

## Tesis de Maestría

# Efecto de las propiedades termofísicas del medio sobre la actividad y resistencia térmica de enzimas en condiciones extremas

Gutiérrez, Nora Ester

2007

Tesis presentada para obtener el grado de Magister de la Universidad de Buenos Aires en el área de Bromatología y Tecnología de la Industrialización de los Alimentos de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Gutiérrez, Nora Ester. (2007). Efecto de las propiedades termofísicas del medio sobre la actividad y resistencia térmica de enzimas en condiciones extremas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n4455\\_Gutierrez](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4455_Gutierrez)

Cita tipo Chicago:

Gutiérrez, Nora Ester. "Efecto de las propiedades termofísicas del medio sobre la actividad y resistencia térmica de enzimas en condiciones extremas". Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2007.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n4455\\_Gutierrez](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4455_Gutierrez)

**EXACTAS**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**BIBLIOTECA CENTRAL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**  
**Y NATURALES / UBA**

*Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento Industrias*



*“Efecto de las propiedades termofísicas  
del medio sobre la actividad y resistencia  
térmica de enzimas en condiciones  
extremas”*

78845

*Autora: Bioq. Nora Ester Gutiérrez*

*Tesis para optar al título de Magíster en “Bromatología y  
Tecnología de la Industrialización de los Alimentos”*

*Directora: Dra. María del Pilar Buera  
Co-Directora: Dra. María Florencia Mazzobre*

2007

## Agradecimientos

*A la Dra. María del Pilar Buera por su generosidad, sus valiosos aportes para la elaboración de la Tesis y su compromiso constante.*

*A la Dra. María Florencia Mazzobre, por su dedicación, apoyo y sus minuciosas lecturas que enriquecieron este trabajo.*

*A toda la gente del Laboratorio de Industrias, que conforma un grupo estimulante y afectuoso.*

# INDICE

## INDICE

<b>I. INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
I.A. ESTABILIDAD ENZIMATICA .....	1
I.B. SÓLIDOS AMORFOS Y TRANSICIONES DE FASE. ....	2
I.B.1. DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE TRANSICIÓN VÍTREA.....	6
I.B.2. EFECTO PLASTIFICANTE DEL AGUA .....	11
I.B.3. RELACION ENTRE PESO MOLECULAR Y Tg. ....	13
I.B.4. CAMBIOS RELACIONADOS CON LA TRANSICIÓN VÍTREA.....	14
I.C. ISOTERMAS DE SORCIÓN DE AGUA Y ESTADO FÍSICO .....	17
I.D. DIAGRAMAS DE ESTADO .....	19
I.E. ASPECTOS TECNOLÓGICOS .....	22
I.E.1. CONGELACIÓN .....	22
I.E.2. ESTRÉS CAUSADO POR LA LIOFILIZACIÓN .....	24
I.E.3. ESTRATEGIAS DE PROTECCIÓN.....	26
I.E.4. MECANISMOS DE PROTECCIÓN.....	27
I.E.4.a Adición de osmolitos.....	27
I.E.4.b Vitrificación .....	28
I.E.5. EFECTO DEL AGREGADO DE SALES .....	32
I.E.6 INTERACCION EN MATRICES COMBINADAS AZUCAR/SAL .....	32
I.F. ENZIMAS COMO MARCADORES DE LA ESTABILIDAD DE LOS SISTEMAS AMORFOS .....	36
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
III.A. ELECCIÓN DE ENZIMAS Y SISTEMAS MODELOS.....	38
III.B. MATERIALES.....	38
FUENTES BIOLÓGICAS:.....	40
SISTEMAS:.....	41
➤ Sistemas líquidos.....	41
➤ Sistemas modificados.....	42
➤ Sistemas combinados o mezclas Trehalosa/Sal.....	42
III.C. PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS MODELO.....	44
III.C.1. SISTEMAS AMORFOS CONGELADOS.....	44

III.C.2. SISTEMAS AMORFOS DESHIDRATADOS.....	44
III.D. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AGUA EN SISTEMAS DESHIDRATADOS.....	45
III.E. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO.....	45
III.F. DILUCIÓN ÓPTIMA Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA REMANENTE.....	46
III.F.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	46
III.F.1.1. Amilasa.....	46
III.F.1.2. Ureasa.....	47
III.F.1.3. Aspartato amino transferasa GOT (AST).....	48
III.G. PROPIEDADES TERMOFÍSICAS.....	50
III.G.1. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC):.....	50
III.G.2. DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE TRANSICIÓN VÍTREA (Tg):.....	50
III.G.3. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE CRISTALIZACIÓN DE AZÚCAR O AGUA:.....	51
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
<b>IV. A. ESTABILIDAD DE LAS ENZIMAS EN MODELOS DE ALIMENTOS CONGELADOS.....</b>	<b>52</b>
IV A.1. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ESTABILIDAD DE LAS DIFERENTES ENZIMAS EN LOS SISTEMAS CONGELADOS.....	53
IV.A.1.a. Amilasas (miel, soja, malta).....	56
IV.A.1.b. Ureasa (soja, malta).....	57
IV.A.1.c. Aspartato amino transferasa (GOT/AST) (soja).....	57
IV.A.2. ESTRATEGIAS PARA AUMENTAR LA ESTABILIDAD ENZIMÁTICA EN MODELOS DE ALIMENTOS CONGELADOS.....	58
IV. A.2.1 Estabilidad de las enzimas de sistemas modelos de alimentos congelados en presencia de trehalosa.....	59
IV A.2.2. Efectos de la proporción de sólidos sobre la estabilidad al congelado de la enzima amilasa del sistema de miel.....	62
IV.A.3. ESTABILIDAD DE LAS ENZIMAS DE SISTEMAS MODELOS DE ALIMENTOS CONGELADOS EN SOLUCIONES SALINAS O SOLUCIONES SALINAS COMBINADAS CON TREHALOSA.....	68
IV A.3.1. Amilasas en sistemas de miel.....	69
IV.A.3.2. Aspartato amino transferasa (GOT/AST) (soja).....	77
IV.A.3.3. Conclusiones de la sección.....	80

