por acción de la proteólisis, se unieron entre sí o con la banda de la proteína nativa para formar distintos agregados con pesos moleculares variables. En cambio para  $\beta$ -LG se observaron agregados de muy alto peso molecular, sin embargo, la mayor cantidad de la proteína no se recuperó en el gel indicando que la proteólisis generó péptidos pequeños que no fueron retenidos en el gel.

### 2.6.2 Cinética de oxidación. Diferencias entre $\beta$ -CN y CN

El tiempo de vida media de desaparición de Trp fue cinco veces más lento para  $\beta$ -CN que para CN. La cinética de formación de NFK no se correlacionó con la desaparición del Trp. En la proteína pura se observó la formación de NFK al tiempo más corto medido de irradiación. Para la proteína industrial se observó la formación de NFK en los tiempos más largos de irradiación. La cinética de formación de NFK fue once veces más lenta para CN que para  $\beta$ -CN, para ambas proteínas la aparición de NFK fue pronta comparada con las proteínas séricas.

La formación de enlaces ditirosina mostró que el tiempo de vida media de formación fue menor para  $\beta$ -CN que para CN. También mostró una velocidad de unión similar a la de aparición de NFK en ambas proteínas, sugiriendo que ambos mecanismos están gobernados por factores similares. En la proteína pura se observó la formación de

ditirosina a tiempos más cortos y para la proteína industrial en los tiempos más largos de irradiación.

La velocidad de desaparición de la proteína nativa fue casi cinco veces más lenta para  $\beta$ -CN que para CN. El patrón de proteólisis vs. oligomerización fue distinto para  $\beta$ -CN que para CN, ya que para CN se observó que la desaparición de la banda correspondiente a la proteína nativa se correlacionó directamente con la aparición de bandas de mayor peso molecular. En cambio para  $\beta$ -CN no se observan agregados de muy alto peso molecular, la mayor cantidad de la proteína no se recupera en el gel indicando que la proteólisis generó péptidos pequeños que no son retenidos por este.

### 2.6.3 Cinética de oxidación. Diferencias entre WPI y CN

El tiempo de vida media de desaparición de Trp fue dos veces y media más lento para WPI que para CN. Para ambas proteínas la desaparición del Trp fue casi completa a las 24 hs. La cinética de formación de NFK no se correlacionó con la desaparición del Trp. Se observó una mayor formación de NFK en CN que para WPI sobre todo en los tiempos más largos de irradiación (24 hs).

La cinética de formación de ditirosina mostró que CN sigue un modelo de primer orden, en cambio WPI un modelo de orden cero. Se observó que la formación de ditirosina fue mayor para CN que para WPI sobre todo a los tiempos más cortos de irradiación.

La velocidad de desaparición de la proteína nativa fue tres veces más lenta para WPI que para CN. Ninguna de las dos fracciones proteicas reflejó la formación de péptidos pequeños en los geles de poliacrilamida.

	$\beta$ -CN	$\beta$ -LG	CN	WPI
Estructura Molecular	Reomórfica	globular	-	-
Peso molecular (kDa)	23.98	18.362	-	-
Tyr (residuos por molécula)	4	4	$\sim 7 < 4 > 12$	$\sim 4$
Trp (residuos por molécula)	1	2	$\sim 6$	$\sim 2$
Pérdida de Trp	0.75	1	0.75	1.50
Formación de DT	rápida	lenta	lenta	rápida
Formación de NFK	baja	baja	baja	baja
Polimerización	cero	baja	alta	alta

**Tabla 2.3** Resultados comparativos para las cuatro muestras

La conclusión principal de estos experimentos indica que las proteínas industriales son menos susceptibles a la foto-oxidación que las puras, sin embargo forman mayor cantidad de compuestos por agregación/polimerización que éstas últimas. Además, estos ensayos sugieren que la movilidad estructural de la proteína influye su ruta de oxidación y que cuanto menos pura es la fracción proteica más resistente es a la fragmentación y permaneciendo más tiempo intacta para poder formar oligómeros y agregados covalentes.

### CAPÍTULO 3. OXIPROTEÓMICA DE LAS PROTEÍNAS LÁCTEAS

La oxiproteómica es la rama de la proteómica utilizada para identificar proteínas oxidadas y determinar el alcance y la ubicación de las modificaciones oxidativas en los proteomas de interés. Esta técnica casi siempre emplea la espectrometría de masas como herramienta principal para lograr la identificación de las proteínas [1].

La proteómica está emergiendo como una herramienta poderosa para la investigación en tecnología de alimentos [2] porque está ayudando a abordar los principales desafíos que enfrentan los analistas e investigadores de alimentos: el desarrollo de metodologías simples y rápidas para el uso rutinario; el análisis de matrices alimentarias complejas o altamente procesadas; y, la cuantificación de niveles traza de analitos con un alto grado de selectividad.

Las nuevas tendencias en metodologías proteómicas para la investigación en tecnología de alimentos, se clasifican en dos temas principales. a: la autenticación de componentes de alimentos, donde la proteómica se utiliza como una herramienta para cumplir con las regulaciones y políticas de etiquetado de alimentos; y, b: el área de tecnología de los alimentos, principalmente en el desarrollo de métodos rápidos y confiables para detectar e identificar el deterioro y/o microorganismos patógenos en los alimentos y en el estudio de los cambios en los componentes de los alimentos como consecuencia del procesamiento de los mismos.

Las modificaciones oxidativas, como la carbonilación, la oxidación del tiol y la hidroxilación aromática, y la glicación de Maillard (la reacción de los azúcares con las cadenas laterales de aminoácidos) son las modificaciones proteicas más frecuentes en los alimentos que se han sometido a procesos térmicos. Sin embargo, también se han descrito las condensaciones y eliminaciones de las cadenas laterales o la degradación de la estructura del péptido [3-4].

Las muestras de esta tesis se analizaron por nano HPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap, lo que permitió el análisis por separación de péptidos obtenidos por digestión de la muestra y posterior identificación de los mismos por MS/MS (ver MATERIALES Y MÉTODOS sección J-K).

Se utilizó esta técnica asociada a la proteómica para obtener la mayor información relativa acerca de:

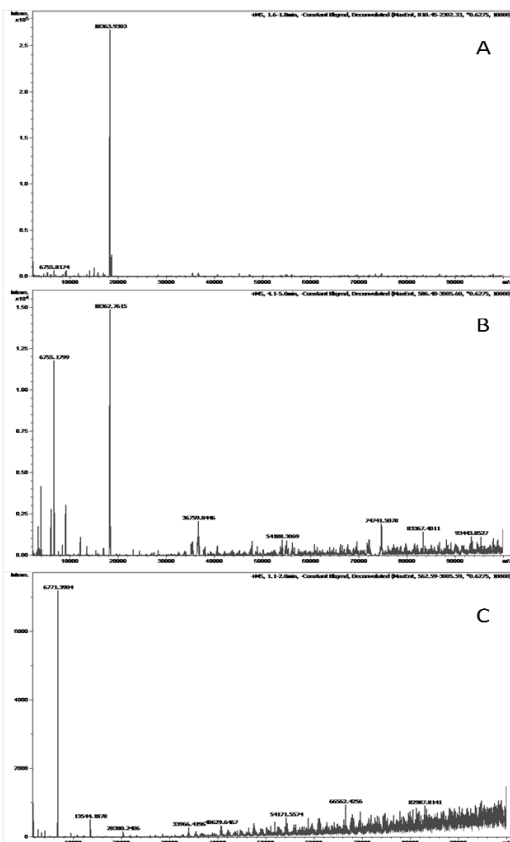
1. La integridad de la proteína nativa, tanto para determinar fragmentación como polimerización y
2. las modificaciones en la secuencia primaria de aminoácidos como consecuencia de las reacciones fotooxidativas en las cadenas laterales.

Los datos informados que corresponden a los péptidos hallados utilizando el software de búsqueda Proteome Discoverer (ver MATERIALES Y METODOS sección J) fueron catalogados manualmente según lo que se quisiera analizar específicamente:

- a) para péptidos fotolíticos se buscaron aquellos fragmentos que tenían un extremo que no correspondiese a un corte tríptico (Lys o Arg).
- b) modificaciones en secuencia primaria, se agruparon todos los péptidos que presentaban al menos una modificación en la fórmula química de aminoácidos específicos seleccionados para la búsqueda: Trp, Tyr, Pro y Met.

### 3.1 Integridad de la proteína nativa

$\beta$ -LG: Se observó que el WPI sin ningún tratamiento, es decir a tiempo cero de irradiación, estaba constituido casi exclusivamente por  $\beta$ -LG nativa con un peso molecular de 18363,93 m/z; también se observó la presencia de péptidos de menor peso molecular, abarcando un rango entre 5 y 12 kDa (Figura 3.1, panel A).



**Figura 3.1** Composición polipeptídica de WPI (panel A) y después de 4 hs (panel B) y 24 hs (panel C) de irradiación UV-C.

Después de 4 hs de irradiación UV-C los péptidos en este rango de pesos moleculares, aumentaron considerablemente. El ion péptido principal  $[H]^+$  m/z de 6755, cuya intensidad aumentó más de cien veces con relación a lo observado a tiempo cero, podría corresponder al péptido Tre6-Gli64. Es interesante notar que también aparecieron los picos correspondientes al dímero, trímero y tetrámero (Figura 3.1, panel B). Luego de 24 hs de irradiación se observó como único pico predominante el de  $[H]^+$  m/z 6771 y una serie de picos con m/z variados y una línea de base que va aumentando a medida que se incrementa el m/z (Figura 3.1, panel C) [5].

CN: a tiempo cero se observó la presencia de dos péptidos principales  $[H]^+$  m/z 24027,15 y  $[H]^+$  m/z 1230,66. Después de 4 hs de irradiación se observó la presencia del monómero y del dímero, y a las 24 hs se observaron múltiples picos de m/z creciente que conformaron una línea de base creciente con las masas moleculares. (Datos no mostrados). Estos resultados indican que la técnica no fue apta para



determinar la composición peptídica de CN ya que el resultado no es compatible con ninguno de los pesos moleculares descriptos para las caseínas)

### 3.2.1 Péptidos fotolíticos identificados en $\beta$ -LG

Se analizó la presencia de péptidos generados por acción de la radiación.  $\beta$ -LG está constituida por 162 aminoácidos y su peso molecular es 18,4 kDa. A tiempo cero se observaron pocos péptidos que correspondieron a la sección del extremo C-terminal, en cambio a las 4 hs se observaron péptidos surgidos por efecto de la foto-oxidación en el extremo N-terminal, destacándose el péptido Ser21-Gli64, los restantes son sub-fragmentos de este péptido. Después de 24 hs de irradiación se observó la presencia de fragmentos del péptido Ser21-Gli64 y de un péptido Tre6-Pro38 (Tabla 3.1).

Proteína	secuencia	aminoácidos	Horas de irradiación		
			0	4	24
$\beta$ -LG	155-162	QLEEQCHI	✓		
	154-162	TQLEEQCHI	✓	✓	
	153-162	PTQLEEQCHI	✓	✓	✓
	151-162	FNPTQLEEQCHI	✓	✓	
	150-162	SFNPTQLEEQCHI	✓	✓	✓
	24-33	MAASDISLLD		✓	
	25-35	AASDISLLDAQ		✓	✓
	24-35	MAASDISLLDAQ		✓	
	21-33	SLAMAASDISLLD		✓	✓
	21-64	SLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEELKPTPEGDLEILLQKWENG		✓	
	148-159	RLSFNPTQLEEQ			✓
	147-159	IRLSFNPTQLEEQ			✓
	47-58	KPTPEGDLEILL			✓
	6-38	TMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAP			✓

**Tabla 3.1** Péptidos de  $\beta$ -LG generados por radiación UV-C. Los aminoácidos se describen con el código de una letra (ver tabla en abreviaturas).

### 3.2.2 Péptidos fotolíticos identificados en $\beta$ -CN

$\beta$ -CN está constituida por 209 aminoácidos y su peso molecular es de 24,9 kDa. Se analizó la presencia de péptidos generados por acción de la radiación. A tiempo cero se observan dos péptidos que se encuentran en el extremo C-terminal. Luego de 4 h de irradiación los péptidos son derivados de ambos extremos de la proteína y a las 24 hs se generaron péptidos que abarcaron el 86% de secuencia primaria.

Esta proteína contiene 35 residuos de aminoácidos Pro, 9 de éstas fueron susceptibles a la fragmentación por acción de la luz UV (Pro 51-75-85-115-158-174-181-186-191) y 26 no lo fueron (Tabla 3.2).

### 3.2.3 Péptidos fotolíticos identificados en $\alpha$ -CN

$\alpha_{s1}$ -CN está constituida por 199 aminoácidos y su peso molecular es de 23,5 kDa, y  $\alpha_{s2}$ -CN por 207 aminoácidos, con un peso molecular de 25,2 kDa. Se analizó la presencia de péptidos generados por acción de la radiación. A tiempo cero no se observaron péptidos en ninguna de las dos proteínas. Luego de 4 hs de irradiación para  $\alpha_{s1}$  se observaron péptidos del aminoácido 1-23 y del 107-137. En cambio para  $\alpha_{s2}$  no se

observó péptido alguno. Después de 24 hs de irradiación para  $\alpha_1$  se generaron péptidos más cercanos al extremo C-terminal, pero para  $\alpha_2$ -CN solo se encontró uno en centro de la proteína, entre Ala62-Gln87 (Tabla 3.2).

tipo de caseína	secuencia	aminoácidos	Horas de irradiación		
			0	4	24
$\beta$ -CN	193-209	YQEPVLGPVRGPFPIIV	✓	✓	
	191-209	LLYQEPVLGPVRGPFPIIV	✓	✓	✓
	01-07	RELEELN		✓	✓
	01-08	RELEELNV		✓	✓
	01-10	RELEELNVPG		✓	✓
	197-209	VLGPVRGPFPIIV		✓	
	196-209	PVLGPVRGPFPIIV		✓	✓
	195-209	EPVLGPVRGPFPIIV		✓	
	194-209	QEPVLGPVRGPFPIIV		✓	✓
	192-209	LYQEPVLGPVRGPFPIIV		✓	
	190-209	FLLYQEPVLGPVRGPFPIIV		✓	
	189-209	AFLLYQEPVLGPVRGPFPIIV		✓	
	186-209	PIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPIIV		✓	
	185-209	MPIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPIIV		✓	
	181-209	PQRDMPIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPIIV		✓	
	01-09	RELEELNVP			✓
	01-11	RELEELNVPGE			✓
	01-14	RELEELNVPGEIVE			✓
	01-16	RELEELNVPGEIVESL			✓
	51-59	PFAQTQSLV			✓
	69-79	SLPQNIPPLTQ			✓
	85-95	PPFLQPEVMGV			✓
	115-123	PVEPFESQ			✓
	158-166	PPQSVLSLS			✓
	158-167	PPQSVLSLSQ			✓
	176-182	KAVPYPQ			✓
	57-68	SLVYPPFGPIP			✓
	53-68	AQTQSLVYPPFGPIP			✓
	51-68	PFAQTQSLVYPPFGPIP			✓
	47-75	DKIHFAQTQSLVYPPFGPIPNSLPQ			✓
	64-98	GPIPNSLPQNIPLTQTPVVPPFLQPEVMGVSKV			✓
	62-98	FPGPIPNSLPQNIPLTQTPVVPPFLQPEVMGVSKV			✓
	86-120	PFLQPEVMGVSKVKEAMAPKHKEMPFKYPVEPFT			✓
	84-106	VPPFLQPEVMGVSKVKEAMAPKH			✓
	75-100	PPLTQTPVVPPFLQPEVMGVSKVKE			✓
	75-106	PPLTQTPVVPPFLQPEVMGVSKVKEAMAPKH			✓
	102-129	MAPKHKEMPFKYPVEPFTESQSLTLTD			✓
	123-134	QSLTLTDVENLH			✓
	115-133	PVEPFESQSLTLTDVENL			✓
	126-160	TLTDVENLHLLPLLSWMLHQPQLPPTVMFPPQ			✓
	202-209	RGPFPIIV			✓
	201-209	VRGPFPIIV			✓
	199-209	GPVRGPFPIIV			✓
174-208	PQKAVPYQRDMPIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPII			✓	
$\alpha_1$ -CN	01-23	RPKHPIKHQGLPQEVNLNLLRF		✓	
	01-20	RPKHPIKHQGLPQEVNLNENL		✓	
	107-137	PQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHAQQKEPMIG		✓	

	135-175	MIGVQNQELAYFYPELFRQFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQYTD	✓
	135-175	MIGVQNQELAYFYPELFRQFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQYTD*	✓
	112-145	VPNSAEERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVQNQELAYF	✓
	124-148	KEGIHAQQKEPMIGVQNQELAYFYPE	✓
$\alpha$ s2-CN	62-87	AEVATEEVKITVDDKHYQKALNEINQ	✓

**Tabla 3.2** Péptidos de CN generados por radiación UV-C. \*oxidado en Met01.

### 3.3 Modificaciones en la secuencia primaria

#### 3.3.1 Oxidación de Triptófano

##### 3.3.1.1 $\beta$ -LG

En WPI se observó a tiempo cero una modificación oxidativa en el Trp19, éste es el primer triptófano del extremo amino terminal, que involucra una oxidación que de un solo electrón en relación al péptido nativo.

Después de las 4 hs de irradiación se observó la aparición de este mismo péptido conteniendo estados oxidativos más avanzados como quinureninas y dioxidaciones (ver sección 4.3 de INTRODUCCIÓN). Es interesante notar que aparecen variaciones de este péptido que difieren en la longitud al contener menos cantidad de aminoácidos (por pérdida de VAG o de V) o con aminoácidos más cercanos al amino terminal. En el capítulo 4 se discutirá los efectos de la radiación sobre la acción de la tripsina. A las 4 hs además de Trp19 se observan modificaciones oxidativas en el Trp61 que aparece incluido en distintos péptidos que se originan desde la Val15 – Lis70.

A 24 hs además de los péptidos ya indicados para las 4 hs se observan variaciones de los mismos que difieren en el grado de oxidación del Trp o en la longitud. Es interesante notar que la mayor variedad de péptidos corresponde a la secuencia amino terminal, destacándose la presencia de péptidos de mayor longitud, algunos de cuales obtienen inclusive el péptido señal. También aparecen péptidos de menor peso molecular que corresponden a fragmentaciones no enzimáticas (Figura 3.2).



### 3.3.1.2 $\beta$ -CN y $\alpha$ -CN

En el preparado de CN que contiene, como hemos visto en el CAPÍTULO 1, principalmente  $\beta$ -CN y  $\alpha$ -CN en sus dos variantes  $\alpha_{s1}$  y  $\alpha_{s2}$ , no se detectaron modificaciones oxidativas en condiciones nativas.

La  $\beta$ -CN mostró ser bastante resistente a la oxidación del único triptofano (Trp143) observándose el primer estado oxidativo después de 24 hs de irradiación. Generando dos péptidos semitrípticos con una fragmentación no enzimática en la Ser adyacente al Trp, o en el Trp (Figura 3.3).

En  $\alpha_{s1}$ -CN se observó a las cuatro horas la formación de un péptido conteniendo el Trp164. Este mismo péptido se observó a las 24 hs con igual y mayor grado de oxidación. Además, se observó un fragmento no tríptico de este mismo péptido (QLDAYPSGAW). No se observó modificación oxidativa en el triptófano más cercano al extremo amino terminal (Trp 199) (Figura 3.3).

La  $\alpha_{s2}$ -CN mostró que el Trp109 fue susceptible a la oxidación, no ocurriendo lo mismo con el Trp193. A las 4 hs se observó la presencia de una familia de péptidos correspondientes a los clivajes trípticos, y un péptido más pequeño que se origina del clivado por irradiación de uno de estos péptidos. A las 24 hs además, de los péptidos ya indicados para las 4 hs se observaron variaciones de los mismos que difieren en el grado de oxidación del Trp o en la longitud, y una mayor variedad de péptidos semitrípticos (Figura 3.3).

Hrs. UV	Mod. Oxidativa/ secuencia primaria	
	$\beta$ -CN	Y P V E P F T E S Q S L T L T D V E N L H L P L P L L Q S W M H Q P H Q P L P P T V M F P P Q S V L S L S Q S K
24h	Oxidación [W2]	
	Oxidación [W30]	Y P V E P F T E S Q S L T L T D V E N L H L P L P L L Q S W M H Q P H Q P L P P T V M F P P Q S V L S L S Q S K
	$\alpha$ -S1	R Q F Y Q L D A Y P S G A W Y Y V P L G T Q Y T D A P S F S D I P N P I G S E N S E K T T M P L W
4H	Oxidación [W13]	Q F Y Q L D A Y P S G A W Y Y V P L G T Q Y T D A P S F S D I P N P I G S E N S E K
24h	Quinurenina [W13]	Q F Y Q L D A Y P S G A W Y Y V P L G T Q Y T D A P S F S D I P N P I G S E N S E K
	Oxidación [W13]	Q L D A Y P S G A W
	$\alpha$ -S2	Q K A L N E I N Q F Y Q K F P Q Y L Q Y L Y Q G P I V L N P W D Q V K R N A V P I T P T L N R E Q L S T S E E N
4H	Quinurenina [W18]	F P Q Y L Q Y L Y Q G P I V L N P W D Q V K R
	Oxidación [W18]	F P Q Y L Q Y L Y Q G P I V L N P W D Q V K R
	Oxidación [W29]	A L N E I N Q F Y Q K F P Q Y L Q Y L Y Q G P I V L N P W D Q V K R
	Oxidación [W29]	A L N E I N Q F Y Q K F P Q Y L Q Y L Y Q G P I V L N P W D Q V K R
	Quinurenina [W29]	A L N E I N Q F Y Q K F P Q Y L Q Y L Y Q G P I V L N P W D Q V K R
	Oxidación [W11]	L Y Q G P I V L N P W D Q V K R
24H	Oxidación [W18]	F P Q Y L Q Y L Y Q G P I V L N P W D Q V K R
	Quinurenina [W18]	F P Q Y L Q Y L Y Q G P I V L N P W D Q V K R
	Dioxidación [W18]	F P Q Y L Q Y L Y Q G P I V L N P W D Q V K R
	Oxidación [W12]	Y L Q Y L Y Q G P I V L N P W D Q V K R
	Quinurenina [W11]	L Y Q G P I V L N P W D Q V K R
	Oxidación [W11]	L Y Q G P I V L N P W D Q V K R
	Dioxidación [W11]	L Y Q G P I V L N P W D Q V K R
	Oxidación [W10]	Y Q G P I V L N P W D Q V K R
	Oxidación [W17]	P Q Y L Q Y L Y Q G P I V L N P W D Q V K R
	Quinurenina [W17]	P Q Y L Q Y L Y Q G P I V L N P W D Q V K R
	Oxidación [W9]	Q G P I V L N P W D Q V K R
	Quinurenina [W7]	P I V L N P W D Q V K R
	Oxidación [W5]	V L N P W D Q V K R

**Figura 3.3** Modificaciones oxidativas del aminoácido triptófano en  $\beta$ -CN y  $\alpha$ -CN. La secuencia primaria de  $\beta$ -CN se encuentra en forma parcial desde el aminoácido Tyr114-Lis129,  $\alpha$ <sub>1</sub>-CN desde Arg151-Trp199, y  $\alpha$ <sub>2</sub>-CN desde Gln79-Asn134 (resaltado en gris). Tiempo de irradiación uv: cero (azul), 4hs (rojo) y 24 hs (verde). Se resalta en amarillo las lisinas (K) y las argininas (R), correspondientes a los sitios de clivado teórico por tripsina.

### **3.3.2 Oxidación en tirosina**

#### **3.3.2.1 Ditirosinas**

La metodología empleada solo permitió el análisis de ditirosinas que están unidas a una hebra de proteína, es decir no de las que están haciendo puente entre dos hebras. Esto fue así ya que no están disponibles en la base de datos (Mascot, Proteome Discoverer, etc.) los iones moleculares que se generarían por entrecruzamiento de tirosinas en dos hebras de proteínas.

Se observó en WPI a tiempo cero una ditirosina en el amino terminal de la proteína (AGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR). No se observó la formación de nuevas ditirosinas por acción de la irradiación.

No se detectó la presencia de este tipo de enlaces en el preparado de CN, a excepción de la Tyr144 de la  $\alpha_1$ -CN después de 24 hs de irradiación.

### **3.3.3 Nitración de tirosina**

#### **3.3.3.1 $\beta$ -LG**

En  $\beta$ -LG se observó un aumento de nitración en tirosina a medida que transcurrió el tiempo de irradiación UV-C (ver mecanismo de formación de nitrotirosina en Figura 3.6 de este mismo capítulo).

A tiempo cero la Tyr42 y Tyr20 se encontraron ya modificadas en el mismo péptido, estos aminoácidos modificados estuvieron presentes en dos péptidos semitrípticos, sugiriendo que la muestra tenía cierto grado de fragmentación originariamente. Luego de 4 hs de irradiación aparecieron variaciones de los péptidos observados a tiempo cero. Después de 24 hs de irradiación la mayoría de los péptidos contenían Tyr nitrada correspondiente a la Tyr20 (Figura 3.4).

Es importante destacar que estas modificaciones se observaron solamente para las tirosinas del extremo N-terminal de la proteína.

Hrs. UV	A L I V T Q T M K G L D I Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R V Y V E E L K P T P E G D L E I L L Q K W E N G E C A Q K K
t'0	G L D I Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R V Y V E E L K P T P E G L D I Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R V Y V E E L K P T P E G
4H	V Y V E E L K P T P E G D L E I L L Q R V Y V E E L K P T P E G D L E I L L Q K W E N G E C A Q V Y V E E L K P T P E G D L E I L L Q K A A S D I S L L D A Q S A P L R V V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R G L D I Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R V Y V T M K G L D I Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R A Q S A P L R V Y V E E L K P T P E G D L E I L L Q K W E N G E C A Q K S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R V Y V E E L K P T P E G D L E I L L Q K
24H	G L D I Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R G L D I Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R V Y V E E L K P T P E G D L E I L L Q K K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R D I Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R S L L D A Q S A P L R V Y V E E L K P T P E G D L E I L L Q K K G L D I Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R M K G L D I Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R V Y V E E L K P A P L R V Y V E E L K P T P E G D L E I L L Q K W E N G E C A Q K Q T M K G L D I Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R V T Q T M K G L D I Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R I V T Q T M K G L D I Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R L I V T Q T M K G L D I Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R A L I V T Q T M K G L D I Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R

**Figura 3.4** Formación de Nitrotirosinas por foto-oxidación en péptidos de  $\beta$ -LG. La secuencia primaria de la  $\beta$ -LG se encuentra en forma parcial desde el aminoácido Leu1-Lis70 (resaltado en gris). Tiempo de irradiación uv: cero (azul), 4hs (rojo) y 24 hs (verde). Se resalta en amarillo las lisinas (K) y las argininas (R), correspondientes a los sitios de clivado teórico por tripsina



### 3.3.3.2 $\beta$ -CN y $\alpha$ -CN

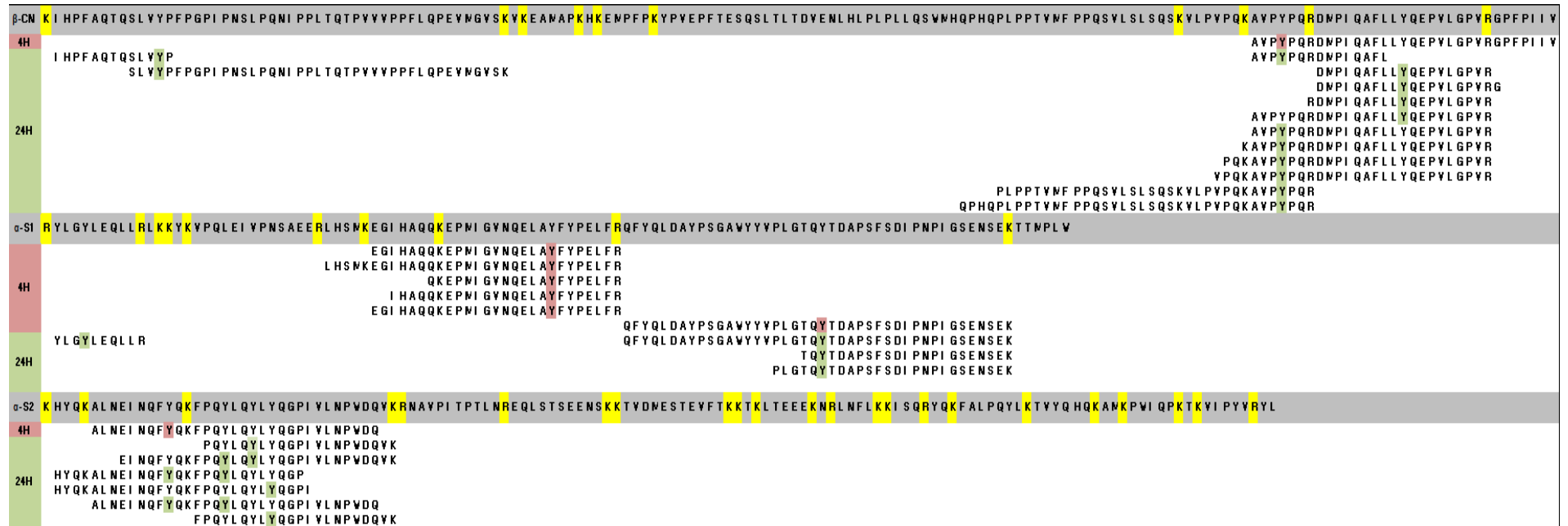
En el preparado de CN no se detectó nitración en condiciones nativas. Después de 4 hs de irradiación la  $\beta$ -CN mostró un solo péptido conteniendo tirosina (Tyr180) nitrada, mientras que luego de 24 hs el número de péptidos aumentó a 13, siete de ellos contuvieron la misma tirosina que a las 4 hs, cuatro contuvieron la Tyr193 y dos de ellos la Tyr60. Se observa que los últimos son péptidos semitripticos. En cambio los péptidos con la Tyr193 nitrada corresponden a la generación de péptidos por acción de la tripsina ligeramente modificada. En el caso de los péptidos que contenían la Tyr180 cinco de los seis péptidos correspondieron a fragmentación semitriptica, que ocurrió en todos los casos en un aminoácido prolina o en un aminoácido vecino inmediato a una prolina (Figura 3.5). Probablemente, esto sería consecuencia de la fragmentación por la acción de la irradiación en sitios expuestos de la proteína que contienen aminoácidos prolina.

Después de 4 hs de irradiación para  $\alpha_{s1}$ -CN se observó una familia de péptidos trípticos (4) y uno semitriptico, todos ellos conteniendo una nitración en la Tyr144, y un péptido tríptico con una nitración en la Tyr173. A las 24 hs se observó el mismo péptido tríptico con la Tyr173 y dos péptidos semitripticos derivados de éste último. También se encontró un péptido tríptico con la Tyr94 nitrada (Figura 3.5).

En  $\alpha_{s2}$ -CN se observó un péptido semitriptico luego de 4 hs de irradiación con la Tyr133 nitrada. A las 24 hs se observa un péptido tríptico con la Tyr100 nitrada, dos péptidos semitripticos conteniendo la Tyr98 o Tyr100 modificadas y tres péptidos semitripticos que contienen más de una tirosina modificada (Tyr89-95-98) (Figura 3.5).

En este caso las nitraciones se observaron solamente para las tirosinas cercanas al extremo C-terminal de la proteína.

Estos rasgos de fragmentación de la secuencia primaria de la proteína, se relacionaran con la estructura terciaria tridimensional y con la generación de péptidos bioactivos antioxidantes de las proteínas en estudio en la sección de discusión de esta tesis.



**Figura 3.5** Formación de Nitrotirosinas por foto-oxidación en péptidos de β-CN y α-CN. La secuencia primaria de β-CN se encuentra en forma parcial desde el aminoácido Lis48- Val209, αS1 -CN desde el aminoácido Arg90-Tre199, y αS2 -CN desde el aminoácido Lis71-Leu207 (resaltado en gris). Tiempo de irradiación UV: cero (azul), 4hs (rojo) y 24 hs (verde). Se resalta en amarillo las lisinas (K) y las argininas (R), correspondientes a los sitios de clivado teórico por tripsina.

### 3.3.4 Oxidación de metionina

#### 3.3.4.1 $\beta$ -LG

En WPI se observó a tiempo cero un péptido con modificaciones oxidativas en la Met 7 y 24, encontrándose al mismo en el extremo amino terminal.

Después de las 4 hs de irradiación se observó la aparición de variaciones de este mismo péptido que difieren en la longitud al contener menor o mayor cantidad de aminoácidos. Además, se observó un péptido más cercano al extremo C-terminal con oxidación en la Met 107.

A 24 hs además de algunos péptidos ya indicados para las 4 hs se observan variaciones de los mismos con las mismas metioninas oxidadas (Tabla 3.3).

Proteína	secuencia	Modificaciones oxidativas en Met	Horas de irradiación		
			0	4	24
<b><math>\beta</math>-LG</b>	1-39	CGA <b>Q</b> ALIVTQ <b>T</b> MKGLDIQ <b>K</b> VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPL	✓		
	1-40	CGA <b>Q</b> ALIVTQ <b>T</b> MKGLDIQ <b>K</b> VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR		✓	
	7-40	<b>M</b> KGLDIQ <b>K</b> VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR		✓	✓
	8-40	<b>K</b> GLDIQ <b>K</b> VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR		✓	✓
	1-8	LIVTQ <b>T</b> MK		✓	
	15-26	VAGTWYSLAMA <b>A</b>		✓	✓
	15-32	VAGTWYSLAMAASDISL <b>L</b>		✓	
	15-33	VAGTWYSLAMAASDISL <b>L</b> D		✓	✓
	15-34	VAGTWYSLAMAASDISL <b>L</b> DA		✓	
	15-35	VAGTWYSLAMAASDISL <b>L</b> DAQ		✓	✓
	17-40	GTWYSLAMAASDISL <b>L</b> DAQSAPLR		✓	✓
	20-40	YSLAMAASDISL <b>L</b> DAQSAPLR		✓	✓
	21-40	SLAMAASDISL <b>L</b> DAQSAPLR		✓	✓
	21-60	SLAMAASDISL <b>L</b> DAQSAPLRVYVEELKPTPEGDLEILLQK		✓	
	22-40	LAMAASDISL <b>L</b> DAQSAPLR		✓	✓
	23-40	AMAASDISL <b>L</b> DAQSAPLR		✓	✓
	24-40	MAASDISL <b>L</b> DAQSAPLR		✓	✓
	106-138	CMENSAEPEQSLACQCLV <b>R</b> TPEVDDEALEKFDK		✓	✓
	15-37	VAGTWYSLAMAASDISL <b>L</b> DAQSA			✓
	1-14	LIVTQ <b>T</b> MKGLDIQ <b>K</b>			✓
	11-40	DIQ <b>K</b> VAGTWYSLAMAASDISL <b>L</b> DAQSAPLR			✓
	5-40	Q <b>T</b> MKGLDIQ <b>K</b> VAGTWYSLAMAASDISL <b>L</b> DAQSAPLR			✓
	6-40	T <b>M</b> KGLDIQ <b>K</b> VAGTWYSLAMAASDISL <b>L</b> DAQSAPLR			✓
	18-40	TWYSLAMAASDISL <b>L</b> DAQSAPLR			✓
	102-126	YLLFCMENSAEPEQSLACQCLV <b>R</b> TP			✓
	107-135	MENSAEPEQSLACQCLV <b>R</b> TPEVDDEALEK			✓
	93-124	LVLDTDYKKYLLFCMENSAEPEQSLACQCLV <b>R</b>			✓

**Tabla 3.3** Péptidos de  $\beta$ -LG con modificaciones oxidativas en el aminoácidos metionina. Marcado en gris el péptido señal. Resaltadas las Met oxidadas en negro.

### 3.3.4.2 $\beta$ -CN

En  $\beta$ -CN se observó a tiempo cero un péptido (Asp184-Val209) con modificaciones oxidativas en la Met 185, éste se encuentra en el extremo carboxilo terminal.

Después de 4 hs de irradiación se observó la aparición del mismo péptido y otro con una variación de éste, el cual difiere en la longitud al contener menor cantidad de aminoácidos. Además, se observaron dos péptidos con la Met156 oxidada y otro grupo de 5 péptidos con la Met 93 oxidada también (Tabla 3.4).

Tipo de Caseína	secuencia	Modificaciones oxidativas en Met	Horas de irradiación		
			0	4	24
$\beta$ -CN	184-209	DMPIQAFLLYQEPVLPVVRGPFPIIV	✓	✓	✓
	184-198	DMPIQAFLLYQEPVL		✓	
	87-97	FLQPEVMGVSK		✓	✓
	86-97	PFLQPEVMGVSK		✓	✓
	85-97	PPFLQPEVMGVSK		✓	✓
	71-99	PQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK		✓	✓
	150-169	PLPPTVMFPPQSVLSLSQSK		✓	
	81-97	PVVVPPFLQPEVMGVSK		✓	
	184-192	DMPIQAFLL			✓
	184-193	DMPIQAFLLY			✓
	184-194	DMPIQAFLLYQ			✓
	184-203	DMPIQAFLLYQEPVLPVVRG			✓
	148-169	HQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK			✓
	88-97	LQPEVMGVSK			✓
	156-169	MFPPQSVLSLSQSK			✓
	144-169	MHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK			✓
	73-97	NIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK			✓
	147-169	PHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK			✓
	76-97	PLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK			✓
	67-99	PNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK			✓
	75-97	PPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK			✓
	152-169	PPTVMFPPQSVLSLSQSK			✓
	71-97	PQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK			✓
	153-169	PTVMFPPQSVLSLSQSK			✓
	81-97	PVVVPPFLQPEVMGVSK			✓
	69-99	SLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK			✓
	142-169	SWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK			✓
	80-97	TPVVVPPFLQPEVMGVSK			✓
	78-97	TQTPVVVPPFLQPEVMGVSK			✓
	154-169	TVMFPPQSVLSLSQSK			✓
	84-97	VPPFLQPEVMGVSK			✓
	82-97	VVVVPPFLQPEVMGVSK			✓

**Tabla 3.4** Péptidos de  $\beta$ -CN con modificaciones oxidativas en el aminoácidos metionina (en negrita).

A 24 hs también se observó el péptido identificado a tiempo cero. Al igual que a las 4 hs se observan variaciones del mismo, siendo en este caso 5 péptidos con modificaciones oxidativas en la Met 185. Se observa un grupo de 7 péptidos de los cuales dos tienen la

Met 144 y la Met 156 oxidadas y los 5 restantes solo la Met 156. También se observaron 16 péptidos con la Met 93 oxidada (Tabla 3.4).

### 3.3.4.3 $\alpha$ -CN

En  $\alpha_{s1}$ -CN se observó a tiempo cero dos péptidos con modificaciones oxidativas en la Met135, éstos se encuentran más cercanos al extremo carboxilo terminal.

Después de 4 hs de irradiación se observó la aparición del mismo péptido y otros dos con variaciones de éste. Además de éstos se observó un péptido que conjuntamente contiene oxidada la Met135 oxidada y la Met123.

A 24 hs también se observó el péptido identificado a tiempo cero. Al igual que a las 4 hs se observan variaciones del mismo, siendo en este caso 5 péptidos con modificaciones oxidativas en la Met135, 2 péptidos en la Met123 y un péptido con las dos metioninas mencionadas anteriormente. Por último, se observó un péptido desde Tre49-Lis58 con la Met54 oxidada (Tabla 3.5).

Para  $\alpha_{s2}$ -CN no se observaron péptidos a tiempo cero. Recién a las 4 hs de irradiación se observaron tres péptidos distribuidos heterogéneamente en la secuencia primaria de la proteína. Uno más cercano al extremo amino terminal (Asn25-Leu35) con la Met26 oxidada, otro de ellos en la mitad de la proteína (Tre138-Lis150) con la Met141 oxidada y el tercero más cercano al extremo carboxilo terminal (Tre182-Lis197) con la Met190 oxidada.

A las 24 hs se observó el mismo patrón en la distribución de los péptidos en la secuencia primaria repitiéndose dos de ellos y con las mismas metioninas oxidadas. También se observaron variaciones de los mismos (Tabla 3.5).

Tipo de Caseína	secuencia	Modificaciones oxidativas en Met	Horas de irradiación		
			0	4	24
<b><math>\alpha</math>-s1</b>	125-151	EGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR	✓	✓	✓
	133-151	EPMIGVNQELAYFYPELFR	✓	✓	
	120-151	LHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR		✓	✓
	125-135	EGIHAQQKEPM			✓
	125-137	EGIHAQQKEPMIG			✓
	118-132	ERLHSMKEGIHAQQK			✓
	120-132	LHSMKEGIHAQQK			✓
	135-151	MIGVNQELAYFYPELFR			✓
	134-151	PMIGVNQELAYFYPELFR			✓
	49-58	TEDQAMEDIK			✓
<b><math>\alpha</math>-s2</b>	25-35	NMAINPSKENL		✓	✓
	138-150	TVDMESTEVFTKK		✓	✓
	182-197	TVYQHQAAMKPWIQPK		✓	
	189-197	AMKPWIQPK			✓
	137-149	KTVDMESTEVEFTK			✓
	137-150	KTVDMESTEVEFTKK			✓
	138-149	TVDMESTEVEFTK			✓

**Tabla 3.5** Péptidos de  $\alpha$ -CN con modificaciones oxidativas en el aminoácidos metionina. Resaltadas las Met oxidadas en negro.