IV.A.4. CARACTERISTICAS FÍSICAS DE LOS SISTEMAS SOBRESTURADOS POR CONGELACION EN RELACIÓN CON SU CAPACIDAD PROTECTORA.....	82
IV.A.4.1. Sistemas conteniendo miel. Efectos del agregado de agua y trehalosa en el comportamiento térmico.....	82
IV.A.4.2. Efecto del agregado de sales en los sistemas miel y miel/trehalosa. Transición vítreo y cristalización de hielo.....	95
IV.A.4.3. Efecto del agregado de sales en el sistema enzimático de soja con trehalosa sobresaturado por congelación: Transición vítreo y cristalización de hielo.....	100
IV.A.5. DIAGRAMA DE ESTADO Y ESTABILIDAD ENZIMÁTICA.....	105
IV.A.5.1. Sistemas de miel.....	105
IV.A.5.2. Sistema E.A.S./Treh. (W=0.8).....	108
<b>IV. B. ESTABILIDAD TÉRMICA DE LAS ENZIMAS EN MODELOS DE ALIMENTOS DESHIDRATADOS.....</b>	<b>110</b>
IV.B.1. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ESTABILIDAD DE LAS DIFERENTES ENZIMAS EN LOS SISTEMAS SOBREENFRIADOS CON EL AGREGADO DE TREHALOSA.....	114
IV.B.1.1. Efectos del contenido de agua.....	114
IV.B.1.2. Efecto de la cristalización del disacárido trehalosa sobre la capacidad protectora del azúcar.....	117
IV.B.2. EMPLEO DE MATRICES COMBINADAS TREHALOSA / SAL....	121
IV.B.2.1. Análisis comparativo de la estabilidad de las diferentes enzimas en los sistemas liofilizados trehalosa /sal.....	122
IV.B.3. ANÁLISIS DE PROPIEDADES FÍSICAS EN SISTEMAS COMBINADOS AZÚCAR/SAL.....	128
IV.B.3.1. Cristalización del azúcar en los sistemas liofilizados trehalosa/sal.....	129
IV.B.3.2. Adsorción de agua en sistemas liofilizados trehalosa/sal.....	131
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>136</b>
<b>IV. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>140</b>

# **I. INTRODUCCIÓN**

## **I. INTRODUCCIÓN**

Las enzimas son ideales para generar cambios claves en las propiedades funcionales de los alimentos (Kristjánsson y Kinsella, 1991), eliminar componentes tóxicos y producir nuevos ingredientes (Fennema, 2000). Existen numerosos usos actuales y potenciales de enzimas a escala industrial con distintos fines: por ejemplo, la eliminación de antinutrientes en materias primas alimentarias puede ser realizada a través de ellas, la síntesis de aromas puede realizarse enzimáticamente y, mediante la acción de enzimas específicas, muchas plantas podrían ser utilizadas como fuente de alimentos. Aunque muchas veces no son la causa de la pérdida de calidad de un cierto producto, sus actividades se correlacionan con la estabilidad de alimentos almacenados.

La variación de la actividad enzimática es considerada en numerosos estudios como una evidencia indirecta de las alteraciones en la estructura nativa de las proteínas ante diferentes condiciones de estrés (osmótico, térmico, etc.) (Burg y col. 1996, 1999; Fields y col., 2001). Se emplean entonces como indicadores, en procesos tales como congelación, descongelación o tratamiento térmico.

### **I.A. ESTABILIDAD ENZIMÁTICA**

La estabilidad térmica de las proteínas está relacionada con el contenido y la actividad de agua (Mozhaev y Martinek, 1982; Chen y col, 1999; Mazzobre y col, 2003). Desde un punto de vista físico, la cinética de inactivación depende de la movilidad

molecular de las mismas y de los otros componentes del medio; está gobernada por las transiciones de fase (congelación, fusión) y estado (transiciones vítreas) a que se somete el sistema. Por eso se puede mejorar la estabilidad de muchas proteínas que son inestables en solución restringiendo el contenido de agua de los sistemas (por secado, congelación o liofilización) en presencia de agentes adecuados (Franks, 1994).

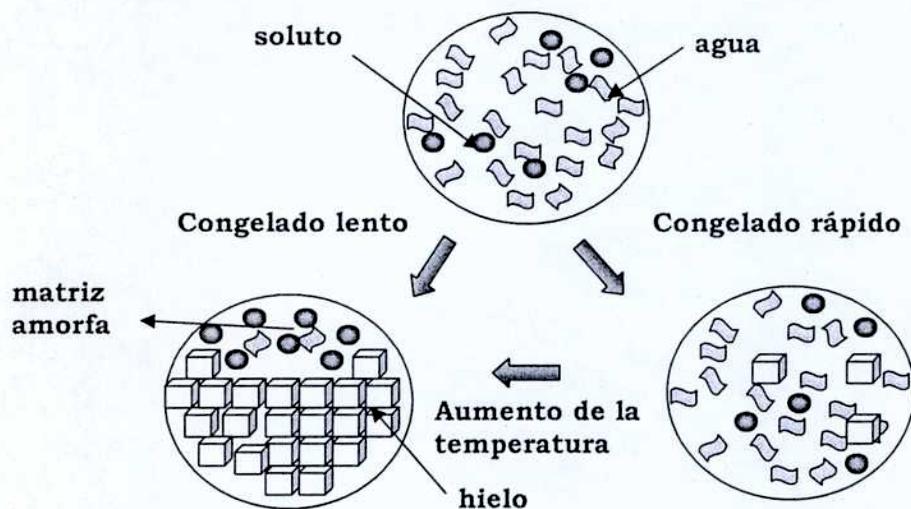
La liofilización es el proceso de elección para preservar biomoléculas deshidratadas, pero el proceso en sí mismo puede inactivar ciertas proteínas (Carpenter y col., 1987; Izutsu y col., 1995) y no garantiza una estabilidad adecuada a largo plazo a temperatura ambiente. La investigación de la estabilidad de enzimas en sistemas secos, semihúmedos y/o congelados tiene gran importancia práctica en biotecnología (Mozhaev, 1993), en el desarrollo de proteínas con aplicaciones en el cuidado de la salud humana (Wang y Pearlman, 1993; Thornton y Ballow, 1993) y en el procesamiento de alimentos (Kristjánsson y Kinsella, 1991; Romero y Barret, 1997; Espin e Islam, 1998). Es importante evaluar en qué medida los cambios físicos provocados por cambios de fase y estado afectan la estabilidad de enzimas en sistemas de humedad reducida y/o crioconcentrados, al provocar cambios en la movilidad molecular de las matrices y de las proteínas contenidas en ellas.