### 3.3.5 Oxidación de prolina

#### 3.3.5.1 $\beta$ -LG

$\beta$ -LG contiene 8 prolinas distribuidas a lo largo de su cadena. A tiempo cero se observaron dos péptidos con prolinas oxidadas, Leu1-Arg40 y Val41-Lis60, el primero conteniendo parte del péptido señal y ambos ubicados en el extremo amino terminal de la proteína (Tabla 3.6).

Luego de 4 hs de irradiación se observó la aparición de variaciones de éstos mismos péptidos conteniendo además diversos estados oxidativos (2-pirrolidona). Se observó una mayor cantidad de péptidos oxidados en el extremo amino terminal que van desde el aminoácido Leu1-Lis70 con las prolinas 38-48 y 50 oxidadas. También se observó un grupo de péptidos más cercanos al extremo carboxilo terminal desde el aminoácido Lis 102-Lis138 con la prolina 113 y 126 oxidadas. Y un solo péptido en el medio de la proteína, Tre76-Lis91, con modificaciones oxidativas en la prolina79 (Tabla 3.6).

A las 24 hs se observó el mismo patrón en la distribución de los péptidos en la secuencia primaria repitiéndose con las mismas prolinas oxidadas. Pero con mayor cantidad de variaciones de los mismos (Tabla 3.6).

Proteína	secuencia	Modificaciones oxidativas en Pro	Horas de irradiación		
			0	4	24
$\beta$ -LG	1-40	CGAQUALIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR	✓		
	41-60	VYVEELKPTPEGDLEILLQK	✓	✓	✓
	25-40	AASDISLLDAQSAPLR		✓	✓
	25-60	AASDISLLDAQSAPLRVYVEELKPTPEGDLEILLQK*		✓	✓
	106-138	CMENSAEPEQSLACQCLVRTPEVDDEALEKFDK		✓	✓
	108-138	ENSAEPEQSLACQCLVRTPEVDDEALEKFDK		✓	
	114-135	EQSLACQCLVRTPEVDDEALEK		✓	✓
	9-43	GLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYV		✓	
	149-162	LSFNPTQLEEQCHI		✓	
	50-60	PEGDLEILLQK		✓	✓
	113-138	PEQSLACQCLVRTPEVDDEALEKFDK		✓	
	126-138	PEVDDEALEKFDK		✓	✓
	48-60	PTPEGDLEILLQK		✓	
	35-60	QSAPLRVYVEELKPTPEGDLEILLQK		✓	
	40-60	RVYVEELKPTPEGDLEILLQK		✓	✓
	40-69	RVYVEELKPTPEGDLEILLQKWENGECAQK		✓	✓
	21-60	SLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEELKPTPEGDLEILLQK		✓	
	76-91	TKIPAVFKIDALNENK		✓	✓
	49-70	TPEGDLEILLQKWENGECAQKK		✓	
	135-138	TPEVDDEALEKFDK		✓	✓
	15-51	VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEELKPTPE		✓	
	15-52	VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEELKPTPEG		✓	
	41-70	VYVEELKPTPEGDLEILLQKWENGECAQK		✓	✓
	41-71	VYVEELKPTPEGDLEILLQKWENGECAQKK		✓	✓
	102-126	YLLFCMENSAEPEQSLACQCLVRTP		✓	
	20-60	YSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEELKPTPEGDLEILLQK		✓	
	40-71	YVEELKPTPEGDLEILLQKWENGECAQKK		✓	
	34-60	AQSAPLRVYVEELKPTPEGDLEILLQK			✓

44-60	EELKPTPEGDLEILLQK	✓
112-138	EPEQSLACQCLVRTPEVDDEALEKFDK	✓
9-41	GLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRV	✓
9-52	GLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEELKPTPEG	✓
78-91	IPAVFKIDALNENK	✓
47-60	<b>KPTPEGDLEILLQK</b>	✓
39-60	LRVYVEEL <b>KPTPEGDLEILLQK</b>	✓
39-69	LRVYVEEL <b>KPTPEGDLEILLQK</b> WENGECQK*	✓
93-124	LVLDTDYKKYLLFCMENSAEPEQSLACQCLVR	✓
107-135	MENSAE <b>PEQSLACQCLVRTPEVDDEALEK</b>	✓
7-40	MKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR	✓
113-138	PEQSLACQCLVRTPEVDDEALEKFDK	✓
48-60	<b>PTPEGDLEILLQK</b>	✓
120-138	QCLVRTPEVDDEALEKFDK	✓
116-138	SLACQCLVRTPEVDDEALEKFDK	✓
21-60	SLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEEL <b>KPTPEGDLEILLQK</b>	✓
30-60	SLLDASAPLRVYVEEL <b>KPTPEGDLEILLQK</b> *	✓
125-135	TPEVDDEALEK	✓
15-48	VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEEL <b>KP</b>	✓
15-56	VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEEL <b>KPTPEGDLEI</b>	✓
43-60	VEEL <b>KPTPEGDLEILLQK</b>	✓
41-61	VYVEEL <b>KPTPEGDLEILLQKW</b>	✓
41-65	VYVEEL <b>KPTPEGDLEILLQKWENGE</b>	✓

**Tabla 3.6** Péptidos de  $\beta$ -LG con modificaciones oxidativas en el aminoácido prolina. Letras resaltadas color gris corresponden al péptido señal. \* Péptidos que presentan diferentes variaciones oxidativas.

### 3.3.5.2 $\beta$ -CN

$\beta$ -CN contiene 35 prolinas distribuidas a lo largo de su cadena. A tiempo cero se observaron 3 péptidos con prolinas oxidadas, Asp184-Gli203, Met144-Lis169 y Ser69-Lis97, distribuidos heterogeneamente en la proteína (Tabla 3.7).

Luego de 4 hs de irradiación se observó la aparición de variaciones de éstos mismos péptidos sobre todo cercano a los dos extremos amino y carboxilo terminal. Cercanos al carboxilo terminal se observaron modificaciones oxidativas en las prolinas 179-181-186-196 y 200 conteniendo además diversos estados oxidativos (2-pirrolidona). Para los péptidos más cercanos al extremo amino terminal se observaron sobretodo más oxidaciones en las prolinas 76-81-85-86 y 90 (Tabla 3.7).

A las 24 hs se observó el mismo patrón que a las 4 hs en la distribución de los péptidos en la secuencia primaria repitiéndose las oxidaciones en las mismas prolinas oxidadas. Pero con mayor cantidad de variaciones de los mismos. Además se observó la aparición de nuevos péptidos ubicados entre los dos grupos de péptidos formados a las 4 hs con las prolinas 110-112-115-118-138-147-150-125-123-158 y 159 oxidadas (Tabla 3.7).

Tipo de Caseína	secuencia	Modificaciones oxidativas en Pro	Horas de irradiación		
			0	4	24
<b>β-CN</b>	184-203	DMPIQAFLLYQEPVLPVVRG*	✓	✓	✓
	144-169	MHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK	✓		
	69-97	SLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK*	✓	✓	
	177-209	AVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLPVVRGPFPIIV*		✓	
	184-209	DMPIQAFLLYQEPVLPVVRGPFPIIV		✓	
	108-149	EMPFKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQ		✓	✓
	64-105	GPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVKEAMAPK		✓	
	30-69	IEKFQSEEQQTDELDQKIHPFAQTQSLVYPPFGPIPNS		✓	
	176-202	KAVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLPVVR*		✓	✓
	151-183	LPPTVMFPPQSVLSLSQSKVLPVPQKAVPYPQR		✓	
	61-97	PPFGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK*		✓	✓
	65-105	PIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVKEAMAPK		✓	✓
	75-97	PPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK*		✓	✓
	71-99	PQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK*		✓	✓
	71-105	PQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVKEAMAPK		✓	✓
	196-209	PVLGPVVRGPFPIIV		✓	
	183-202	RDMPIQAFLLYQEPVLPVVR		✓	
	183-209	RDMPIQAFLLYQEPVLPVVRGPFPIIV		✓	
	69-99	SLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK		✓	
	57-97	SLVYPPFGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK		✓	
	59-99	VYPPFGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK		✓	
	117-191	AVPYPQRDMPIQAFLL			✓
	117-203	AVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLPVVR*			✓
	184-202	DMPIQAFLLYQEPVLPVVR*			✓
	181-204	DMPIQAFLLYQEPVLPVVRGP			✓
	62-97	FPGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK			✓
	33-72	FQSEEQQTDELDQKIHPFAQTQSLVYPPFGPIPNSLPQ			✓
	64-97	GPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK			✓
	106-119	HKEMPFKYPVEPF			✓
	106-120	HKEMPFKYPVEPFT			✓
	106-125	HKEMPFKYPVEPFTESQSL			✓
	106-129	HKEMPFKYPVEPFTESQSLTLTD			✓
	106-135	HKEMPFKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHL			✓
	106-138	HKEMPFKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLP			✓
	106-140	HKEMPFKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLPLL			✓
	145-169	HQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK*			✓
	49-61	IHPFAQTQSLVYP			✓
	49-68	IHPFAQTQSLVYPPFGPIPNSLPQ			✓
	49-71	IHPFAQTQSLVYPPFGPIPNSLPQ			✓
	66-97	IPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK*			✓
	74-97	IPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK			✓
	169-183	KVLPVPQKAVPYPQR			✓
1-28	LAACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK			✓	
191-202	LLYQEPVLPVVR			✓	
87-97	LQPEVMGVSK			✓	
58-99	LVYPPFGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK			✓	
144-169	MHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK			✓	
73-97	NIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK			✓	
68-97	NSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK			✓	
63-97	PGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK*			✓	



147-169	PHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK	✓
65-97	PIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK	✓
138-169	PLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK	✓
150-169	PLPPTVMFPPQSVLSLSQSK	✓
150-183	PLPPTVMFPPQSVLSLSQSKVLPVPQKAVPYPQR	✓
76-97	PLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK*	✓
67-97	PNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK*	✓
67-99	PNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK*	✓
67-105	PNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVKEAMAPK	✓
85-97	PPFLQPEVMGVSK	✓
75-97	PPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK*	✓
75-105	PPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVKEAMAPK*	✓
158-169	PPQSVLSLSQSK	✓
152-169	PPTVMFPPQSVLSLSQSK	✓
174-202	PQKAVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLPVVR*	✓
71-97	PQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK*	✓
181-202	PQRDMPIQAFLLYQEPVLPVVR	✓
159-169	PQSVLSLSQSK	✓
153-169	PTVMFPPQSVLSLSQSK	✓
81-97	PVVVPPFLQPEVMGVSK	✓
72-97	QNIPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK	✓
146-183	QPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSKVLPVPQKAVPYPQR	✓
149-169	QPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK*	✓
69-97	SLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK*	✓
69-99	SLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK	✓
69-105	SLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVKEAMAPK	✓
164-183	SLSQSKVLPVPQKAVPYPQR	✓
57-97	SLVYFPFGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK	✓
55-99	TQSLVYFPFGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK*	✓
78-97	TQTPVVVPPFLQPEVMGVSK	✓
170-183	VLPVPQKAVPYPQR	✓
173-202	VPQKAVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLPVVR*	✓
178-202	VPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLPVVR	✓
57-97	VYFPFGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK	✓
57-99	VYFPFGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVK	✓

**Tabla 3.7** Péptidos de  $\beta$ -CN con modificaciones oxidativas en el aminoácido prolina. \* Péptidos que presentan diferentes variaciones oxidativas.

### 3.3.5.3 $\alpha$ -CN

En  $\alpha$ <sub>1</sub>-CN se observó a tiempo cero un péptido Gln152-Lis193, el cual se encuentra cercano al extremo carboxilo terminal (Tabla 3.8).

Después de 4 hs de irradiación se observó la aparición del mismo péptido de tiempo cero. También se observó un grupo de 4 péptidos oxidados desde Leu120-Arg151 con la prolina 134 y 147 oxidadas. Además se observó un grupo de 9 péptidos cercanos al extremo amino terminal con la prolina 5 oxidada (Tabla 3.8).

A 24 hs también se observó el péptido identificado a tiempo cero. Y a diferencia de las 4 hs en este caso si se observaron variaciones del mismo, observando 10 péptidos con modificaciones oxidativas entre la Pro177 y 185. También se observó un grupo de tres péptidos entre Glu133-Arg151 con las prolinas 134 y 147 oxidadas y dos péptidos en el

centro de la secuencia (His80-Arg90 y Val86-Arg100) con la prolina 87 oxidada. Por último se observó un grupo de 14 péptidos cercanos al amino terminal con las prolinas 12, 27 y 29 oxidadas (Tabla 3.8).

Para  $\alpha_2$ -CN no se observaron péptidos a tiempo cero. Recién después de 4 hs de irradiación se observaron tres péptidos situados en el centro de la secuencia primaria de la proteína. Con las prolinas 93-103 y 108 oxidadas (Tabla 3.8).

A las 24 hs se observó variaciones de los péptidos observados a las 4 hs con un grupo de 15 péptidos con las prolinas, además de las mencionadas a las 4 hs, 118 y 121 oxidadas. Además, se observaron dos péptidos cercanos al extremo carboxilo terminal, Fen174-Lis181 y Fen174-Pro196, con la prolina 177 oxidada para el primer péptido y 192 y 196 para el segundo péptido (Tabla 3.8).

Tipo de Caseína	secuencia	Modificaciones oxidativas en Pro	Horas de irradiación		
			0	4	24
$\alpha$ -s1	152-193	QFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEK*	✓	✓	✓
	1-22	ALARPKHPIKHQGLPQEVLENLLR*		✓	✓
	1-22	ARPKHPIKHQGLPQEVLENLLR*		✓	✓
	125-151	EGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR*		✓	✓
	23-34	FFVAPFPEVFGK*		✓	✓
	23-36	FFVAPFPEVFGKEK		✓	
	4-22	HPIKHQGLPQEVLENLLR*		✓	✓
	132-151	KEPMIGVNQELAYFYPELFR		✓	
	3-22	KHPIKHQGLPQEVLENLLR*		✓	✓
	1-22	LARPKHPIKHQGLPQEVLENLLR*		✓	
	120-151	LHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR*		✓	✓
	131-151	QKEPMIGVNQELAYFYPELFR		✓	
	1-22	RPKHPIKHQGLPQEVLENLLR*		✓	✓
	1-22	VALARPKHPIKHQGLPQEVLENLLR		✓	
	18-34	ENLLRFFVAPFPEVFGK			✓
	133-149	EPMIGVNQELAYFYPEL			✓
	133-151	EPMIGVNQELAYFYPELFR			✓
	23-37	FFVAPFPEVFGKEKV			✓
	10-34	GLPQEVLENLLRFFVAPFPEVFGK			✓
	80-90	HIQKEDVP SER			✓
	4-28	HPIKHQGLPQEVLENLLRFFVAPF			✓
	8-22	HQGLPQEVLENLLR			✓
	8-32	HQGLPQEVLENLLRFFVAPFPEVF			✓
	8-33	HQGLPQEVLENLLRFFVAPFPEVFG			✓
	182-193	IPNPIGSENSEK			✓
	7-22	KHQGLPQEVLENLLR*			✓
	7-34	KHQGLPQEVLENLLRFFVAPFPEVFGK			✓
	169-193	LGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEK			✓
	11-22	LPQEVLENLLR			✓
	5-22	PIKHQGLPQEVLENLLR*			✓
	2-22	PKHPIKHQGLPQEVLENLLR			✓
	168-193	PLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEK*			✓
	134-151	PMIGVNQELAYFYPELFR			✓
	183-193	PNPIGSENSEK			✓
12-22	PQEVLENLLR			✓	
177-193	PSFSDIPNPIGSENSEK			✓	

	9-22	QGLPQEVLENLLR		✓
	180-193	SDIPNPIGSENSEK		✓
	174-193	TDAPSFSDIPNPIGSENSEK		✓
	171-193	TQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEK		✓
	25-34	VAPFPEVFGK		✓
	167-193	VPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEK		✓
	86-100	VPSEYLGYLEQLLR		✓
	166-193	YVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEK		✓
	165-193	YYVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEK*		✓
<b><math>\alpha</math>-s2</b>	81-111	ALNEINQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLNPWDQ	✓	✓
	81-113	ALNEINQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVK	✓	
	81-114	ALNEINQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVKR	✓	
	81-103	ALNEINQFYQKFPQYLQYLYQGP		✓
	84-113	EINQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVK		✓
	84-114	EINQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVKR		✓
	174-181	FALPQYLK		✓
	174-196	FALPQYLKTVYQHQAAMKQWVQP		✓
	92-113	FPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVK*		✓
	92-114	FPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVKR		✓
	77-104	HYQKALNEINQFYQKFPQYLQYLYQGPI		✓
	91-113	KFPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVK		✓
	99-113	LYQGPIVLNPWDQVK*		✓
	115-125	NAVPIPTLNR		✓
	118-125	PITPTLNR		✓
	93-113	PQYLQYLYQGPIVLNPWDQVK		✓
	121-136	PTLNREQLSTSEENSK		✓
	102-126	QGPIVLNPWDQVKRNAVPIPTLNR		✓
	115-126	RNAVPIPTLNR		✓
		98-113	YLQYLYQGPIVLNPWDQVK	

**Tabla 3.8** Péptidos de  $\alpha$ -CN con modificaciones oxidativas en el aminoácido prolina. \* Péptidos que presentan diferentes variaciones oxidativas. Letras resaltadas color gris corresponden al péptido señal.

### 3.4 Conclusiones

#### 3.4.1 integridad de la proteína nativa

La técnica de espectroscopia de masas (microTOFQ II (Bruker)) nos permitió corroborar la integridad de la  $\beta$ -LG presente en WPI. Sin embargo, no resultó ser apropiada para CN. El análisis por HPLC acoplado a un MS/MS fue apto para estudiar las alteraciones en la secuencia primaria, tanto de CN como de WPI. Esta diferencia muy probablemente se deba a que en la segunda las proteínas son sometidas a una proteólisis enzimática con tripsina y que el análisis se realiza sobre los fragmentos así generados.

Se pudo observar que las muestras antes de ser sometidas a irradiación (tiempo cero) contenían oxidaciones:

WPI: cisteínas, ditirosina (mencionada en el punto 2.3.1), una metionina, nitrotirosina y lisinas del segmento amino terminal.

$\beta$ -CN: metionina, prolina, treonina, y arginina cerca del extremo carboxilo terminal.

$\alpha$ s1-CN: metionina, prolina y treonina cerca del extremo carboxilo terminal.

$\alpha$ s2-CN: cisteína y metionina cerca del extremo amino terminal.

### 3.4.2 Péptidos fotolíticos

La oxiproteómica demostró que en ambos preparados se generaron péptidos por fotólisis, es decir por acción de la irradiación UV-C. Fue interesante observar en la Tabla 3.1 que el preparado contenía péptidos a tiempo cero correspondientes al extremo C-terminal, todos ellos con cortes entre los aminoácidos 150 y 155 que podrían haber sido causa del procesamiento industrial [6]. Algo similar se observó para CN que presentó dos fragmentos a tiempo cero correspondientes al extremo C-terminal (Tabla 3.2).

Después de 4 hs de irradiación todas las proteínas analizadas mostraron fragmentación, y por lo tanto, generación de péptidos. El más corto para  $\beta$ -LG fue de 9 aminoácidos (TQLEEQCHI) y el más largo contenía 44 aminoácidos (SLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEELKPTPEGDLEILLQKWENG).

Los más cortos generados por la ruptura de  $\beta$ -CN contuvieron 7 aminoácidos (RELEELN y KAVPYPQ) y el más largo 29 aminoácidos (PQRDMPIQAFLLYQEPVLPVIRGPFPIIV).

$\alpha$ s1-CN no se fraccionó en péptidos pequeños, el más corto tuvo 20 aminoácidos (RPKHPIKHQGLPQEVLENL) y el más largo 31 aminoácidos (PQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHAQQKEPMIG).

$\alpha$ s2-CN resultó menos susceptible a la fragmentación fotolítica ya que a las 24 hrs solo se encontró un péptido de 26 aminoácidos (AEVATEEVKITVDDKHYQKALNEINQ).

Después de 24 hs de irradiación se generaron nuevos péptidos y algunos de los observados a 4 hs no fueron detectados.

### 3.4.3 Oxidación de aminoácidos aromáticos

Cuando se analizaron los cambios en la oxidación de aminoácidos, se observó claramente que la cantidad de aminoácidos oxidados fue en aumento con las horas de irradiación.

#### 3.4.3.1 triptófano

En WPI, como ya se indicó antes, el triptófano 19, a t<sub>0</sub> presentó oxidaciones en alguna proporción, ya que se encontraron péptidos que tenían modificaciones en este triptófano y otros que no lo tenían; a tiempos mayores se observó el aumento de la proporción de péptidos que contenían este aminoácido oxidado, indicando el aumento de moléculas de WPI oxidadas en este aminoácido (Figura 3.2). Es decir, que los dos triptófano se oxidaron, siendo el triptófano del amino terminal el más susceptible a la oxidación.

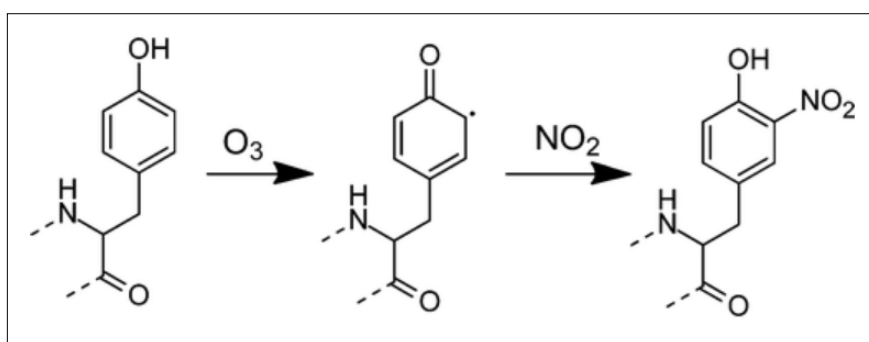
En  $\beta$ -CN se observó la oxidación del único triptófano (Trp143) después de 24hs de irradiación. Es interesante que en ese triptófano o en el aminoácido adyacente, a las 24hs, se produjo un corte fotolítico generando sendos péptidos (Figura 3.3).

$\alpha$ s1-CN y  $\alpha$ s2-CN contienen dos triptófano cada una pero solo se oxidó uno en cada una de las proteínas (Trp164 y Trp109 respectivamente).  $\alpha$ s2 generó más variaciones de péptidos con diferentes estados de oxidación (Figura 3.3).

### 3.4.3.2 Nitrotirosina

En los últimos años se han reportado varios trabajos que explican la oxidación de proteínas como consecuencia de la presencia de ozono, dióxido de carbono y dióxido de nitrógeno en la atmósfera [7-9]. El modelo experimental de la presente tesis utiliza la irradiación UV-C en presencia de atmósfera; esto junto con los datos experimentales de anomalías en la cuantificación de las proteínas irradiadas (ver próximo capítulo), nos condujo a averiguar si el contenido relativo de nitrógeno aumentó por efecto de la irradiación en algunas de las proteínas.

En el modelo experimental utilizado en esta tesis el ozono se produce como consecuencia de la fuerte irradiación UV (ver MATERIALES Y METODOS) [10] [11] [12]. El mecanismo descrito es el que se muestra en la Figura 3.6.



**Figura 3.6** Mecanismo de formación de nitrotirosina en presencia de ozono [11].

En WPI se pudieron observar dos péptidos que provenían con dos tirosinas nitradas (Tir42 y Tir20), y luego a medida que transcurrieron las horas de irradiación se pudieron observar variaciones de los mismos. Es interesante destacar que, solo se oxidaron dos de las cuatro tirosinas que tiene la proteína, las cuales se ubican en el extremo N-terminal (Figura 3.4).

En  $\beta$ -CN después de 4 hs de irradiación, se observó que una de las 4 tirosinas (Tir180) se nitró; después de 24 hs otras dos tirosinas (Tir60 y Tir193) se nitraron, no se observó nitración en Tir114.

$\alpha$ <sub>s1</sub>-CN contiene 10 tirosinas, de las cuales 3 fueron nitradas (Tyr94, Tyr144 y Tyr173). La Tir144 fue la más susceptible a la nitración, ya que fue la única después de 4 hs de irradiación que incorporó un grupo nitro (Figura 3.5).

$\alpha$ <sub>s2</sub>-CN contiene 11 tirosinas de las cuales 4 fueron nitradas (Tyr89, Tyr 95, Tyr 98 y Tyr 100). La Tir89 fue la más susceptible a la nitración ya que fue la única después de 4 hs de irradiación que incorporó un grupo, y las otras tres sufrieron la modificación después de las 24 hs de irradiación.

### 3.4.3.3 metionias

$\beta$ -LG contiene 4 metioninas en su secuencia primaria. Se pudo observar un péptido que provenía en condiciones nativas con dos metioninas oxidadas (Met7 y Met24). Después de 4hs de irradiación, se observó Met 107 oxidada. A las 24 hs se observó oxidación en las mismas metioninas, por lo tanto la Met145 resultó ser resistente a la oxidación.

$\beta$ -CN contiene 6 metioninas en su secuencia primaria, de las cuales 4 fueron oxidadas. A tiempo cero la proteína ya contenía una metionina oxidada (Met185) y a las 4hs de irradiación se observó las Met156 y Met93 oxidadas. La Met144 se observó modificada, solo después de las 24 hs de irradiación, mientras que la Met102 y Met109 resultaron resistentes a la oxidación.

$\alpha$ <sub>s1</sub>-CN contiene 5 metioninas en su secuencia primaria, de las cuales 3 solo fueron oxidadas. A tiempo cero la proteína ya contenía una Met oxidada (Met135). Después de las 4hs de irradiación se observó la Met123 oxidada y a las 24 hs la Met54, mientras que las Met60 y Met196 resultaron resistentes a la oxidación.

$\alpha$ <sub>s2</sub>-CN contiene 4 metioninas en su secuencia primaria. Después de las 4hs de irradiación se observó 3 metioninas oxidadas (Met26, Met141 y Met190), repitiéndose las mismas a las 24 hs, mientras que la Met4 resulto ser resistente a la oxidación.

### 3.4.3.4 Prolina

El análisis de la oxidación de prolina mostró en  $\beta$ -LG que una sola de las 8 fue resistente a la fotooxidación (Pro144).

La proteína en estudio con mayor cantidad de prolinas es la  $\beta$ -CN (35 prolinas), solo dos de estas fueron resistentes a la oxidación a las 4hs (Pro172 y Pro174). Después de 24 hs de irradiación todas fueron oxidadas.

$\alpha$ <sub>s1</sub>-CN tiene 17 prolinas en su estructura primaria y 4 de éstas fueron resistentes a la oxidación (Pro73, Pro107, Pro113 y Pro197) y  $\alpha$ <sub>s2</sub>-CN tiene 10 prolinas en su estructura primaria y dos de las mismas fueron resistentes a la oxidación (Pro30 y Pro202).

## Bibliografía

1. Butterfield, D.A. and M. Perluigi, *Redox proteomics: a key tool for new insights into protein modification with relevance to disease*. 2017, Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA.
2. Ortea, I., et al., *Food authentication of commercially-relevant shrimp and prawn species: From classical methods to Foodomics*. *Electrophoresis*, 2012. **33**(15): p. 2201-2211.
3. Pischetsrieder, M. and R. Baeuerlein, *Proteome research in food science*. *Chemical Society Reviews*, 2009. **38**(9): p. 2600-2608.
4. Gallardo, J.M., I. Ortea, and M. Carrera, *Proteomics and its applications for food authentication and food-technology research*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2013. **52**: p. 135-141.
5. Liu, Z. and K.L. Schey, *Fragmentation of Multiply-Charged Intact Protein Ions Using MALDI TOF-TOF Mass Spectrometry*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2008. **19**(2): p. 231-238.
6. Gathercole, J., et al., *Molecular modification associated with the heat treatment of bovine milk*. *International Dairy Journal*, 2017. **73**: p. 74-83.
7. Ito, T., et al., *Relationship of particulate matter and ozone with 3-nitrotyrosine in the atmosphere*. *Environmental Pollution*, 2018. **236**: p. 948-952.
8. Franze, T., et al., *Protein nitration by polluted air*. *Environmental science & technology*, 2005. **39**(6): p. 1673-1678.
9. Radi, R., *Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects*. *Accounts of Chemical Research*, 2012. **46**(2): p. 550-559.
10. Lyman, S.V., Q. Jiang, and J.K. Hurst, *Mechanism of carbon dioxide-catalyzed oxidation of tyrosine by peroxyxynitrite*. *Biochemistry*, 1996. **35**(24): p. 7855-7861.
11. Shiraiwa, M., et al., *Multiphase chemical kinetics of the nitration of aerosolized protein by ozone and nitrogen dioxide*. *Environmental science & technology*, 2012. **46**(12): p. 6672-6680.
12. Meusel, H., et al., *Light-induced protein nitration and degradation with HONO emission*. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 2017. **17**(19): p. 11819-11833.

## CAPÍTULO 4. IMPACTO DE LA FOTO-OXIDACIÓN EN LAS PROTEÍNAS LACTEAS

En este capítulo se describe algunas de las consecuencias de la foto-oxidación en la actividad de estas proteínas ya sea en relación a: la unión de ligandos y por lo tanto en su cuantificación, la susceptibilidad a la proteólisis enzimática y a la producción de fragmentos fotolíticos con actividad biológica.

### 4.1 Cuantificación de proteínas industriales

Hay unos pocos estudios que han analizado como afectan los distintos tratamientos tecnológicos destinados a la preservación de los alimentos a la determinación de proteínas. No hay investigaciones que relacionen los efectos de la foto-oxidación en las estructuras primarias, secundaria y terciaria de las proteínas con los resultados de las distintas técnicas empleadas para su cuantificación.

En el Capítulo 1 se ha demostrado que cuando no han sido sometidas a ningún tratamiento los métodos colorimétricos y no colorimétricos son adecuados para determinar el porcentaje de proteína que contienen las muestras analizadas. En este Capítulo se estudiará si estas mismas técnicas son adecuadas después de que las muestras fueron sometidas a irradiación UV.

Los métodos no colorimétricos utilizados fueron Kjeldahl y Milkoscan que como se ha descrito en materiales y métodos y en el CAPÍTULO 1 son el método patrón y el método más utilizado industrialmente, respectivamente.

#### 4.1.2 Métodos no colorimétricos

Se observó un incremento progresivo significativo (de cero a 8 hs) en el contenido de proteínas (medido como nitrógeno), de la misma alícuota de WPI, cuando se utilizó la técnica de Kjeldahl (Tabla 4.1); para CN no se detectaron diferencias significativas.

Cuando las mediciones se realizaron con Milkoscan (Tabla 4.1) no se observó variaciones significativas para ninguna de las dos muestras a ninguno de los tiempo de irradiación ensayados.

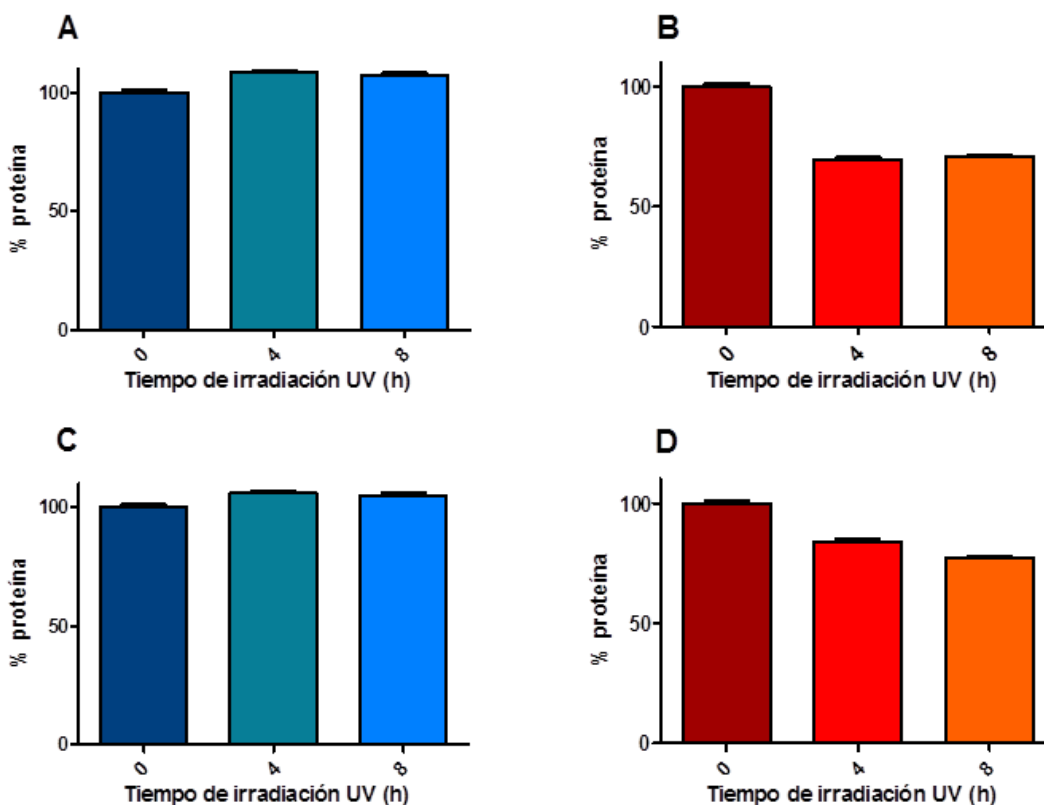
	hs	WPI	CN
<b>Kjeldahl</b>	0	82,8 ± 0,7	85,2 ± 0,88
	4	86,2 ± 2,3	89,0 ± 2,8
	8	93,4 ± 3,2*	83,7 ± 2,89
<b>Milkoscan</b>	0	83,0 ± 2,0	74,5 ± 2,0
	4	83,0 ± 2,0	75,0 ± 2,0
	8	83,5 ± 2,0	76,0 ± 2,0

**Tabla 4.1** Determinación de proteínas en muestras de WPI y CN. hs: horas de irradiación UV. \*:  $p < 0.008$  con respecto al 0 h.



### 4.1.3 Métodos colorimétricos

La irradiación UV-C no afectó la cuantificación WPI cuando se utilizó el método de Lowry. La cuantificación CN sí se vio afectada ya que disminuyó un 30 % a las 4 hs y se mantuvo en este valor después de las 8 hs de irradiación (Figura 4.1).



**Figura 4.1** Cuantificación de proteínas lácteas por técnicas colorimétricas antes y después de ser irradiadas con UV-C. Lowry: Paneles superiores (A/B). Bradford: paneles inferiores (C/D). WPI: Panel A y C. CN: Panel B y D. La muestra sin irradiar ( $t^0$ ) fue considerada como 100%.

La irradiación UV-C no afectó la cuantificación de WPI cuando se utilizó el método de Bradford. Igual que en el caso anterior la determinación de CN se vio afectada ya que disminuyó a las 4 hs de irradiación y siguió bajando después de las 8 hs (Figura 4.1).

En este capítulo, como en el CAPITULO 3, se utilizó la técnica de proteómica (ver MATERIALES Y MÉTODOS sección J) para obtener información relativa acerca de:

- Análisis de las secuencias peptídicas susceptibles de fragmentación fotolítica;
- Desaparición de la cripticidad de los sitios trípticos (aquellos que se producen por acción de la actividad de la enzima tripsina) por foto-oxidación.

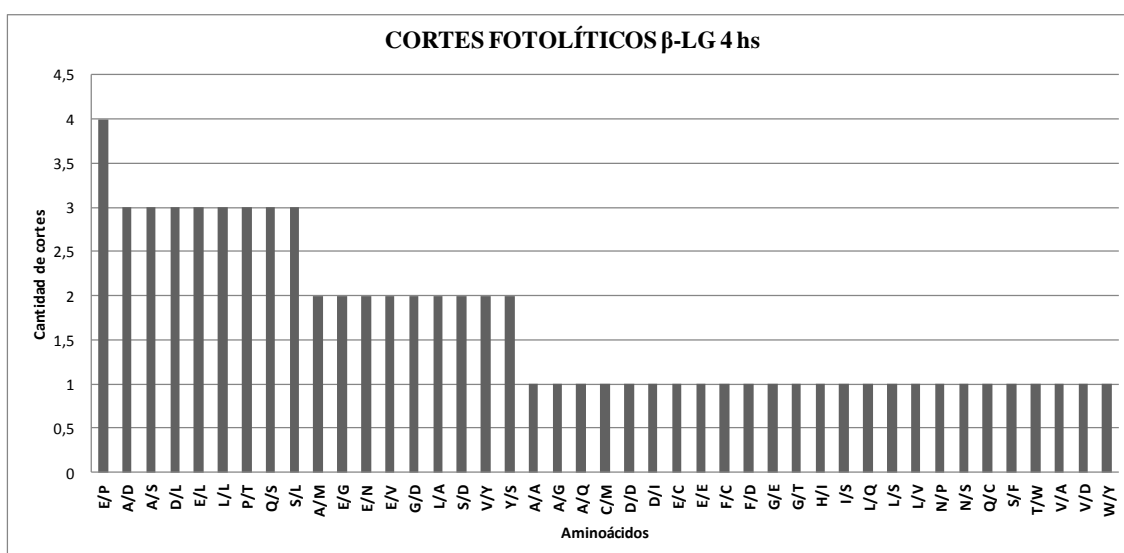
Los datos informados corresponden a los péptidos hallados utilizando el software de búsqueda Proteome Discoverer (ver MATERIALES Y METODOS sección J) y fueron catalogados manualmente según el análisis realizado.

## 4.2 Análisis de las secuencias peptídicas susceptibles de fragmentación fotolítica

Se analizó las secuencias peptídicas donde se produjeron la ruptura de enlaces peptídicos por acción de la irradiación UV-C. Este análisis se realizó con la finalidad de describir si la generación de los péptidos fotolíticos estuvo asociada a secuencias específicas de aminoácidos.

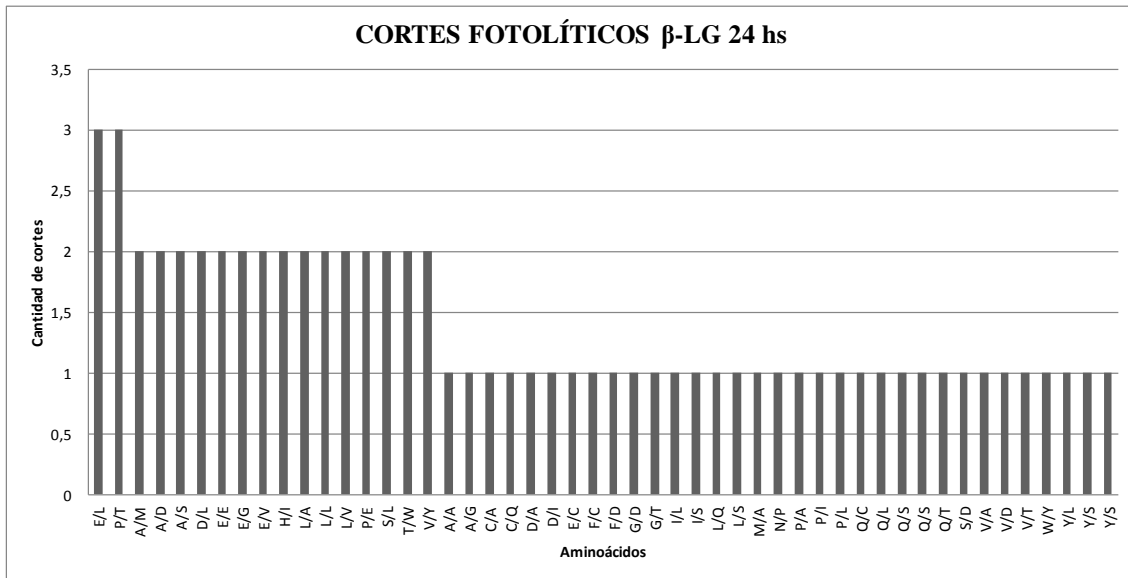
### 4.2.1 $\beta$ -LG

En  $\beta$ -LG, después de 4hs de irradiación, se observaron 43 cortes fotolíticos. El corte que se halló en mayor proporción fue el que se generó entre ácido glutámico y prolina (E/P) correspondientes a 4 secuencias de estos dos aminoácidos en la cadena primaria (50/51, 112/113, 113/114 y 126/127) (Figura 4.2).



**Figura 4.2.** Cortes fotolíticos de  $\beta$ -LG después de 4 hs de irradiación UV-C. Los aminoácidos son aquellos al inicio o al final de un péptido. Se utiliza el código de una letra.