## **I.B. SÓLIDOS AMORFOS Y TRANSICIONES DE FASE.**

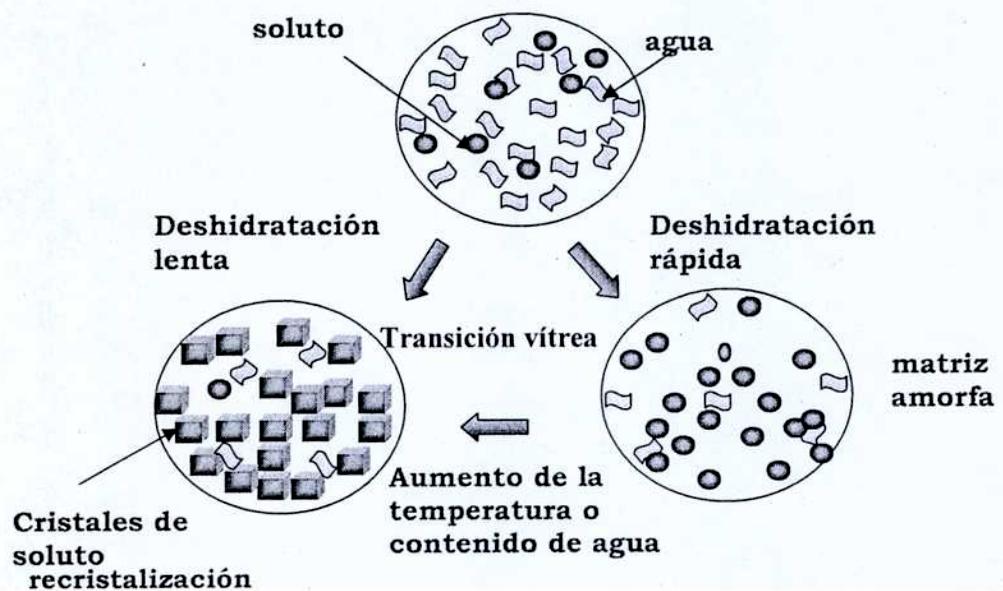
En los alimentos deshidratados o congelados se generan regiones amorfas, con un orden molecular azaroso (sólidos no cristalinos o líquidos sobresaturados). Los sólidos

amorfos y líquidos sobre-enfriados son materiales meta-estables con alta viscosidad y baja movilidad molecular, existen en un estado de no-equilibrio y exhiben cambios dependientes del tiempo a medida que se acercan al equilibrio. Los biopolímeros, las proteínas y las moléculas pequeñas como los azúcares pueden existir en estado sólido amorfó (no cristalino). Uno de los objetivos del procesado de alimentos consiste en mantener los atributos de este estado amorfó (termodinámicamente inestable) de forma de conservar una meta-estabilidad máxima. Un material amorfó está en un estado de no equilibrio y puede pasar de estado vítreo a líquido sobre-enfriado dependiendo de la temperatura, el tiempo y de la presencia de agua. Mantener el estado vítreo es importante porque la movilidad de las moléculas se reduce enormemente (Sperling, 1986) y los cambios limitados por difusión están cinéticamente retrasados o impedidos. Muchos cambios químicos y estructurales ocurren muy lentamente en los sistemas vítreos, tal que estos cambios no se perciben en marcos de tiempo prácticos. Específicamente la obtención de alimentos o sistemas en estado amorfó vítreo se logran por la remoción rápida del agua mediante los siguientes procesos: a) Congelación rápida de una solución; b) Concentración rápida de una solución (o dispersión) seguida de enfriamiento rápido; c) Deshidratación rápida de una solución (o dispersión): liofilización o secado por spray y d) Fusión térmica de azúcares cristalizados y enfriamiento rápido. Si la remoción de agua de la matriz inicial es lenta, las moléculas de soluto o de agua pueden reordenarse para formar una estructura cristalina termodinámicamente más estable. Este estado es caracterizado por poseer extensas regiones ordenadas, una baja movilidad molecular y muy poco espacio entre las moléculas. En la Figura I.1. se esquematizan los posibles cambios de fase y generación de matrices amorfas durante el procesado y almacenamiento de enzimas.

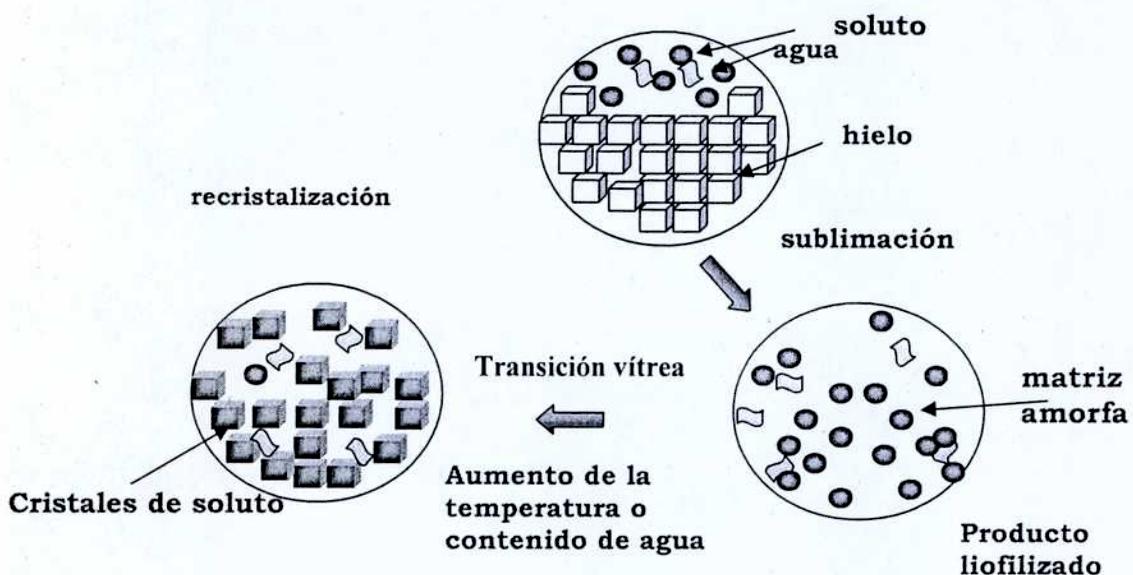
a) En productos congelados



b) En productos deshidratados



## c) Durante la liofilización



**Figura I.1** Esquema de la formación de un sólido amorfó o cristalino partir de una solución mostrando las posibles transiciones de fase y estado involucradas (adaptado de Karmas, 1994.)