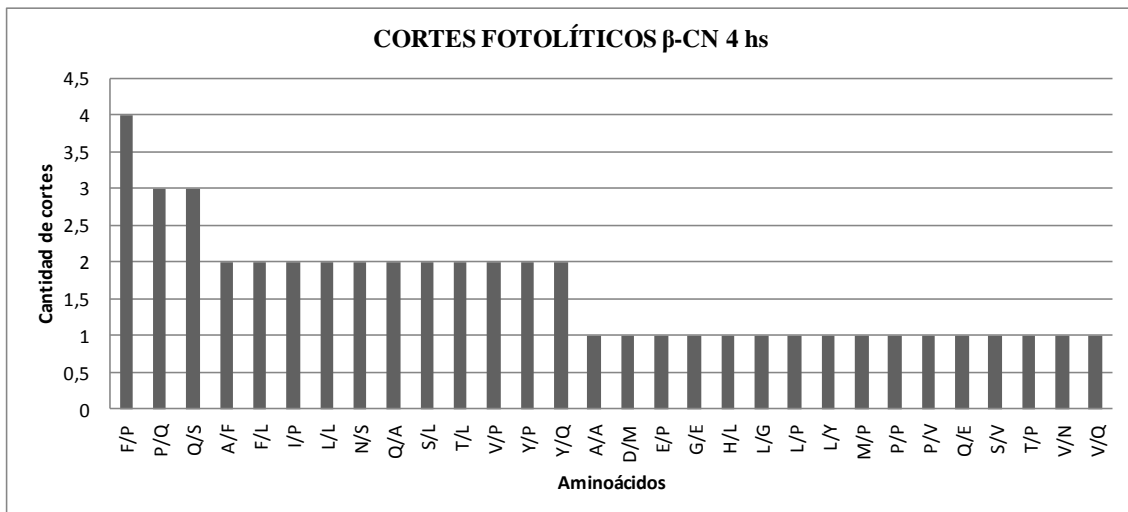
A las 24 hs de irradiación el número de cortes fotolíticos aumentó a 50. Los de mayor proporción fueron los que se generaron entre ácido glutámico y leucina (E/L), correspondientes a 3 secuencias de estos dos aminoácidos en la cadena primaria (45/46, 54/55 y 156/157) y prolina y treonina (P/T) (48/49, 49/50 y 125/126) (Figura 4.3).



**Figura 4.3** Cortes fotolíticos de β-LG después de 24 hs de irradiación UV-C. Los aminoácidos son aquellos al inicio o al final de un péptido. Se utiliza el código de una letra.

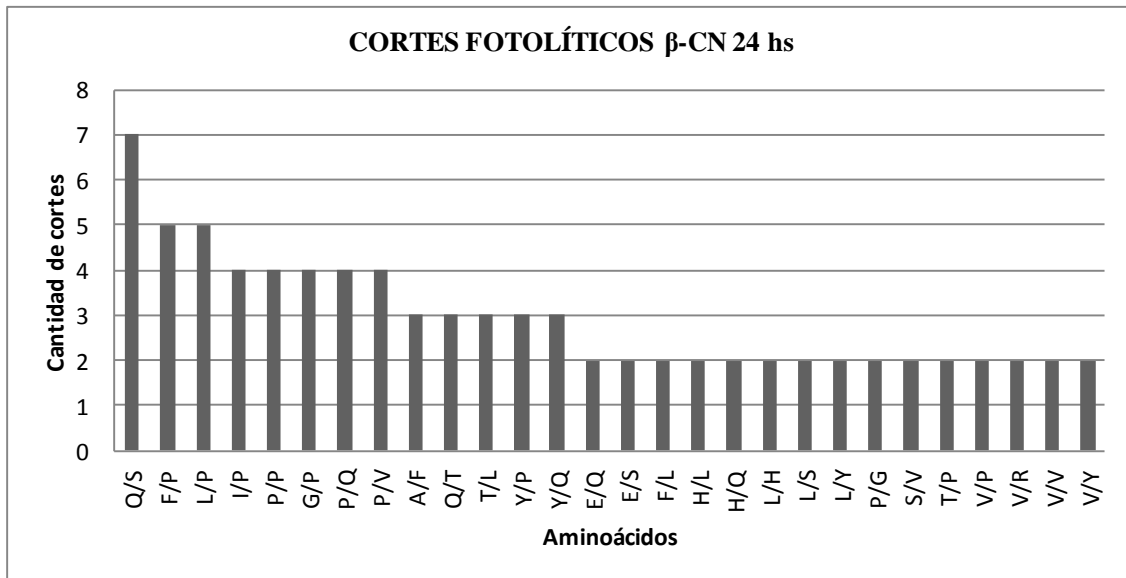
#### 4.2.2 β-CN

En β-CN, después de 4hs de irradiación, se observaron 30 cortes fotolíticos. El corte que se halló en mayor proporción fue el que se generó entre fenilalanina y prolina (F/P) correspondientes a 4 secuencias de estos dos aminoácidos en la cadena primaria (51/52, 62/63, 86/87 y 157/158) (Figura 4.4).



**Figura 4.4** Cortes fotolíticos de β-CN después de 4 hs de irradiación UV-C. Los aminoácidos son aquellos al inicio o al final de un péptido. Se utiliza el código de una letra.

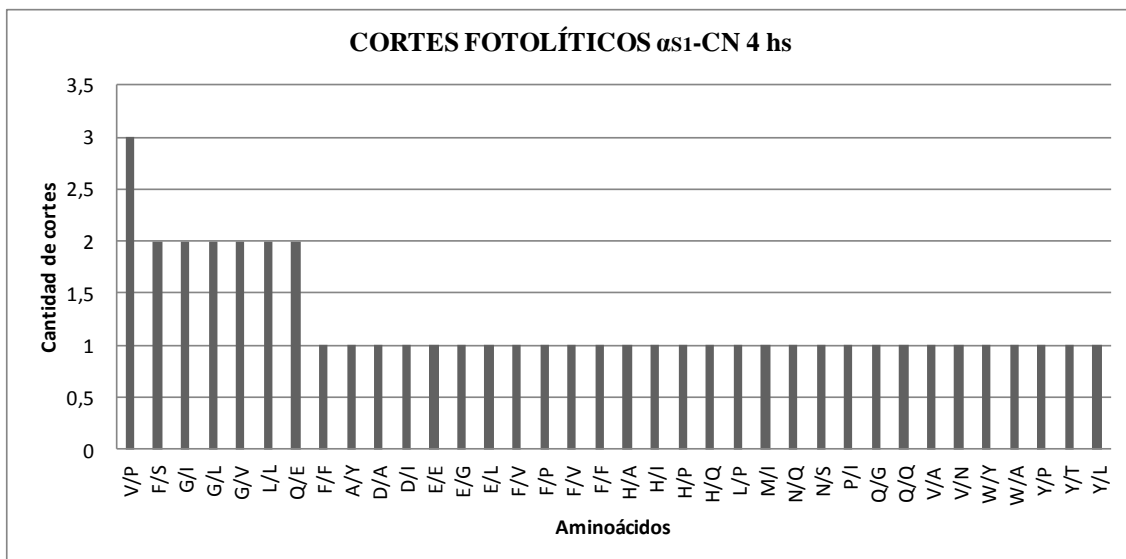
Después de 24 hs de irradiación el número de cortes fotolíticos aumentó el doble, llegando a 63 cortes. Siendo el de mayor proporción el que se generó entre glutamina y serina (G/S) correspondientes a 7 secuencias de estos dos aminoácidos en la cadena primaria (34/35, 56/57, 122/123, 123/124, 141/142, 160/161 y 166/167) (Figura 4.5, en esta imagen solo se grafican los picos con 2 o más cortes).



**Figura 4.5** Cortes fotolíticos de β-CN después de 24 hs de irradiación UV-C. Los aminoácidos son aquellos al inicio o al final de un péptido. Se utiliza el código de una letra.

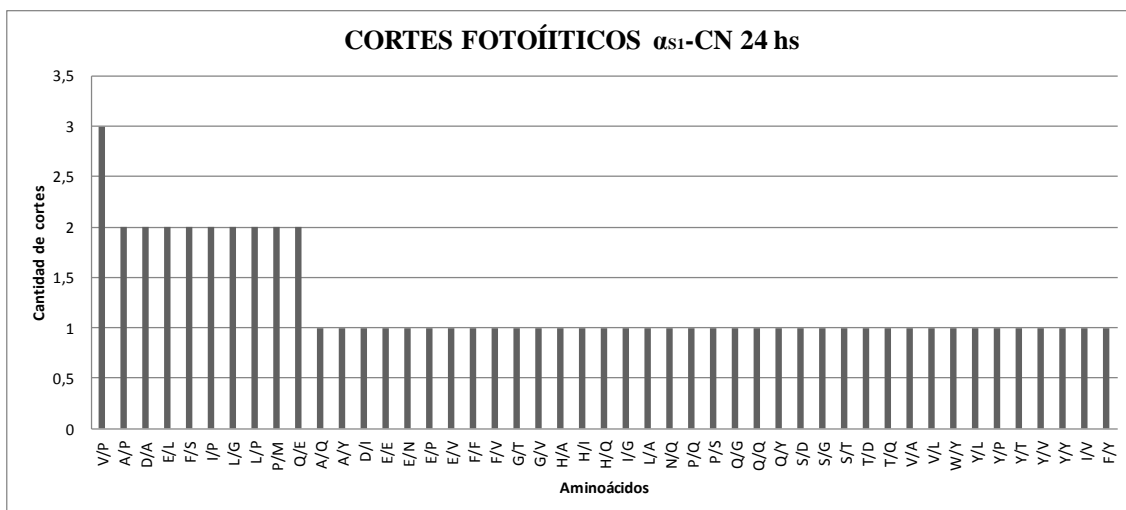
#### 4.2.3 α-CN

En α<sub>s1</sub>-CN, después de 4 hs de irradiación, se observaron 36 cortes fotolíticos. El corte que se halló en mayor proporción fue el que se generó entre valina y prolina (V/P) correspondientes a 3 secuencias de estos dos aminoácidos en la cadena primaria (86/87, 106/107 y 167/168) (Figura 4.6).



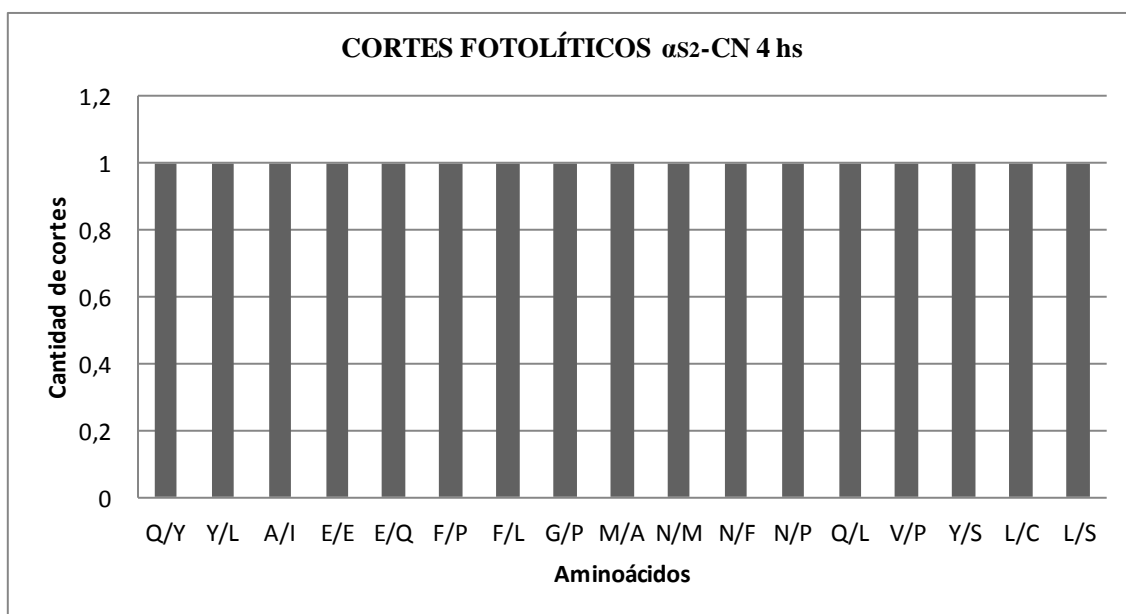
**Figura 4.6** Cortes fotolíticos de α<sub>s1</sub>-CN después de 4 hs de irradiación UV-C. Los aminoácidos son aquellos al inicio o al final de un péptido. Se utiliza el código de una letra.

Después de 24 hs de irradiación el número de cortes fotolíticos aumentó a 47 cortes. El corte que se halló en mayor proporción, igual que a las 4 hs, fue el que se generó entre valina y prolina (V/P) correspondientes a 3 secuencias de estos dos aminoácidos en la cadena primaria (86/87, 106/107 y 167/168) (Figura 4.7).



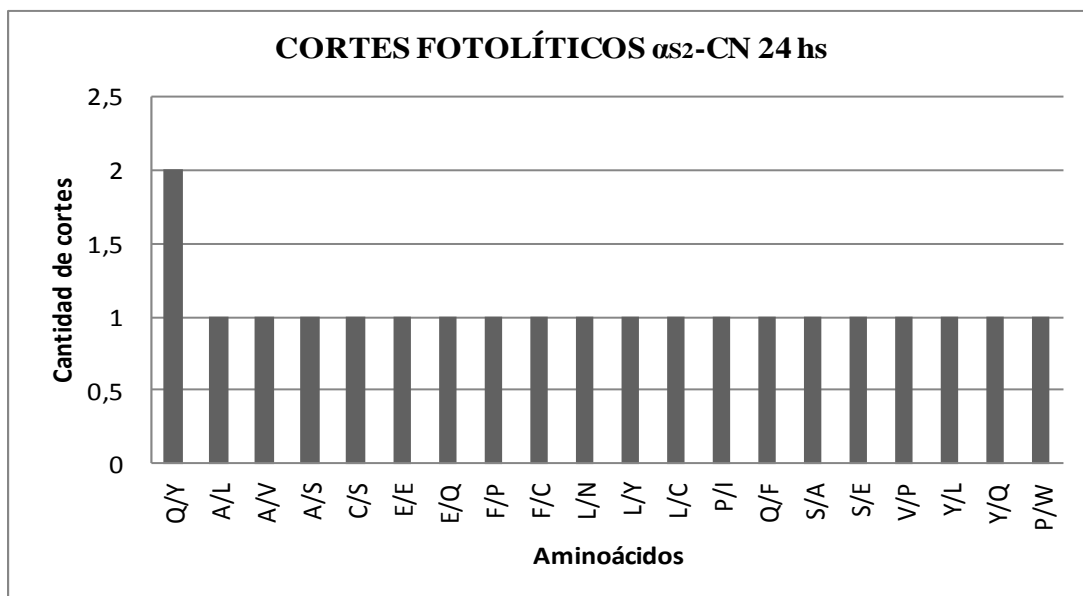
**Figura 4.7** Cortes fotolíticos de  $\alpha_{s1}$ -CN después de 24 hs de irradiación UV-C. Los aminoácidos son aquellos al inicio o al final de un péptido. Se utiliza el código de una letra.

En  $\alpha_{s2}$ -CN, después de 4 hs de irradiación, se observaron 17 cortes fotolíticos. Todos los cortes hallados fueron correspondientes a una secuencia de dos aminoácidos en la cadena primaria (Figura 4.8).



**Figura 4.8.** Cortes fotolíticos de  $\alpha_{s2}$ -CN después de 4 hs de irradiación UV-C. Los aminoácidos son aquellos al inicio o al final de un péptido. Se utiliza el código de una letra.

Después de 24 hs de irradiación el número de cortes fotolíticos aumentó a 20 cortes. Siendo el de mayor proporción el que se generó entre glutamina y tirosina (G/Y) correspondientes a 2 secuencias de estos dos aminoácidos en la cadena primaria (97/98 y 100-101) (Figura 4.9).



**Figura 4.9** Cortes fotolíticos de  $\alpha$ s2-CN después de 24 hs de irradiación UV-C. Los aminoácidos son aquellos al inicio o al final de un péptido. Se utiliza el código de una letra.

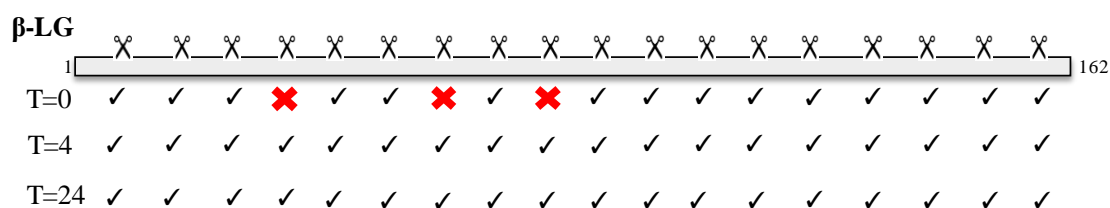
### 4.3 Desaparición de la cripticidad de los sitios trípticos por foto-oxidación

Se analizó la presencia de péptidos que fueron generados por acción de la enzima tripsina (se señala con una tijera en las figuras los sitios de proteólisis) en las muestras después de 0, 4 y 24 hs de irradiación UV-C. Teóricamente, la tripsina cliva las proteínas en los extremos carboxilo de los residuos lisinas y argininas, sin embargo en la práctica se ha observado que el corte no se produjo en todos los sitios teóricos probables (señalado con una cruz roja en las figuras). En la literatura se detalla un conjunto de reglas surgido de estudios que han evaluado la especificidad del clivaje de la tripsina, de las cuales la más conocida es la falta de ruptura en una Arg o Lys cuando a las mismas le sigue una Pro [1]. Cuando la tripsina no corta en un sitio teórico se lo denomina críptico [2].

#### 4.3.1 $\beta$ -LG

$\beta$ -LG está constituida por 162 aminoácidos, teniendo 15 lisinas y 3 argininas, por lo tanto presenta 18 sitios teóricos de clivado por tripsina.

A tiempo cero se observaron 15 sitios de clivado, y 3 sitios de clivaje que no fue atacado por la tripsina. Después de 4 y 24 hs de irradiación se observaron todos los sitios de clivado por tripsina (Figura 4.10).

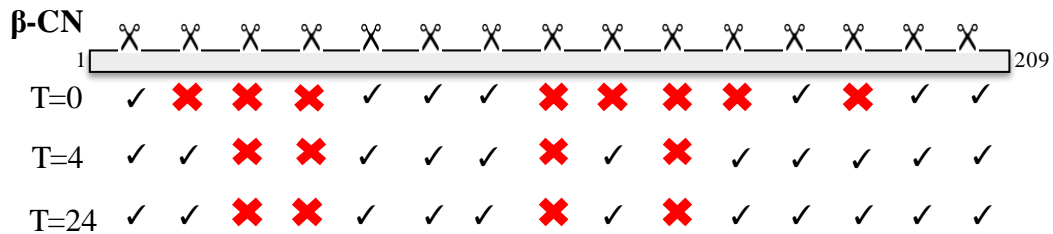


**Figura 4.10** Cortes trípticos teóricos (✂) y efectivos (✓) en  $\beta$ -LG. T: tiempo de irradiación UV-C.

### 4.3.2 CN

$\beta$ -CN está constituida por 209 aminoácidos, teniendo 11 lisinas y 4 argininas, por lo tanto presenta 15 sitios teóricos de clivado por tripsina.

A tiempo cero se observó que la tripsina cortó en 7 sitios de clivado teórico y se observaron 8 sitios de clivaje en donde la tripsina no actuó. Después de 4 hs de irradiación se observó un aumento en la cantidad de clivados, siendo 11 los mismos, y siendo 4 los sitios en donde no actuó la tripsina. Luego de las 24 hs se mantuvo igual que a las 4 hs. (Figura 4.11).

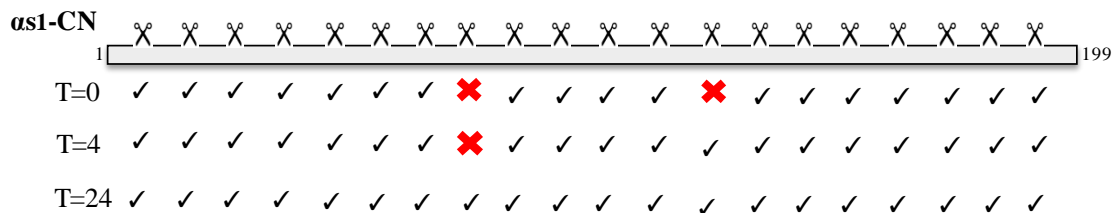


**Figura 4.11** Cortes trípticos teóricos (X) y efectivos (✓) en  $\beta$ -CN. T: tiempo de irradiación UV-C.

### 4.3.3 $\alpha$ -CN

$\alpha$ -s1CN está constituida por 199 aminoácidos, teniendo 14 lisinas y 5 argininas, por lo tanto presenta 20 sitios teóricos de clivado por tripsina.