El cambio en el estado físico que sufre un material amorfó vitreoso al pasar al estado de líquido sobre enfriado se conoce como transición vitreosa. Esta transformación ocurre a cierta temperatura, temperatura de transición vitreosa ( $T_g$ ), que depende del contenido de agua y de las características de cada sistema. A temperaturas menores que  $T_g$ , el sólido amorfó en estado vitreoso, tiene un desorden molecular parecido a un líquido, pero se puede considerar un sólido (capaz de soportar su propio peso) por su alta viscosidad, cuyo valor es mayor de  $10^{14}$  cP (Sperling, 1986). Los sistemas vitreos se pueden considerar estables a cambios físicos y químicos (Levine y Slade, 1986; Slade y Levine, 1991; Jouppila, 1999). A temperaturas mayores de  $T_g$  el sistema o parte de él se encuentra entre los estados líquido y

vítreo en condiciones de sobre-enfriamiento, que definen su naturaleza viscoelástica o “rubbery”, término utilizado en la ciencia de los polímeros sintéticos. Cuando se utilizan matrices no poliméricas, como las formadas por azúcares, el término líquido sobreenfriado es el adecuado (Angell y col., 1994). En este estado el material adquiere propiedades más parecidas a las de un líquido, ocurre una disminución importante de la viscosidad, aumenta el volumen libre (volumen no ocupado por los sólidos de la matriz), aumenta la movilidad molecular y se producen cambios químicos y físicos importantes que afectan características sensoriales (encogimiento estructural o colapso de la matriz, apelmazamiento, liberación de aromas).

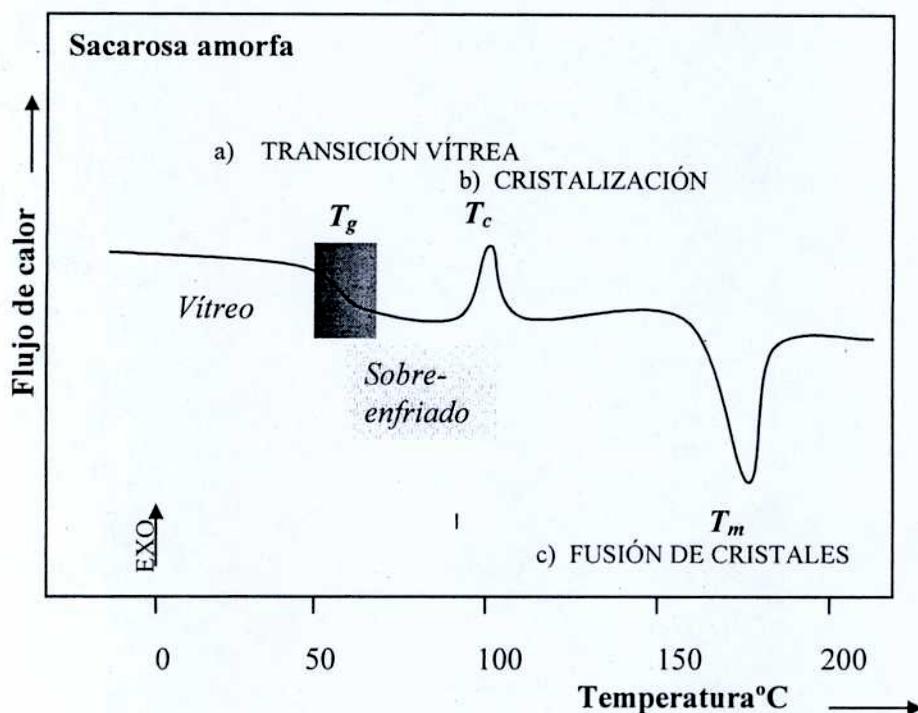
Muchos estudios han mostrado que las transiciones vítreas y los cambios de fases afectan la cinética de las reacciones enzimáticas o la estabilidad de las proteínas (Paker y Ring, 1995; Mazzobre y col., 2003; Burin y col., 2004; Buera y col., 2005; Acevedo y col., 2006). Las proteínas también muestran una transición dinámica “tipo vidrio” con temperaturas de transición vítreo que disminuye con la hidratación (Gregory, 1998); el agua plastifica la proteína dando lugar a cambios en su conformación nativa o estado plegado (Lehninger, 1973).

#### I.B.1 DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE TRANSICIÓN VÍTREA.

La transición vítreo es considerada como uno de los cambios más importantes en el estado físico de los sistemas amorfos y la determinación de  $T_g$  de los alimentos o matrices complejas sería muy útil para predecir y controlar su estabilidad (Levine y Slade, 1986,

1988, 1989, 1990). La transición vítrea tiene algunas de las características de una transición termodinámica de segundo orden, por la forma en que produce cambios en propiedades dieléctricas, mecánicas (viscosidad) y térmicas (entalpía, volumen libre, capacidad calorífica, coeficiente de expansión térmica), pero es en realidad una transición de naturaleza cinética, y su origen e interpretación están en constante estudio. Diversos métodos dinámicos permiten determinar  $T_g$  midiendo una de las propiedades mencionadas, cambiando la frecuencia, el tiempo o la temperatura (Roos, 1995).