A tiempo cero se observó que la tripsina cortó en 18 sitios de clivado teórico y se observaron solo 2 sitios de clivaje en donde la tripsina no actuó. Después de 4hs de irradiación se observó que la tripsina actuó en uno de los sitios que no había actuado anteriormente, quedando solo un sitio sin clivar en toda la secuencia primaria. Luego de las 24 hs se puede observar que se clivó toda la proteína (Figura 4.12).



**Figura 4.12** Cortes trípticos teóricos (X) y efectivos (✓) en  $\alpha$ s1CN. T: tiempo de irradiación UV-C.

$\alpha$ -s2CN está constituida por 207 aminoácidos, teniendo 24 lisinas y 6 argininas, por lo tanto presenta 30 sitios teóricos de clivado por tripsina.

A tiempo cero se observó que el corte de la tripsina coincidió en 12 sitios de clivado teórico y se observaron 18 sitios de clivaje en donde la tripsina no actuó. Después de 4hs de irradiación se observó un aumento en la cantidad de clivados, siendo 21 los

mismos, y siendo 9 los sitios en donde no actuó la tripsina. Luego de las 24 hs se observaron 19 clivados trípticos y 8 que no lo fueron (Figura 4.13).

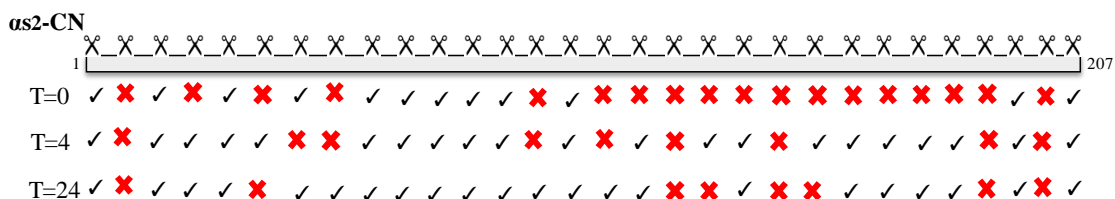


Figura 4.13 Cortes trípticos teóricos ( X ) y efectivos ( ✓ ) en αs2CN. T: tiempo de irradiación UV-C.

#### 4.4 Fotolisis: generación de péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos son sustancias orgánicas formadas por una secuencia de aminoácidos que producen un impacto positivo en la salud. La leche bovina (incluyendo el queso y otros productos lácteos), son la fuente principal de péptidos bioactivos. Las transformaciones que sufren las proteínas lácteas después de su ingesta genera péptidos que tienen una serie de efectos biológicos que son diferentes de la proteína original. Hay péptidos bioactivos derivados tanto de la caseína como de las proteínas de suero. Estos péptidos tienen una serie de actividades, que incluyen: actividad antimicrobiana, inhibición de la enzima que convierte la angiotensina (ACE), inhibición de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), opioides con actividad agonista y antagonista, inmunomoduladores, unión mineral y funciones antioxidantes. Por lo tanto los péptidos bioactivos son importantes tanto para la medicina como para la industria de los alimentos.

La generación de estos péptidos se debe a la acción de fuentes enzimáticas endógenas o exógenas (productos fermentados).

El avance en la espectrometría de masas (mayor sensibilidad, rango dinámico y tasa de adquisición espectral) permitió la identificación y descripción de algunos péptidos.

En un trabajo reciente Maolin Tu [3] identificó péptidos en caseína (αS1-CN, αS2-CN y β-CN) que fueron hidrolizados por tripsina. Ninguno de los péptidos identificados resultó ser tóxico. Se identificaron péptidos con actividad inhibitoria de ACE, como el péptido FFVAPFPEVFGK y PFPEVFGK para αS1-CN, FALPQYLK y ALNEINQFYQK para αS2-CN y AVYPYQR en β-CN. También se identificaron péptidos antioxidantes como EDVPSE y FALPQYLK para αS1-CN, αS2-CN respectivamente y AVYPYQR y VLPVPQK para y β-CN. En esta última se identificó un péptido con actividad antiinflamatoria (DMPIQAFLLYQEPVLPV) y otro con actividad inmuno moduladora (RELEELNVPGEIVESLSSEESITR).

Nagaoka [4] identificó péptidos en β-LG, que poseen actividad hipocolesterolémica: IIAEK, GLDIQK, ALPMH y VYVEELKPTPEGDLEILLQK.

En β-LG se identificaron varios péptidos además de los hipocolesterolémicos como ALPMHIR, LDAQSAPLR y VLDTDYK con actividad inhibitoria de ACE ([5] y [6]



para los dos últimos péptidos), y AASDISLLDAQSAPLR y IPAVFK con actividad antimicrobiana [7].

En esta tesis se hallaron péptidos fotolíticos (CAPÍTULO 3) algunos de los cuales coincidieron con péptidos tripticos descritos como bioactivos en la literatura (Tabla 4.2).

Fragmento	Secuencia	Bio-actividad	Referencias	Péptido fotolítico
$\alpha$ S1-CN f(23-34)	FFVAPFPEVFGK	Inhibidor de ACE /anti cáncer	Tu, Liu et al. 2018	✓
$\alpha$ S1-CN f(27-34)	PFPEVFGK	Inhibidor de ACE	Tu, Liu et al. 2018	x
$\alpha$ S1-CN f(84-90)	EDVPSER	Antioxidante	Tu, Liu et al. 2018	x
$\alpha$ S2-CN f(174-181)	FALPQYLK	Inhibidor de ACE /antioxidante	Tu, Liu et al. 2018	✓
$\alpha$ S2-CN f(81-91)	ALNEINQFYQK	Inhibidor de ACE	Tu, Liu et al. 2018	x
$\beta$ -CN f(177-183)	AVPYPQR	Inhibidor de ACE /antioxidante	Tu, Liu et al. 2018	x
$\beta$ -CN f(184-202)	DMPIQAFLLYQEPVLGPVR	Anti inflamatorio	Tu, Liu et al. 2018	✓
$\beta$ -CN f(1-25)	RELEELNVPGEIVESLSSEESITR	Inmunomodulador	Tu, Liu et al. 2018	✓
$\beta$ -CN f(170-176)	VLPVPQK	Antioxidante	Tu, Liu et al. 2018	x
$\beta$ -LG f(41-60)	VYVEELKPTPEGDLEILLQK	Activ. hipocolesterolémica	Nagaoka et al. 2001	✓
$\beta$ -LG f(71-75)	IIAEK	Activ. hipocolesterolémica	Nagaoka et al. 2001	x
$\beta$ -LG f(9-14)	GLDIQK	Activ. hipocolesterolémica	Nagaoka et al. 2001	x
$\beta$ -LG f(142-146)	ALPMH	Activ. hipocolesterolémica	Nagaoka et al. 2001	x
$\beta$ -LG f(142-148)	ALPMHIR	Inhibidor de ACE	Mullally et al. (1997)	x
$\beta$ -LG f(32-40)	LDAQSAPLR	Inhibidor de ACE	Pihlanto-Leppala et al. (2000)	✓
$\beta$ -LG f(94-100)	VLDTDYK	Inhibidor de ACE	Pihlanto-Leppala et al. (2000)	✓
$\beta$ -LG f(25-40)	AASDISLLDAQSAPLR	Antimicrobiano	Pellegrini et al. (2001)	✓
$\beta$ -LG f(78-83)	IPAVFK	Antimicrobiano	Pellegrini et al. (2001)	x

**Tabla 4.2** Péptidos fotolíticos con bioactividad descripta. ✓: señala coincidencia total con la literatura. X: señala coincidencia parcial por estar contenidos en un péptido mayor.

## 4.5 Conclusiones

### 4.5.1 Consecuencias en la cuantificación de proteínas

Método no colorimétricos: Se observó que hubo un aumento relativo de la cantidad de nitrógeno en  $\beta$ -LG y no en CN, indicando que este método patrón no es apto para el dosaje de las proteínas de suero, si estas han sido modificadas por procesos oxidativos. Por lo tanto es necesario recomendar la construcción de curvas de trabajo apropiadas para la determinación de este tipo de proteínas modificadas.

Métodos colorimétricos: El método de Lowry se basa en la conversión de  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  en condiciones alcalinas y el subsiguiente cambio de color en el reactivo de Folin Modificado por Hartee. Este método colorimétrico cuantifica los aminoácidos aromáticos (tirosina y triptófano) y enlaces peptídicos que forman complejos con el

cobre [8]. La determinación de CN por Lowry se ve afectada debido al contenido relativo de tirosina que contienen las caseínas, que en promedio es superior al de WPI. En el CAPÍTULO 2 se ha mostrado que las tirosinas y triptófano del CN son más lábiles que las del WPI, por lo tanto es razonable que la determinación de proteína por Lowry para CN se vea fuertemente afectada por la irradiación.

El método de Bradford se basa tanto en la interacción iónica entre el colorante y los grupos positivos de las proteínas como la lisina y la arginina y las interacciones hidrófobas durante el proceso de unión del colorante [9]. La determinación de CN por Bradford se vio afectada ya que la proporción de aminoácidos básicos de la CN es superior al de WPI y al oxidarse la afinidad del Coomassie por la proteína disminuye ya que pierde cargas positivas de los aminoácidos básicos [9].

#### **4.5.2 Desaparición de la cripticidad de los sitios trípticos por foto-oxidación**

La fotooxidación expone algunos cortes trípticos teóricos que son crípticos (esto sugiere que el metabolismo en el tracto gástrico las proteínas lácteas foto-oxidadas podría estar modificado respecto de las proteínas nativas y que péptidos que normalmente no se generan por acción de las enzimas gástricas si se generan)

En  $\beta$ -LG se observaron 3 sitios resistentes a tiempo cero los cuales desaparecieron después de las 4 hs de irradiación, determinando experimentalmente todos los sitios de corte teórico.

En  $\beta$ -CN se observaron 8 sitios crípticos a tiempo cero. Después de 4 hs de irradiación desaparecieron 4. A las 24 hs no se observaron cambios en esta situación.

En  $\alpha$ -s1CN se observó 2 sitios resistentes a tiempo cero. Después de 4 hs de irradiación desapareció uno y a las 24 hs el restante, observando así todos los sitios de corte teórico.

En  $\alpha$ -s2CN se observaron 18 sitios crípticos a tiempo cero. Después de 4 hs de irradiación desaparecieron 5 sitios, y después de 24 hs desaparecieron 3 sitios crípticos. Es interesante destacar que para esta proteína aparecen sitios crípticos nuevos tanto después de 4 hs (un sitio) y después de 24 hs (3 sitios) los cuales no se observaron a tiempo cero.

#### **4.5.3 Análisis de las secuencias peptídicas susceptibles de fragmentación fotolítica**

Cuando se analizaron los cambios en cortes fotolíticos, se observó claramente que la cantidad y la variedad de éstos fue en aumento con las horas de irradiación.

En  $\beta$ -LG, después de 4hs de irradiación, se observó que la fragmentación ocurrió principalmente al lado de los aminoácidos leucina, ácido glutámico y prolina con 20 cortes el primero y con 16 cortes los segundos. Después de 24 hs de irradiación el porcentaje de cortes siguió siendo importante en la inmediación de los mismos aminoácidos.

En  $\beta$ -CN, después de 4hs de irradiación, se observó que la fragmentación ocurrió principalmente al lado del aminoácido prolina con 19 cortes, esto era lo esperado, por la

gran cantidad de prolina que posee la proteína en su estructura primaria. La fragmentación también fue importante, al igual que en el caso de  $\beta$ -LG, en leucina y glutamina con 14 y 16 cortes respectivamente. Después de 24 hs el patrón de fotólisis se repitió pero incrementó, ya que los cortes observados fueron 43, 30 y 23 para prolina, glutamina y leucina respectivamente.

En  $\alpha$ s1-CN, después de 4hs de irradiación, se observó que la fragmentación ocurrió principalmente al lado de los aminoácidos fenilalanina y valina con 9 cortes cada uno, seguidos por glicina con 8 cortes. Después de 24 hs la fragmentación aumentó y cambió el patrón de corte ya que los cortes ocurrieron en la vecindad de los aminoácidos prolina y glutamina con 13 y 11 cortes respectivamente.

En  $\alpha$ s2-CN, después de 4hs de irradiación, se observó que la fragmentación ocurrió principalmente al lado de los aminoácidos prolina y leucina con 4 cortes cada uno, seguidos por fenilalanina, ácido glutámico, glutamina y tirosina con 3 cortes cada uno. Después de 24 hs aumentó la fragmentación a 5 cortes en leucina, glutamina y tirosina.

#### **4.5.3 Generación de péptidos bioactivos**

A los péptidos señalados con una “x” en la Tabla 2 (PFPEVFGK, EDVPSEK, ALNEINQFYQK, AVYPYQR, VLPVPQK, IIAEK, GLDIQK, ALPMHIR e IPAQVFK) sería necesario hacerles los análisis correspondientes en modelos *in vitro* e *in vivo* para poder determinar si son bioactivos o no.

Esta búsqueda fue preliminar pero abre un nuevo campo en el estudio de péptidos bioactivos generados no por acción enzimática si no por acción fotolítica.

## Bibliografía

1. Vandermarliere, E., M. Mueller, and L. Martens, *Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics*. Mass spectrometry reviews, 2013. **32**(6): p. 453-465.
2. Deng, Y., H. Gruppen, and P. A. Wierenga, *Comparison of Protein Hydrolysis Catalyzed by Bovine, Porcine, and Human Trypsins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018. **66** (16): p. 4219-4232.
3. Tu, M., et al., *Bioactive hydrolysates from casein: generation, identification, and in silico toxicity and allergenicity prediction of peptides*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018. **98** (9): p. 3416-3426.
4. Nagaoka, S., et al., *Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk  $\beta$ -lactoglobulin*. Biochemical and biophysical research communications, 2001. **281** (1): p. 11-17.
5. Mullally, M. M., H. Meisel, and R. J. FitzGerald, *Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine  $\beta$ -lactoglobulin*. FEBS letters, 1997. **402** (2-3): p. 99-101.
6. Pihlanto-Leppälä, A., et al., *Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides*. Journal of Dairy Research, 2000. **67** (1): p. 53-64.
7. Pellegrini, A., et al., *Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine  $\beta$ -lactoglobulin*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2001. **1526** (2): p. 131-140.
8. Everette, J. D., et al., *Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin–Ciocalteu reagent*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58** (14): p. 8139-8144.
9. Sapan, C. V., R. L. Lundblad, and N. C. Price, *Colorimetric protein assay techniques*. Biotechnology and applied Biochemistry, 1999. **29** (2): p. 99-108.

## **DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN

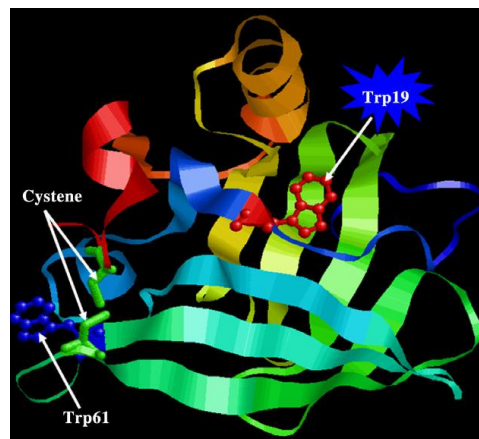
El análisis se realizará describiendo si hay diferencias entre los efectos que produjo la foto-oxidación en la proteína pura y en la industrial. Luego se realizará un análisis integrador de lo observado sobre los aminoácidos individuales por fluorescencia y por oxiproteómica, y se los relacionará con los datos de la literatura.

### Aportes al conocimiento de la foto-oxidación y estructura de las proteínas lácteas

El primer hallazgo, que no ha sido descrito en la literatura, es que los preparados (aislado de proteína de suero y caseinato de sodio) sin ningún tratamiento presentaron aminoácidos oxidados. Estos preparados además mostraron la presencia de moléculas que contenían el péptido señal (Figura 3.2, Tabla 3.3 y Tabla 3.6). Ninguno de los trabajos realizados por proteómica, consultados por la autora de esta tesis doctoral, han reportado la presencia de aminoácidos que conforman el péptido señal. Cabe recordar que éste es clivado durante el proceso de secreción; por lo tanto la presencia de este péptido en todas las proteínas analizadas sugieren contribución de otros mecanismos distintos de la secreción como la ruptura celular. Ésta es una de las características de la mastitis, enfermedad común en el ganado sometido a extracciones exhaustivas para la producción láctea [1].

### $\beta$ -lactoglobulina

En el CAPITULO 2 se analizó la oxidación del triptófano utilizando técnicas fluorimétricas.  $\beta$ -LG es una proteína de estructura globular con dos residuos triptófano uno en posición 19 y el otro en posición 61 (Figura 1). Se observó en el transcurso de la irradiación que la proteína se desplegó exponiendo los triptófanos, ya que se observó un corrimiento espectral a longitudes de onda mayor (sección 2.5). Simultáneamente la intensidad de fluorescencia disminuyó, indicando que ambos procesos (desenrollamiento y oxidación) ocurrieron conjuntamente.



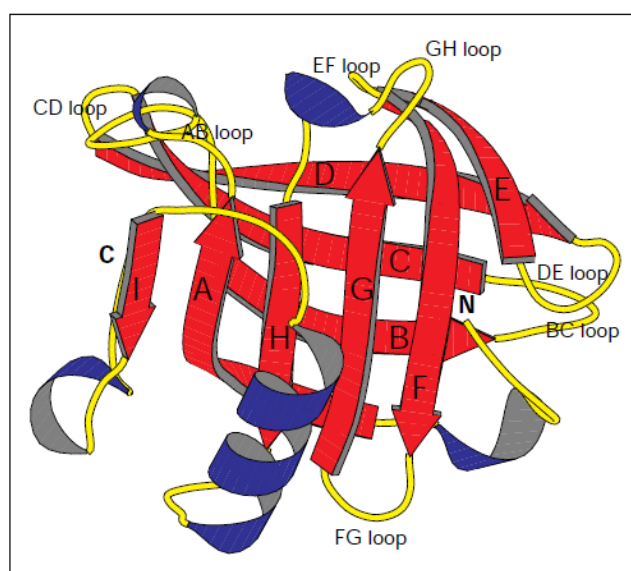
**Figura 1.** Estructura cristalina de  $\beta$ -LG (PDBid: 3BLG). Muestra Trp19 (azul) y Trp 61 (verde) [2].

Se conoce que el Trp 19 está más expuesto [2] y también que es el que más aporta a la fluorescencia intrínseca [2]. Esto junto con los resultados aquí expuestos, indicarían que el Trp 19 se estaría oxidando antes que el Trp 61.

En el CAPITULO 3 se reportaron los péptidos que poseían residuos triptófano oxidados (sección 3.3.1.1), siendo evidente una mayor cantidad de péptidos con oxidaciones en Trp19. Es interesante destacar la presencia de un péptido semitriptico que se genera por fotólisis (consecuencia directa de la foto-oxidación) en el aminoácido treonina vecino inmediato de este triptófano. Es conocido que la irradiación UV-C genera radicales alcoxilos (RO.), éstos se adicionan rápidamente y a través de reacciones de sustracciones de hidrogeno conducen a la fragmentación unimolecular y a reacciones de rearrreglo que propagan y aumentan el daño oxidativo [3].

El análisis por oxiproteómica mostró la formación de hidroxitriptófano, quinurenina (KYN) y NFK (dioxidaciones) a partir de las 4hs de irradiación. En el Trp61 es mayor la proporción del hidroxitriptófano y de quinurenina, señalando que hay parte de las moléculas de  $\beta$ -LG que tienen este Trp poco oxidado y que para aquellas que se oxidan el mecanismo prosigue hasta KYN. El mecanismo de oxidación fue diferente para el Trp19 que pasó por un estado de oxidación intermedio (NFK) (Figura 16 en INTRODUCCIÓN). Esto reafirma las observaciones del CAPITULO 2 en donde la fluorescencia mostró la formación de productos de oxidación del triptófano a longitudes de ondas mayores a 360 nm (sección 2.4).