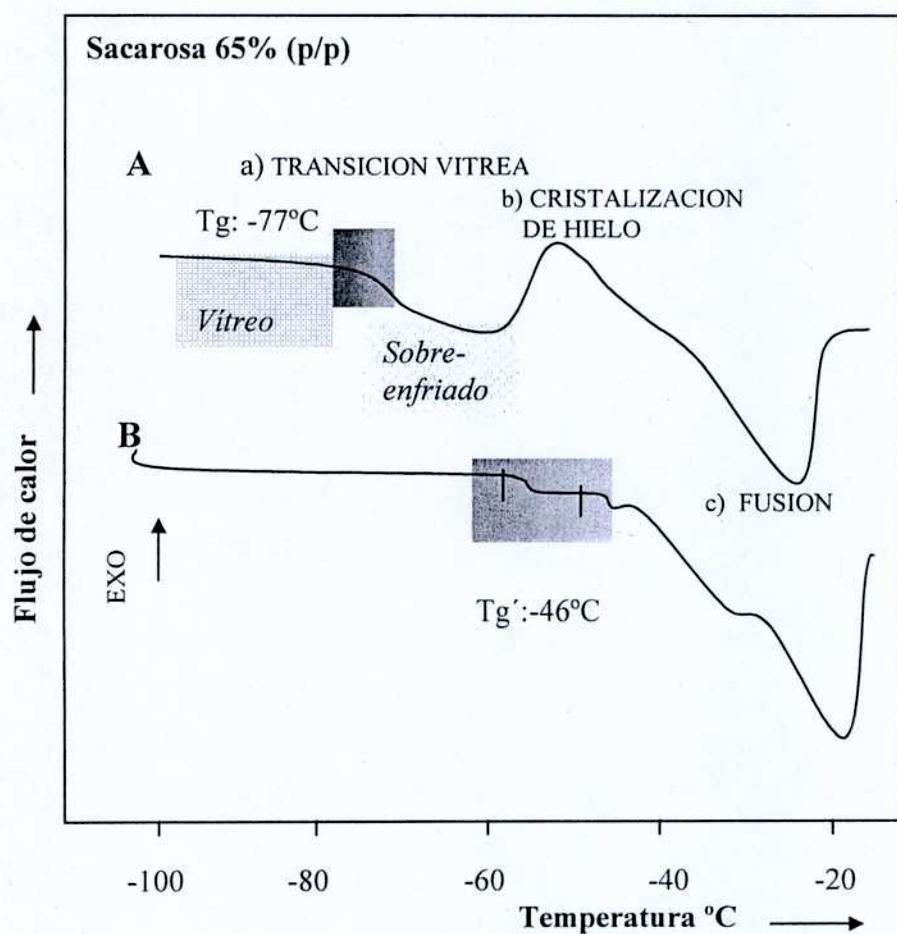
La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es la técnica comúnmente empleada para el estudio de propiedades físicas de los sistemas en el campo de la investigación y en la ciencia de los alimentos (Roos, 1987; Rubin y col., 1990; Lupano, 1997; Sallinen y Roos, 1998; Cordella y col., 2002). La transición vítrea se determina a través del cambio en el calor específico ( $\Delta C_p$ ) del material al ocurrir la transición. La muestra se calienta en una cápsula sellada a velocidad constante, utilizando una cápsula vacía como referencia. Las diferencias del flujo de calor entre ambas, en función del tiempo y la temperatura, son registradas en forma de termogramas. Así, el material amorfó puede ser caracterizado por su temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ). Este fenómeno es ampliamente conocido en polímeros (Redfern, 1991), en azúcares (Wang y Haymet, 1998; Carstensen y Van Scoik, 1990) y en diversos alimentos complejos (Kantor y col., 1999). En la Figura I.2. se observan los eventos térmicos típicos producidos durante el calentamiento por DSC de un azúcar liofilizado que muestra los cambios de fase (cristalización, fusión) y estado ( $T_g$ ) (Roos, 1992).



**Figura I.2.** Termograma de sacarosa amorfica mostrando la transición vítrea, cristalización y fusión típicos de materiales amorfos cristalizables (adaptado de Roos, 1992).

El cambio en el  $\Delta C_p$  del sólido que ocurre a la temperatura de transición vítrea de la muestra, se evidencia como un cambio en la línea de base del termograma. A temperaturas mayores que  $T_g$ , el azúcar se transforma en un líquido sobre-enfriado. A medida que la temperatura y la movilidad aumentan y la viscosidad disminuye, las moléculas de azúcar pueden reorientarse hasta alcanzar un estado termodinámicamente más estable como lo es la estructura cristalina. La cristalización se manifiesta como un pico exotérmico en el termograma a una temperatura  $T_c$ . Al incrementar aun más la temperatura, el azúcar funde produciendo un pico endotérmico a la temperatura  $T_m$ . En los sistemas más complejos (como la mayoría de los alimentos) los valores de  $T_g$  obtenidos por calorimetría diferencial

de barrido dependen de las condiciones experimentales empleadas y deben ser interpretadas adecuadamente en base a su historia térmica. Por ejemplo, los termogramas de la Figura I.3 muestran los eventos térmicos ocurridos durante el barrido dinámico de temperatura de un sistema binario simple de sacarosa/agua con distinta historia térmica (A: enfriamiento rápido y B: condiciones de máxima formación de hielo).



**Figura I.3.** Formación de hielo en soluciones de 60% de azúcares bajo distintas condiciones de enfriamiento. A: enfriamiento rápido ( $50^\circ\text{C}/\text{min}$ ) donde la formación de hielo fue insignificante, el agua queda amorfa y puede cristalizar luego de  $T_g$ . B: termograma obtenido luego de mantener la solución durante 30 min. a  $-35^\circ\text{C}$  (condiciones de máxima formación de hielo entre  $T_g$  y  $T_m$ ) y enfriarlo luego a  $-100^\circ\text{C}$ ;  $T_g$  cercana a  $T_g'$  por crió concentración.