$\beta$ -LG tiene en su estructura primaria 4 tirosinas, tres de ellas ubicadas en hoja beta plegada (Tyr20, Tyr42 y Tyr102) y una ubicada en un giro móvil (Tyr99). Dentro del giro FG (Figura 2) hay un giro  $\gamma$  [4], centrado en Tyr99 entre las cadenas F y G. Este giro contiene el triplete de residuos más altamente conservado dentro de la familia de las lipocalinas (Thr97, Asp98 y Tyr99) [5]. Se conoce que los giros  $\gamma$  son razgos altamente estructurales en las familias de proteínas con funcionalidades específicas [6]. Por lo tanto se ha sugerido que podría haber alguna función biológica asociada con esta característica particular [7]. En este caso, el giro se mantiene por cuatro enlaces de hidrógeno de la cadena principal con residuos de las regiones estructuralmente bien conservadas de la familia de lipocalinas [8]. Los experimentos de fluorescencia (sección 2.4) indicaron que la formación de ditirosina en WPI se observó cuando la foto-oxidación fue prolongada.



**Figura 2.** Diagrama de la estructura de  $\beta$ -LG. Señalados los giros (“loop”) y las hojas beta plegada con letras de la A a la I [8].

El único péptido que mostró formación de ditirosina unida, a una hebra de proteína, (no se pudo demostrar que estuviese formando puente entre dos hebras, ver sección 3.3.2), fue AGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR. En este péptido se observó que la tirosina Tyr20 es la que forma ditirosina. Es decir la tirosina que se encuentra al lado del triptófano más lábil de la proteína. Es conocido que la formación de ditirosina ocurre principalmente por la formación de hidroperóxidos de tirosina, favoreciendo procesos de fragmentación a través de una ruta oxidativa hidroperóxido RO. [3].

La otra modificación oxidativa de tirosina fue la formación de nitrotirosina, para las Tyr20 y Tyr42. Cabe señalar que parte de las moléculas de  $\beta$ -LG ya presentaba esta modificación traslacional a tiempo cero, pero la variedad y cantidad de péptidos indica que la proporción de moléculas conteniendo estas tirosinas nitradas aumentó con las horas de irradiación, sobre todo para la Tyr20. Se conoce que procesos de nitración in vivo ocurren durante los procesos inflamatorios como lo hemos señalado antes para la presencia del péptido señal [9]. Nuestros resultados son distintos a los obtenidos para proteína de leche, ya que en esta última situación la única tirosina nitrada fue la Tyr99 utilizando una técnica de proteómica con marcación in vitro [10]. Por lo tanto los resultados de esta tesis son los primeros en describir la presencia de nitrotirosina en preparados de proteínas séricas comerciales.

Si nos fijamos cuales son las características estructurales que impiden la oxidación de los aminoácidos estudiados se observa que la fuerte relación que tiene la Tyr102 con Lis135, Tyr99 con Asp98 y Lis100 con Arg124 y Asp11, a través de la formación de enlaces puente hidrógeno, podría explicar la resistencia a la nitración. La Tyr20 es la más accesible al solvente y resultó ser la más susceptible a la nitración en los experimentos [8].

Es conocido que los residuos de Met forman un enlace hidrofóbico entre el átomo de azufre y los anillos de residuos aromáticos hidrofóbicos, incluidos el triptófano, la fenilalanina y la tirosina [11]. Estos enlaces hidrofóbicos entre el anillo de aminoácidos aromáticos y el azufre de la Met son muy comunes y contribuyen a la estabilidad estructural de las proteínas con enlaces cuyo valor energético es de 1,0 a 1,5 kcal / mol, aproximadamente igual al de un enlace iónico [11]. Los aminoácidos aromáticos se encuentran entre los más susceptibles a la oxidación por especies reactivas, por lo que la interacción de Met con estos brinda protección antioxidante a los mismos. Por supuesto, la conversión de Met a metionina sulfoxido (MetO) impediría la formación de este enlace hidrofóbico, perturbando el plegamiento tridimensional normal de la proteína, exponiendo residuos normalmente enterrados, lo que explica la asociación de la oxidación de Met con el aumento de la hidrofobicidad superficial de las proteínas [12] [13].

A tiempo cero en forma similar a lo observado para triptófano y tirosina se determinó que la metionina en el extremo N-terminal estaba oxidada en algunas de las moléculas. De las cuatro metioninas que contiene la  $\beta$ -LG solo una no presentó oxidación (Met145), la cual está posicionada al inicio de la interface del dímero de la proteína, ya descrito por Pedersen 1936 [14], los enlaces comprometidos en la formación del dímero ha sido estudiado intensivamente [15-16]. El dímero es la estructura cuaternaria más grande observada para la variante B de esta proteína. Su composición proporciona las características más destacadas de la interface de ésta en comparación con otras



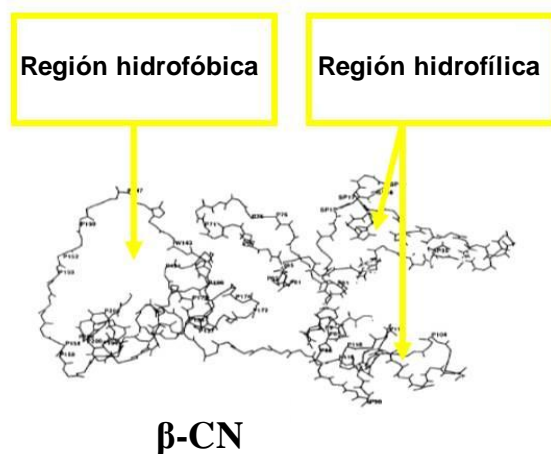
interfaces homodímeras de proteínas. La interface de  $\beta$ -LG constituye un entorno altamente polar. La comparación del interior del monómero con el de la interface revela que, en general, los aminoácidos hidrófobos son más frecuentes en el interior de los monómeros que en la interface proteína-proteína. Por otro lado, una mayor proporción de residuos cargados y polares están en la interface [17] [18]; la fracción del área polar es incluso mayor que el contenido promedio para la superficie de las proteínas globulares. Un estudio de la estructura de  $\beta$ -LG reveló que las moléculas de agua interfaciales están realmente integradas en un entorno altamente polar, al estar involucradas en una red compleja de contactos polar a polar [19].

La prolina 144 tampoco presentó oxidación, la cual se sitúa en la vecindad de la Met 145, como ya se explicó antes, al inicio de la interface. El hecho de que la Met 145 y la Pro146 permanecen sin oxidar después de 24 hs de irradiación UV, es una evidencia que soporta los resultados de otros grupos que han mostrado que estos aminoácidos interactúan específicamente con la vitamina D que se ha denominado el exosito de unión conformados por los aminoácidos Leu144 Pro143 y Met145 [20] [21]. El hecho de que la vitamina D<sub>3</sub> es un bloqueador de oxígeno singlete explicaría porque estos aminoácidos que interactúan específicamente con esta vitamina no son foto-oxidados en las condiciones probadas [22].

### $\beta$ -caseína

El preparado de caseinato de sodio utilizado en esta tesis contiene  $\alpha$  y  $\beta$  caseína como proteínas predominantes (sección 1.3), sin embargo en esta discusión abordaremos principalmente los aspectos referidos a la  $\beta$ -CN de acuerdo a los resultados mostrados en el CAPÍTULO 2 con  $\beta$ -CN purificada.

$\beta$ -CN es una proteína anfifílica. La fracción del extremo N-terminal (1-40) contiene cinco fosfoserinas de la molécula y es la parte de la proteína con más carga además de ser la parte que menos hidrofobicidad posee. La fracción del medio (41-135) contiene poca carga y moderada hidrofobicidad, mientras que la sección del extremo C-terminal (136-209) contiene muchos de los aminoácidos polares y posee una alta hidrofobicidad (Figura 3) [23].



**Figura 3.** Estructura  $\beta$ -CN. Se señala el extremo N-terminal (menos hidrofóbico) y el extremo C-terminal (más hidrofóbico). Imagen modificada de [24].

El caseinato de sodio en solución se encuentra como monómero, ya que está presente en forma de moléculas de caseína individuales, en las condiciones experimentales que se han utilizado, es decir cuando la fuerza iónica es baja y el pH de la solución está lejos del punto isoeléctrico [25].

La baja velocidad de formación de NFK encontrada por fluorescencia para  $\beta$ -CN (sección 2.2), se correlacionó con la baja oxidación del Trp que fue observada para CN (sección 3.3.1.2) ya que no se reportó la ocurrencia de dioxidaciones (NFK). Por lo tanto no se reportaron diferencias significativas entre la proteína pura y el preparado industrial tanto por las técnicas fluorimétricas como de oxiproteómica.

Los resultados del CAPITULO 2 (Figura 2.1 y Figura 2.4) sugieren que esta observación podría explicarse por la fuerte polimerización que sufrieron las muestras de CN después de 4 hs de irradiación en relación a la  $\beta$ -CN pura.

Los datos de los experimentos de fluorescencia tanto para  $\beta$ -CN y CN (Figura 2.6) como los aportados por otros autores confirman la formación de ditirosina en función del tiempo de irradiación [26-27]. No fue posible confirmar la formación de ditirosina por oxiproteómica, ya que como indicamos en el CAPITULO 3 las bases de datos de péptidos unidos por ditirosinas no están disponibles y por lo tanto no podemos observar este tipo de oxidación en los datos hasta el momento.

La otra modificación oxidativa que se pudo observar por oxiproteómica fue que Tyr114 fue la única que no sufrió nitración. Se especula que esta tirosina, muy expuesta en un giro beta, haya formado puentes ditirosina tempranamente.

A diferencia de lo hallado para  $\beta$ -LG, a tiempo cero no se detectó la presencia de nitrotirosina. En la literatura sin embargo se ha descrito que en una leche comercial  $\beta$ -CN tuvo nitración en la Tyr193 [10]. Nuestros resultados muestran la nitración de esta tirosina sólo a tiempos más prolongados de irradiación.

Otras modificaciones oxidativas ocurrieron en las prolinas, las cuales presentaron mayor susceptibilidad en la zona comprendida entre los aminoácidos His50 e His106 de la proteína. A diferencia de las prolinas presentes en la antes mencionada región, las ubicadas próximas al extremo C-terminal (Pro172 y Pro174) fueron resistentes a la oxidación hasta las 4 hs.

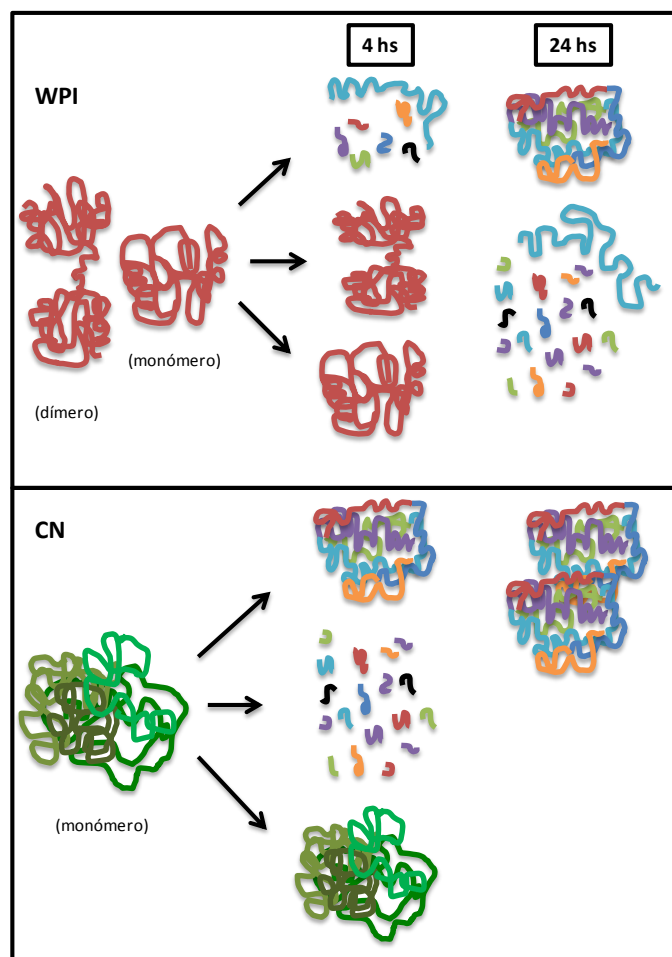
Las metioninas que no sufrieron oxidación fueron Met102 y Met109 en la zona media de la proteína próximos de aminoácidos cargados (como ya hemos dicho varias veces no hay un consenso en cuanto a la estructura tridimensional de la  $\beta$ -CN). Una observación interesante es que tanto las metioninas como las prolinas resistentes a la oxidación son vecinos a aminoácidos lisinas.

## Fragmentación y polimerización proteica por acción fotolítica y su relación con la estructura terciaria

La irradiación UV-C causó la desaparición de la proteína nativa con el transcurso del tiempo en las proteínas puras, siendo más rápida para  $\beta$ -LG que para  $\beta$ -CN.

La polimerización fue más efectiva en los preparados de grado industrial que para las proteínas puras. Esto fue constatado con la técnica de SDS-PAGE en condiciones disociantes y reductoras, donde se observó una gran cantidad de agregados de alto peso molecular, inclusive algunos no penetraron en el gel separador.

La mayor formación de agregados de alto peso molecular de las fracciones industriales podría ser consecuencia de una velocidad de fragmentación más lenta, sobre todo para WPI, y por lo tanto permanecerían más tiempo intacta para poder formar oligómeros y agregados covalentes. En el caso del caseinato el patrón de agregación-fragmentación fue totalmente distinto al de la proteína aislada ( $\beta$ -CN), mientras que en el caso de  $\beta$ -LG con respecto a WPI las diferencias fueron de velocidad en la aparición de fragmentos y de polímeros/agregados (CAPITULO 2). Estos hallazgos se resumen en la Figura 4 donde se muestra los cambios observados para las dos proteínas en estudio.



**Figura 4.** Resumen gráfico de los resultados obtenidos por SDS-PAGE y la detección de fragmentación proteica por oxiproteómica.

La técnica de espectroscopia de masas (CAPITULO 3) nos permitió observar el ion péptido principal  $[H]^+$   $m/z$  de 6755 cuya intensidad aumentó más de cien veces con relación a lo observado a tiempo cero. Se propone que el mismo podría corresponder al péptido Tre6-Gli64 ya que la unión entre Gly64 y Glu65 está ubicado en el giro superficial móvil CD de la secuencia primaria y por lo tanto estaría más expuesto a la acción de la irradiación (Figura 4 péptido en celeste a las 4hs).

La oxiproteómica permitió analizar donde se produjeron los cortes durante la fragmentación por irradiación UV (rupturas no enzimáticas de los péptidos semitrípticos).

La fragmentación del esqueleto proteico por foto-oxidación en su etapa inicial ha sido poco estudiada, con algunas excepciones. Se ha informado que la foto-oxidación de la lisozima en presencia de lumiflavina produce fragmentos de péptidos, ya sea mediante la oxidación de residuos de Trp y/o la formación de radicales libres [28] [3]. Estos últimos son progenitores potenciales de la fragmentación del esqueleto, ya que la formación de radicales en los carbono  $\alpha$  a través de la extracción del átomo de hidrógeno, es un proceso favorable debido a la estabilización por resonancia entre los grupos amida y carbonilo vecinos. Los radicales de carbono  $\alpha$  son considerados en la literatura como los principales intermedios en el clivaje del esqueleto proteico en presencia de oxígeno [28].

Los aminoácidos que están involucrados mayoritariamente en los cortes fotolíticos para todas las proteínas fueron leucina, ácido glutámico y prolina (sección 4.2). Por lo tanto nuestros resultados expande la lista de aminoácidos que generan fragmentación por irradiación ya que otros autores señalaron la intervención de prolina, casi con exclusividad [29].

### **Efectos de la foto-oxidación en la funcionalidad de las proteínas estudiadas como sustrato de una enzima proteolítica**

Se ha estudiado con intensidad los cambios estructurales causados por alta temperatura y alta presión, es así que se ha descrito que estos tratamientos producen la exposición de sitios resistente a la acción de enzimas proteolíticas [30-31].

Se conoce que la tripsina cliva la proteína en el extremo carboxilo en los residuos lisinas y argininas, sin embargo, se ha observado repetidamente que el corte no se produjo en todos los sitios teóricos (CAPITULO 3). La selectividad enzimática se ve explicada en parte por lo que se denomina especificidad secundaria de la enzima, es decir, la influencia de los aminoácidos cercanos a los sitios de clivaje. Así se ha explicado la baja tasa de hidrólisis que producen los aminoácidos cargados inmediatamente vecinos a los sitios de clivaje teóricos [32]. La regla más conocida de un sitio resistente a la proteólisis es la presencia de un aminoácido prolina inmediato a una Arg o Lys [33], debido a la conformación atípica impuesta en Arg o Lys por la Pro [34].

En la sección 4.3 se describió la aparición de cortes trípticos, no presentes en la proteína nativa (crípticos). Para todas las proteínas estudiadas en esta tesis sucedió este fenómeno, produciendo péptidos que no ocurren por acción de la tripsina en las proteínas nativas.

Esta observación sugiere que el pretratamiento con UV-C es una alternativa interesante para la generación de nuevos péptidos por hidrólisis enzimática. Esto es importante ya que  $\beta$ -CN principalmente y  $\beta$ -LG en menor medida son fuentes importantes de péptidos bioactivos (ver siguiente sección)

### **Efectos de la foto-oxidación en la generación de péptidos bioactivos**

El valor nutricional de las proteínas lácteas como fuente de aminoácidos esenciales ha sido muy documentada, pero en 1980 se comenzó a reconocer el valor de algunas proteínas que son capaces de ejercer funciones in vivo a través de la generación de péptidos bioactivos. Los péptidos bioactivos se encuentran dentro de la secuencia primaria de la proteína en forma inactiva, cuando la proteína es sometida a digestión gastrointestinal las enzimas proteolíticas liberan estos péptidos. También esta generación de péptidos bioactivos podría ocurrir durante el procesamiento, ya sea por temperatura o fermentación. La producción y propiedades de los estos péptidos ha sido sujeto de revisión en la literatura [35-38]. Estas revisiones fueron utilizadas para realizar el listado utilizado en la identificación de Péptidos fotolíticos con bioactividad descrita (Tabla 4.2, sección 4.4).

Es interesante que la foto-oxidación fue capaz de liberar algunos de los péptidos descritos en la literatura como DMPIQAFLLYQEPVLPVR, RELEELNVPGEIVESLSSSEESITR (caseinofosfopéptido, función biológica ligando de  $\text{Ca}^{++}$ ) [39], VYVEELKPTPEGDLEILLQK, LDAQSAPLR, VLDTDYK y AASDISLLDAQSAPLR. Otros se encontraron comprendidos dentro de péptidos mayores como es el caso de la  $\beta$ -casoquinina-7 f(177-183), y para  $\beta$ -LG el péptido ALPMHIR f(142-148) cuya actividad biológica es inhibidor de la enzima acetilcolino esterasa (ACE). Estos péptidos han sido preparados por acción de enzimas proteolíticas. El rendimiento obtenido por estas técnicas es escaso, siempre menor al 10%, por lo tanto será interesante en un futuro determinar si la foto-fragmentación proteica por si misma o seguida de proteólisis enzimática es una alternativa para mejorar estos bajos rendimientos [40].

### **Efectos de la foto-oxidación en la unión de colorantes**

La unión de colorantes es uno de los rasgos sobresalientes de las proteínas, que ha sido utilizado para transportar moléculas con acción biológica (vitaminas) y farmacológicas, para remover moléculas que se desean separar de una mezcla y también para poder cuantificarlas [41-43].

En esta tesis se evaluaron los efectos de la foto-oxidación sobre la capacidad de unir colorantes utilizados en la cuantificación de proteínas. Como se explicó en las conclusiones del CAPITULO 4 la foto-oxidación produjo alteraciones en la unión Coomassie blue debido a la disminución de aminoácidos con cargas positivas sobre todo en el caseinato. La unión del cobre también se vio afectada, lo cual se tradujo en cambios importantes en la cuantificación.

En forma indirecta los datos de resistencia a la oxidación, de los aminoácidos prolina de  $\beta$ -LG muestran la fuerte interacción de un antioxidante (muy probablemente vitamina

D<sub>3</sub>) específicamente con la prolina 145. Esta conclusión es interesante por la función que desempeña la vitamina D<sub>3</sub> a nivel intestinal favoreciendo la absorción de calcio.

### **Conclusiones finales**

La primera conclusión general de esta tesis es el haber demostrado la utilidad de la oxiproteómica para determinar cómo algunos cambios en la estructura primaria de las proteínas estudiadas afectan su función biológica, como la capacidad de formar polímeros, de generar péptidos bioactivos y de unir moléculas pequeñas.

Esta tesis se inscribe en la corriente que está utilizando la proteómica alimentaria para analizar los alimentos ricos en proteínas y las modificaciones inducidas por el procesamiento. Nuestros resultados contribuyen demostrando que las proteínas lácteas industriales contienen alteraciones a nivel de aminoácidos que son producto del proceso de elaboración. También muestra las alteraciones a nivel de aminoácidos producidos por irradiación UV-C, tecnología que es utilizada en la industria como método para reducir la carga bacteriana.

## Bibliografía

1. Lundberg, Å., *Mastitis in Dairy Cows*, in *Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science Department of Clinical Sciences Uppsala and National Veterinary Institute Department of Animal Health and Antimicrobial Strategies* 2015, Swedish University of Agricultural Sciences: Uppsala.
2. Halder, U. C., et al., *Tryptophan dynamics in the exploration of micro-conformational changes of refolded  $\beta$ -lactoglobulin after thermal exposure: A steady state and time-resolved fluorescence approach*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2012. **109**: p. 50-57.
3. Davies, M. J., *Protein oxidation and peroxidation*. *Biochemical Journal*, 2016. **473** (7): p. 805-825.
4. Baker, E. and R. Hubbard, *Hydrogen bonding in globular proteins*. *Progress in biophysics and molecular biology*, 1984. **44** (2): p. 97-179.
5. Huber, R., et al., *Molecular structure of the bilin binding protein (BBP) from *Pieris brassicae* after refinement at 2.0 Å resolution*. *Journal of Molecular Biology*, 1987. **198**(3): p. 499-513.
6. Smith, C.A., et al., *Structure of copper-and oxalate-substituted human lactoferrin at 2.0 Å resolution*. *Acta Crystallographica Section D*, 1994. **50**(3): p. 302-316.
7. North, A., *Three-dimensional arrangement of conserved amino acid residues in a superfamily of specific ligand-binding proteins*. *International journal of biological macromolecules*, 1989. **11**(1): p. 56-58.
8. Brownlow, S., et al., *Bovine  $\beta$ -lactoglobulin at 1.8 Å resolution—still an enigmatic lipocalin*. *Structure*, 1997. **5** (4): p. 481-495.
9. Aulak, K.S., et al., *Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. **98** (21): p. 12056-12061.
10. Chiappetta, G., et al., *Quantitative identification of protein nitration sites*. *Proteomics*, 2009. **9** (6): p. 1524-1537.
11. Valley, C.C., et al., *The methionine-aromatic motif plays a unique role in stabilizing protein structure*. *Journal of Biological Chemistry*, 2012. **287** (42): p. 34979-34991.
12. Levine, R.L., et al., *Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996. **93** (26): p. 15036-15040.
13. Levine, R.L., et al., *Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage*. *Mechanisms of ageing and development*, 1999. **107** (3): p. 323-332.
14. Pedersen, K.O., *Ultracentrifugal and electrophoretic studies on the milk proteins: the lactoglobulin of Palmer*. *Biochemical Journal*, 1936. **30** (6): p. 961.
15. Georges, C., S. Guinand, and J. Tonnelat, *Etude thermodynamique de la dissociation réversible de la  $\beta$ -lactoglobuline B pour des pH supérieurs à 5*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1962. **59** (3): p. 737-739.
16. Townend, R. and S.N. Timasheff, *Molecular Interactions in  $\beta$ -Lactoglobulin. III. Light Scattering Investigation of the Stoichiometry of the Association between pH 3.7 and 5.22*. *Journal of the American Chemical Society*, 1960. **82**(12): p. 3168-3174.
17. Tsai, C.J., et al., *Studies of protein-protein interfaces: a statistical analysis of the hydrophobic effect*. *Protein Science*, 1997. **6** (1): p. 53-64.

18. Bahadur, R.P., et al., *Dissecting subunit interfaces in homodimeric proteins*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2003. **53** (3): p. 708-719.
19. Bello, M., et al., *Energetics of protein homodimerization: effects of water sequestering on the formation of  $\beta$ -lactoglobulin dimer*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2008. **70** (4): p. 1475-1487.
20. Yang, M.C., et al., *Evidence for  $\beta$ -lactoglobulin involvement in vitamin D transport in vivo—role of the  $\gamma$ -turn (Leu-Pro-Met) of  $\beta$ -lactoglobulin in vitamin D binding*. The FEBS Journal, 2009. **276** (8): p. 2251-2265.
21. Górska, A., et al., *Thermal properties of  $\beta$ -lactoglobulin-vitamin D<sub>3</sub> complexes obtained by different technological processes*. Chemical Technology. **61** (3): p. 22-26.
22. Knak, A., et al., *Exposure of vitamins to UVB and UVA radiation generates singlet oxygen*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2014. **13** (5): p. 820-829.
23. Huppertz, T., P. Fox, and A. Kelly, *The caseins: Structure, stability, and functionality*, in *Proteins in Food Processing (Second Edition)*. 2018, Elsevier. p. 49-92.
24. Livney, Y., A. Schwan, and D. Dalgleish, *A study of  $\beta$ -casein tertiary structure by intramolecular crosslinking and mass spectrometry*. Journal of Dairy Science, 2004. **87** (11): p. 3638-3647.
25. HadjSadok, A., et al., *Characterisation of sodium caseinate as a function of ionic strength, pH and temperature using static and dynamic light scattering*. Food Hydrocolloids, 2008. **22** (8): p. 1460-1466.
26. Dalsgaard, T.K., et al., *Dityrosine, 3, 4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), and radical formation from tyrosine residues on milk proteins with globular and flexible structures as a result of riboflavin-mediated photo-oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59** (14): p. 7939-7947.
27. Scheidegger, D., G. Larsen, and S.C. Kivatinitz, *Oxidative consequences of UV irradiation on isolated milk proteins: Effects of hydrogen peroxide and bivalent metal ions*. International Dairy Journal, 2016. **55**: p. 64-71.
28. Davies, M.J., *Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences*. Biochemical and biophysical research communications, 2003. **305** (3): p. 761-770.
29. Zhang, Z., D.L. Smith, and J.B. Smith, *Human  $\beta$ -crystallins modified by backbone cleavage, deamidation and oxidation are prone to associate*. Experimental eye research, 2003. **77** (3): p. 259-272.
30. Chicón, R., et al., *Hydrolysis under high hydrostatic pressure as a means to reduce the binding of  $\beta$ -lactoglobulin to immunoglobulin E from human sera*. Journal of food protection, 2008. **71** (7): p. 1453-1459.
31. Chicón, R., et al., *Influence of high hydrostatic pressure on the proteolysis of  $\beta$ -lactoglobulin A by trypsin*. Journal of Dairy Research, 2006. **73** (1): p. 121-128.
32. Deng, Y., H. Gruppen, and P.A. Wierenga, *Comparison of Protein Hydrolysis Catalyzed by Bovine, Porcine, and Human Trypsins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018. **66** (16): p. 4219-4232.
33. Vandermarliere, E., M. Mueller, and L. Martens, *Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics*. Mass spectrometry reviews, 2013. **32** (6): p. 453-465.
34. Olsen, J.V., S. E. Ong, and M. Mann, *Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues*. Molecular & Cellular Proteomics, 2004. **3** (6): p. 608-614.



35. Tu, M., et al., *Bioactive hydrolysates from casein: generation, identification, and in silico toxicity and allergenicity prediction of peptides*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018. **98** (9): p. 3416-3426.
36. Kamau, S.M., et al., *Functional significance of bioactive peptides derived from milk proteins*. Food Reviews International, 2010. **26** (4): p. 386-401.
37. Oliva, Y. and S. Vega, *Péptidos bioactivos derivados de las proteínas lácteas: propiedades y aplicaciones principales*. Rev. Salud Anim. Vol, 2004. **26** (3): p. 151-162.
38. Nagpal, R., et al., *Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update*. Food & function, 2011. **2** (1): p. 18-27.
39. Durazzo, A., *Milk: Bioactive Components and Role in Human Nutrition*. 2017, Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
40. Lucarini, M., *Bioactive Peptides in Milk: From Encrypted Sequences to Nutraceutical Aspects*. Beverages ed. A. Durazzo. Vol. 3. 2017. 48-57.
41. Bagatolli, L.A., et al., *Two distinguishable fluorescent modes of 1-anilino-8-naphthalenesulfonate bound to human albumin*. Journal of fluorescence, 1996. **6**(1): p. 33-40.
42. Kontopidis, G., C. Holt, and L. Sawyer, *Invited review:  $\beta$ -lactoglobulin: binding properties, structure, and function*. Journal of Dairy Science, 2004. **87** (4): p. 785-796.
43. Farrell, H.M., et al., *The caseins of milk as calcium-binding proteins*, in *Calcium-Binding Protein Protocols*. 2002, Springer. p. 97-140.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## Materiales

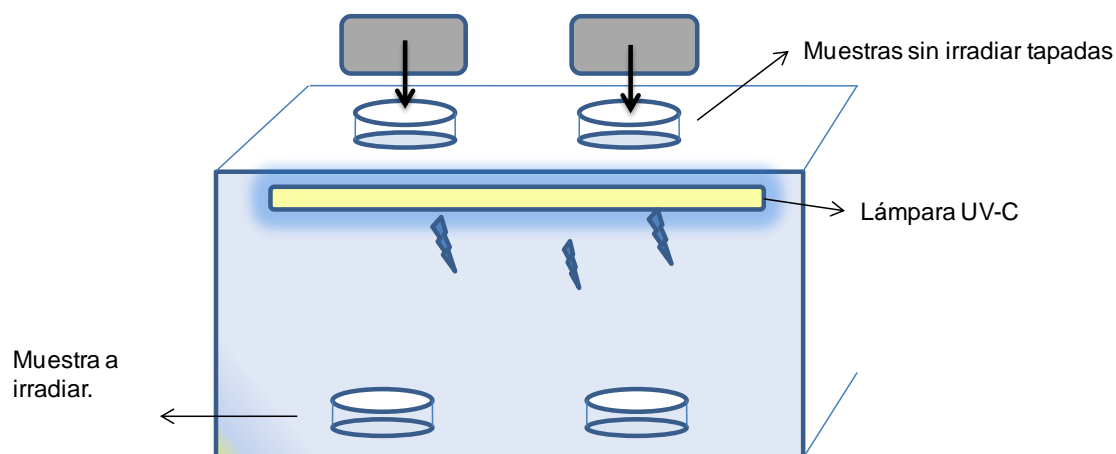
Reactivos y solventes: El kit de **Azul Brillante de Coomassie G-250** (Tetrahedron) fue obtenido de Tecnolab S.A. (Buenos Aires, Argentina), y el **Azul Brillante de Coomassie R-250** (Bradford) es de Biopack (Buenos Aires, Argentina). Reactivo de **ácido bicínónico** (2, 2'-Biquinoline-4, 4'- dicarboxylic acid) grado analítico fue obtenido de Fluka. **Guanidina** hidrociorada (ultrapura) fue obtenida de Genbiotech (Buenos Aires, Argentina). El reactivo de **Folin-Ciocalteu** fue obtenido de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La **acrilamida** para electroforesis es de Merck (Merck KGa, Darmstadt, Germany). **N-N'-Metilen-bis-acrilamida** es de Fluka (Fluka AG, Buchs SG, Switzerland).

**Albúmina sérica bovina**, BSA (Sigma), **Caseinato de sodio** (CN, C0228), fueron comprados en Todo Droga (Córdoba, Argentina). **WPI**, aislado de proteína de suero "Whey protein isolate" (proteína de suero en polvo, sin aditivos y sin sabor) obtenido de NATURE'S BEST, (Hauppauge, Nueva York)

## Modelo experimental

### Sistema de irradiación

La lámpara UV utilizada fue un tubo Hg UV-C TUV Philips (15 W/G15t8; Philips, Eindhoven, Holland), con una intensidad de  $2,34 \times 10^{19}$  quanta/s realizado por actinometría de ferrioxalato. El dispositivo de irradiación se muestra en la Figura 1.



**Figura 1.** Dispositivo para irradiación por luz UV-C

## **Métodos analíticos**

### **A. Kjeldahl**

Este método se realizó de acuerdo con la metodología de referencia (AOAC International, 2005; método 930.29) [1]. El porcentaje de nitrógeno obtenido se multiplicó por el factor 6,38 (factor utilizado para proteínas de la leche determinadas por el Capítulo V de la CAA) para calcular el porcentaje de proteína presente en cada muestra. (FAO food and nutrition, 2002).

La verificación de datos se realizó con las muestras impuras (WPI Y CN). Se necesitan al menos 0,3 gramos. Sigma Chemical Co. informó la cuantificación en la hoja de datos que acompañaba a las muestras.

### **B. Bradford**

La solución de proteínas se diluyó en 0,1 ml de agua y se le añadió el reactivo de Bradford G-250 [2]. La absorbancia se midió usando un espectrofotómetro Mini Spec UV-visible (Shimadzu, Kyoto, Japan) a 595nm.

### **C. Lowry**

El contenido de proteína en las muestras fue determinado con el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu con la modificación introducida por Hartree [3]. Las muestras se diluyeron en 0,5 ml de agua. Se añadió 0,5 ml del reactivo A y se incubó durante 10 min, luego se agregó 0,5 ml del reactivo B y se incubó durante 30 min. La absorbancia se midió usando un espectrofotómetro Mini Spec UV-visible (Shimadzu, Kyoto, Japan) a 750nm.

### **D. Ácido Bicincónico (BCA)**

La proteína se midió empleando el método propuesto por Smith en 1985 [4]. Se añadió 1 ml de BCA (50 volumen de reactivo A y 1 volumen de reactivo B) a 0,1 ml de la muestra. Posteriormente se dejó a incubar durante 2 horas a 37 °C. La absorbancia se midió usando un espectrofotómetro Mini Spec UV-visible (Shimadzu, Kyoto, Japan) a 562nm.

### **E. Espectrofotometría de absorción UV**

Las muestras (1µg / ml) se disolvieron en Guanidina HCl (6 M, 0,6 ml). Los datos espectrales (200-400 nm) se obtuvieron utilizando un UV-240 1PC, UV- VIS espectrofotómetro (modelo SHIMADZU TCC- 240A).

### **F. Milkoscan**

Realizado en la Escuela Superior Integral de Lechería (ESIL, Villa María, Córdoba, Argentina), utilizando un aparato MilkoScan<sup>TM</sup> FT+ Serie N°: 91748205 -Part N° 60027086-2014- Familia 01-45. Y siguiendo el método recomendado por la asociación oficial de Químicos Analíticos 1984 [5].

## **G. Análisis elemental CHN**

Realizado en el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV) CONICET - FCEfyN, UNC (Córdoba, Argentina), utilizando el Analizador elemental CHNSO Serie II, Perkin Elmer, Modo CHN. Los datos fueron adquiridos empleando el programa EA 2400 Data Manager [6].

## **H. Cuantificación de triptófano, ditirosina y NFK por espectroscopia de fluorescencia**

La cuantificación se realizó utilizando un espectrofluorómetro automático, Fluoromax-P de Horiba Jobin Yvon. Se cuantificó triptófano excitando a 295 nm y determinando la emisión a 360 nm. La formación de ditirosina fue monitoreada excitando a 315 nm y monitoreando el aumento a 410 nm en el espectro de emisión, como fue reportado previamente [7]. La ditirosina tiene el espectro de emisión característico del estándar auténtico con un máximo a 410 nm [8]. *N*-formilquinurenina fue cuantificada utilizando como longitud de onda de excitación y de emisión 325 nm y 435 nm, respectivamente [9]. Los datos fueron expresados como Unidades Arbitrarias de Fluorescencia (AFU). Las determinaciones se realizaron por triplicado

## **I. Geles de poliacrilamida en condiciones reductoras y desnaturizantes (SDS-PAGE)**

La electroforesis en gel con SDS fue realizada de acuerdo con Jovanovic et al. (2007), usando un gel retenedor al 3% y un gel separador al 15%. Previo a realizar la electroforesis, las muestras fueron diluidas 20 veces en agua miliQ, se les agregó el buffer de muestra Laemmli que contiene 2,5% de  $\beta$ -mercaptoetanol (Laemmli, 1970). La unidad de electroforesis vertical Mini-Protean III system (BioRad Corp., Richmond, CA) fue utilizada en conjunto con la fuente Electrophoresis Power Supply- EPS 301. El gel fue teñido con 0,25% Coomassie Blue R-250 durante 24 hs y desteñido en una solución de metanol:acético:agua (20% metanol, 10% ácido acético). Los geles desteñidos fueron escaneados (Epson Stylus TX115 scanner) y cuantificados por análisis de la densitometría con un programa de análisis de uso gratuito llamado Gel analyser. Se eligió trabajar en condiciones reductoras para evitar la observación de agregados/oligómeros no covalente, por lo tanto no están presentes enlaces disulfuro.

## **J. Oxiproteómica**

Espectrómetro de masa: Se utilizó un espectrómetro marca ThermoScientific, modelo Q-Exactive. El equipo cuenta con una celda de HCD (High Collision Dissociation) y un analizador Orbitrap. La configuración del equipo permite que la identificación de los péptidos se realice al mismo tiempo que los mismos se separan por cromatografía, obteniendo Full MS y MSMS. Se utilizó un método que realiza la mayor cantidad de ciclos de medición por unidad de tiempo. La duración del ciclo depende de la resolución utilizada. En cada ciclo el equipo hace un Full MS y luego hace MSMS a los 12 picos de mejor señal ruido en ese ciclo, con un rango de exclusión dinámico para disminuir el número de veces que un mismo péptido es fragmentado a lo largo de su elución del cromatograma.

Tratamiento de la muestra: La muestra fue resuspendida en buffer Bicarbonato de amonio 50 mM pH=8 y se digirió con tripsina (corta a la derecha de Lys y Arg) durante toda la noche. La muestra fue liofilizadas por Speed Vac y vuelta a resuspender con 10 ul de Ácido Fórmico 0,1%. Se analizó por nanoHPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap, lo que nos permite en primer lugar una separación de los péptidos obtenidos por digestión trípica de la muestra y una posterior identificación de los mismos. La ionización de las muestras se realiza por electrospray. El análisis de los datos obtenidos se realiza con el programa Proteome Discoverer.

### **K. Análisis de la integridad de la proteína nativa**

Equipamiento utilizado:

Infusor: automático con jeringa

Fuente ESI: Apollo (Bruker)

Espectrómetro de masas: microTOFQ II (Bruker)

Para el procesamiento de datos se utilizó el software Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics, Alemania) y para la deconvolución, e utilizó el algoritmo de Máxima Entropía, en forma manual, en un rango entre 400 y 100.000 Da.

### **L. Análisis estadísticos**

Las curvas cinéticas y constantes de velocidad de los datos promediados fueron generadas utilizando el programa Simfit (versión 6.0.18, de la Universidad de Manchester, Manchester, Reino Unido; <http://simfit.man.ac.uk>). Los datos fueron la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos separados, cada uno determinado por triplicado. La comparación estadística de los modelos de regresión no lineal se realizó mediante una prueba F utilizando las sumas adicionales del principio de los cuadrados. La regresión no lineal por cuadrados mínimos se realizó mediante los programas de Sim-Fit o GraphPad PRISMk 4,02 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los experimentos se realizaron por lo menos por duplicado o por triplicado de las muestras. Los datos obtenidos fueron la media  $\pm$  SEM obtenidos de 3 experimentos separados, cada uno por determinaciones por triplicado.

## Bibliografía

1. Kjeldahl, J., *Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpern*. Zeitschrift für analytische Chemie, 1883. **22** (1): p. 366-382.
2. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. **72** (1-2): p. 248-254.
3. Hatree, E., *Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response*. Anal Biochem., 1972. **48**: p. 422-427.
4. Smith, P.E., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical biochemistry, 1985. **150** (1): p. 76-85.
5. AOAC, A., *Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, AOAC*. 1984.
6. Fadeeva, V., V. Tikhova, and O. Nikulicheva, *Elemental analysis of organic compounds with the use of automated CHNS analyzers*. Journal of analytical chemistry, 2008. **63** (11): p. 1094-1106.
7. Heinecke, Jay W., et al. *Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages*. Journal of Biological Chemistry, 1993, **268** (6): p. 4069-4077.
8. Capeillere-Blandin, Chantal; Delaveau, Thierry; Descamps-Latscha, Beatrice. *Structural modifications of human  $\beta$ 2 microglobulin treated with oxygen-derived radicals*. Biochemical journal, 1991. **277** (1): p. 175-182.
9. Fukunaga, Yasutsugu, et al. *Fluorescence characteristics of kynurenine and N'-formylkynurenine, their use as reporters of the environment of tryptophan 62 in hen egg-white lysozyme*. The Journal of Biochemistry, 1982. **92** (1): p. 129-141.