En los termogramas de soluciones diluidas de azúcares se pueden analizar las transiciones entálpicas en relación con la cristalización/fusión de hielo. Si la solución es enfriada rápidamente (Figura 1.3. A) la muestra sobreenfriada alcanza la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) sin la formación de cristales de hielo debido a impedimentos cinéticos y el agua inmovilizada en la fase amorfa luego cristaliza y funde durante el calentamiento dinámico. Si se almacena a temperaturas entre  $T_g$  y  $T_m$  (Figura 1.3. B) la velocidad de enfriamiento es lenta y se establecen equilibrios sólido - líquido que posibilitan la formación de cristales de hielo en la solución sobreenfriada. Al congelar agua, la concentración de solutos en la fase amorfa aumenta y durante el calentamiento dinámico la transición vítrea ocurre a una temperatura ( $T_g$ ) mayor que si el sistema fuera enfriado rápidamente porque tiene menos agua. A medida que se logra congelar más hielo, el salto en la línea de base que corresponde a la  $T_g$  del sistema se va acercando a  $T_g'$ .  $T_g'$  es una  $T_g$  que se manifiesta en muestras que contienen hielo, cuando están en su máxima crioconcentración ( $C_g'$ ), valor constante para cada sustancia, independiente de su concentración inicial. ( $T_g'$ ,  $C_g'$ ) son puntos quasi invariables, difícil de medir en el diagrama de estado temperatura-composición.

Para el estudio de transiciones de fases pueden aplicarse otros métodos, aparte de los calorimétricos, con distinta sensibilidad. Ellos miden una propiedad (mecánica, dieléctrica) que puede aportar distinta información, como cambios en los módulos dinámicos o dieléctricos de materiales amorfos en función de la temperatura o del tiempo (Cocero y Kokini, 1991; Le Meste y col., 1991; Kalichesky y col., 1992; de Graaf y col., 1993; Golf, 1995). Hay también técnicas espectroscópicas importantes, como la resonancia magnética nuclear (NMR) y resonancia de espín electrónico (ESR) que permiten detectar los cambios

En los termogramas de soluciones diluidas de azúcares se pueden analizar las transiciones entálpicas en relación con la cristalización/fusión de hielo. Si la solución es enfriada rápidamente (Fig. 1.3. A) la muestra sobreenfriada alcanza la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) sin la formación de cristales de hielo debido a impedimentos cinéticos y el agua inmovilizada en la fase amorfa luego cristaliza y funde durante el calentamiento dinámico. Si se almacena a temperaturas entre  $T_g$  y  $T_m$  (Fig. 1.3. B) la velocidad de enfriamiento es lenta y se establecen equilibrios sólido - líquido que posibilitan la formación de cristales de hielo en la solución sobreenfriada. Al congelar agua, la concentración de solutos en la fase amorfa aumenta y durante el calentamiento dinámico la transición vítrea ocurre a una temperatura ( $T_g$ ) mayor que si el sistema fuera enfriado rápidamente porque tiene menos agua. A medida que se logra congelar más hielo, el salto en la línea de base que corresponde a la  $T_g$  del sistema se va acercando a  $T_g'$ .  $T_g'$  es una  $T_g$  que se manifiesta en muestras que contienen hielo, cuando están en su máxima crioconcentración ( $C_g'$ ), valor constante para cada sustancia, independiente de su concentración inicial. ( $T_g'$ ,  $C_g'$ ) son puntos quasi invariables, difícil de medir en el diagrama de estado temperatura-composición.

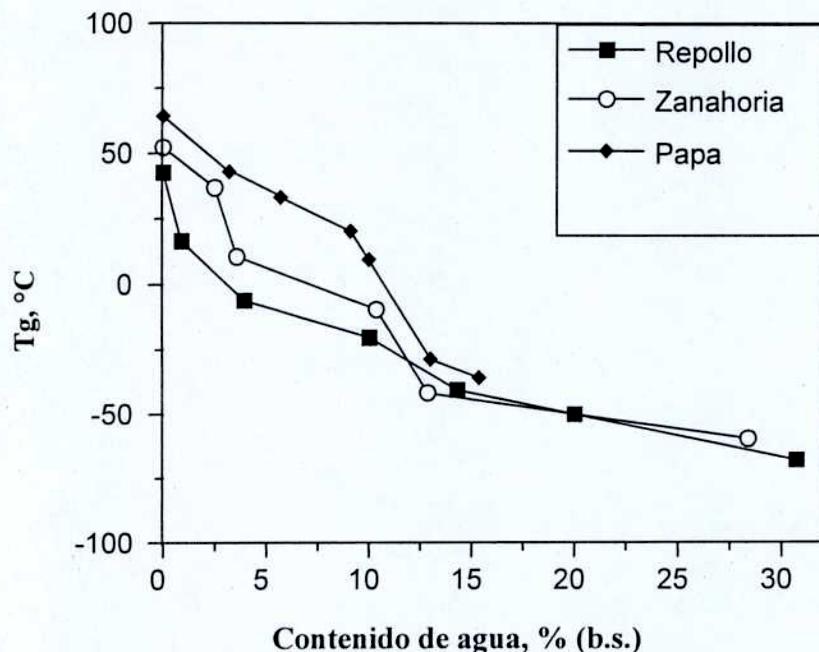
Para el estudio de transiciones de fases pueden aplicarse otros métodos, aparte de los calorimétricos, con distinta sensibilidad. Ellos miden una propiedad (mecánica, dieléctrica) que puede aportar distinta información, como cambios en los módulos dinámicos o dieléctricos de materiales amorfos en función de la temperatura o del tiempo (Cocero y Kokini, 1991; Le Meste y col., 1991; Kalichesky y col., 1992; de Graaf y col., 1993; Golf, 1995). Hay también técnicas espectroscópicas importantes, como la resonancia magnética nuclear (NMR) y resonancia de espín electrónico (ESR) que permiten detectar los cambios

de movilidad molecular y de difusión asociados con la  $T_g$  (Le Meste y col., 1991; Kalichewsky y col., 1992; Le Meste, 1995). La resonancia magnética de imagen (MRI) o resonancia magnética nuclear de imagen (NMRI) es una variante de la espectroscopía NMR. La diferencia reside en que por MRI se obtiene información espacial acerca de los protones presentes en la muestra. Esta técnica permite obtener “mapas de  $T_g$ ”, que serían particularmente útiles para el estudio de sistemas heterogéneos como los alimentos o materiales biológicos. Para el estudio de la difusión de compuestos en alimentos amorfos, recientemente Champion y col. (1995) introdujeron el uso de recuperación de fluorescencia luego del fotoblanqueado (FRAP). Esta técnica detecta la recuperación de la fluorescencia en una muestra que contiene sondas fluorescentes: se destruye el compuesto fluorescente en un área (fotoblanqueado) y se detecta la difusión de las sondas no destruidas hacia el área fotoblanqueada. Se puede relacionar entonces la difusión con los cambios de viscosidad del medio en las cercanías de la transición vítrea.

#### I.B.2. EFECTO PLASTIFICANTE DEL AGUA

Un agente plastificante es una sustancia que al ser agregada a un material, aumenta su flexibilidad y extensibilidad. El agua es el agente plastificante por excelencia en los alimentos; conduce a una mayor movilidad de las moléculas en las zonas amorfas de los sistemas biológicos, por encima y por debajo de  $T_g$ . A medida que aumenta el contenido de agua, disminuye la  $T_g$  del sistema, aumenta el volumen libre y se reduce la viscosidad local.

La Figura I.4. muestra la variación de  $T_g$  en función del contenido de agua, para varios vegetales deshidratados.



**Figura I.4.** Variación de  $T_g$  en función del contenido de agua para varios vegetales deshidratados.

La determinación de  $T_g$  de los alimentos o matrices complejas sería entonces adecuada para predecir su vida útil en ambientes de humedad reducida, controlar sus propiedades y determinar el efecto de distintos solutos sobre la curva de  $T_g$  (ver sección I.B.3 y 4.)

I.B.3. RELACION ENTRE PESO MOLECULAR Y  $T_g$ .

La  $T_g$  de un sistema depende no solo del contenido de humedad sino también del tipo de soluto presente en la matriz (Slade y Levine, 1991). Fox y Flory (1950), trabajando con polímeros, observaron que el valor de  $T_g$  aumentaba rápidamente al aumentar la masa molar de los mismos. Pero en sistemas con suficiente cantidad de agua otras propiedades del soluto podían tener influencia sobre la  $T_g$ . Por ejemplo, para azúcares con la misma masa molar, la diferencia de  $T_g'$  puede ser hasta 10°C, e incluso puede variar si se hallan presentes fracciones con distintas configuraciones anoméricas. En la Tabla I.1. figuran los valores de  $T_g$  y  $T_g'$  de los carbohidratos puros estudiados en el presente trabajo, y los pesos moleculares correspondientes.

**Tabla I.2** *Valores de transición vítrea y peso molecular de azúcares puros (Levine y Slade, 1991)*

Carbohidratos	PM	$T_g$ °C	$T_g'$
		(sistemas deshidratados)	(sistemas congelados)
Glucosa	180.2	31-39	-47
Fructosa	180.2	7-17	-42
Sacarosa	342.3	52-70	-32 a -46
Trehalosa	342.3	77-79	-27 a -30

## I.B.4. CAMBIOS RELACIONADOS CON LA TRANSICIÓN VÍTREA.

Existen importantes evidencias que relacionan la  $T_g$  y la movilidad molecular con la estabilidad de los alimentos que contienen agua y cantidades importantes de moléculas hidrófilas y amorfas (Levine y Slade, 1986, 1988, 1989, 1990). La movilidad molecular (movimiento translacional o rotacional) es un concepto cinético que está relacionado con la viscosidad local y en la capacidad de difusión de sustancias químicas de los alimentos (Duckworth, 1981). En la Tabla A.2. se muestran algunas de las propiedades y cambios importantes controlados por la movilidad molecular en alimentos.

**Tabla A.2** *Algunas propiedades y características de los alimentos, gobernadas por cambios que dependen de la difusión en los productos que contienen regiones amorfas (Fennema, 2000).*

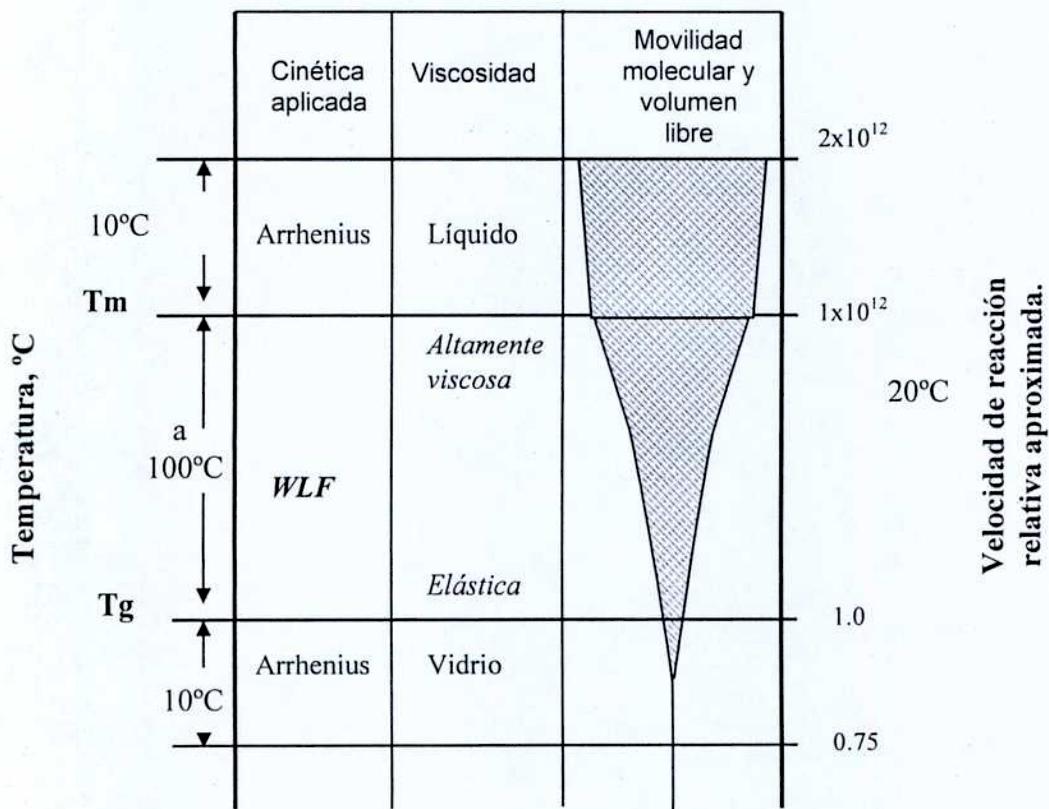
<i>Alimentos secos o semisecos</i>	<i>Alimentos congelados</i>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Textura de los alimentos secos y de humedad intermedia</li> <li>2. Propiedades reológicas (de flujo y pegajosidad)</li> <li>3. Cristalización y recristalización</li> <li>4. Aspecto del azúcar en el chocolate</li> <li>5. Fragmentación de los alimentos durante la desecación</li> <li>6. Colapso estructural durante la fase secundaria (deserción) de la liofilización</li> <li>7. Perdida de volátiles encapsulados en una matriz sólida amorfá.</li> <li>8. Envejecimiento de productos de panadería</li> <li>9. Inactivación térmica de esporas microbianas</li> <li>10. Reacción de Maillard</li> <li>11. Actividad enzimática</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Migración de agua (cristalización, formación de hielo en el interior del paquete)</li> <li>2. Cristalización de lactosa (arenosidad en helados)</li> <li>3. Retracción en alimentos congelados</li> <li>4. Colapso estructural durante la fase primaria (sublimación) de la liofilización</li> <li>5. Actividad enzimática</li> </ol>

Cuando se enfriá un alimento y/o se reduce su contenido de humedad, se forma una matriz amorfa (sección I.B.), donde la movilidad molecular se reduce considerablemente y las propiedades limitadas por difusión, como la velocidad de las reacciones de deterioro, se estabilizan cuando son almacenados por debajo de su temperatura de transición vítrea (Roos y col., 1996a). Por lo tanto, la diferencia entre la temperatura de almacenamiento ( $T$ ) y  $T_g$  ( $T-T_g$ ) estaría inversamente relacionada con la estabilidad. En alimentos almacenados a  $T > T_g$ , la estabilidad se reduce considerablemente porque se incrementa la movilidad molecular (disminuye la viscosidad). Los efectos de la cantidad de agua están involucrados en el valor de  $T_g$  (Karel y Saguy, 1991).

La aplicación de los enfoques cinéticos, en lugar de los termodinámicos, para evaluar las reacciones limitadas por difusión (reacciones catalizadas por enzimas, pardeamiento no enzimático y la estabilidad estructural) permiten predecir los cambios de las propiedades de los alimentos con la temperatura (Roos y col., 1996 a; To y Flink, 1978 a,b y c). Se ha observado una dependencia anormalmente grande entre la temperatura y la movilidad molecular del material amorfó en el intervalo de temperatura  $T_g$  a  $T_m$ , es decir entre la transición vítrea y la fusión del material, que no se ajusta a la ecuación de Arrhenius (Ec. I.2). En este intervalo, la dependencia de la velocidad de muchos de los cambios físicos y químicos con la temperatura se describe mejor con la ecuación propuesta por de Williams-Landel-Ferry (WLF) (Williams y col., 1955). En la ecuación empírica de WLF (Ec. I.1) la temperatura de referencia es la  $T_g$  (que puede variar con los cambios en la composición del producto) cuando el hielo no está presente y se ha aplicado en varios sistemas (Levine y Slade, 1989; Lim y Reid, 1991). La ecuación expresada en término de viscosidad es:

$$\log (\eta/\eta_g) = -C_1(T-T_g) / C_2 + (T-T_g) \quad (I. 1)$$

Donde  $\eta$  y  $\eta_g$ , son los valores de la viscosidad a la temperatura del producto T (K) y a la temperatura de la transición vítrea  $T_g$  (K) respectivamente.  $C_1$  (adimensional) y  $C_2$  (K) son constantes. En la Figura I.5. se muestran las relaciones cualitativas entre las propiedades de los alimentos que dependen de la movilidad molecular y la temperatura.



**Figura I.5.** Relaciones esquemáticas entre temperatura, tipo de cinética esperada, viscosidad, volumen libre y velocidades relativas de los cambios controlados por la difusión (adaptado de Fennema, 2000).

En sistemas líquidos ( $T > T_m$ ) la expresión más utilizada para establecer la dependencia de las velocidades de las reacciones químicas, físicas y de desnaturización con la temperatura es la ecuación de Arrhenius (Ec. I.2):

$$K = K_0 \exp. \left( \frac{-E_a}{RT} \right) \quad (I.2)$$

Donde:  $K_0$ , es la constante de Arrhenius,  $R$  la constante de los gases y  $E_a$  la energía de activación.  $K$  es una propiedad que está relacionada con aspectos cinéticos (p.e. inactivación de proteínas, cristalización, etc.) a la temperatura  $T$  (K).

Es importante señalar que los sistemas en presencia de hielo no se ajustan a ninguno de los modelos cinéticos de Arrhenius o de WLF, por los efectos de crioconcentración.

### **I.C. ISOTERMAS DE SORCIÓN DE AGUA Y ESTADO FÍSICO**

El agua es el componente más abundante de los alimentos frescos, su presencia es crítica en ciertas cualidades deseables, determinante de la velocidad de muchas reacciones químicas y está asociada a los componentes no acuosos en forma compleja. Se ha observado que sistemas que tienen el mismo contenido de agua difieren significativamente en su estabilidad. El concepto de actividad de agua ( $a_w$ ) define la disponibilidad de agua para ciertas reacciones (hidrolíticas, crecimiento de microorganismos, etc.) y caracteriza la intensidad con la cual el agua se asocia con los distintos componentes no acuosos (Fennema, 2000). La  $a_w$  se define según (Ec. I.3):

$$a_w = (p / p_0) \tau \quad (I.3)$$

Donde:

$a_w$  es la actividad de agua

$p$  es la presión de vapor de agua en el producto a la temperatura  $T$

$p_0$  es la presión de vapor del agua pura a la temperatura  $T$

En el equilibrio termodinámico, a temperatura constante, las actividades de agua de los componentes de una mezcla son iguales, mientras que los contenidos de agua pueden no serlo. La actividad de agua está relacionada con el contenido acuoso a través de la isoterma de sorción de agua. En la Figura I.6. se observan las isotermas de los sistemas cristalino y amorfo, los cuales son significativamente diferentes.

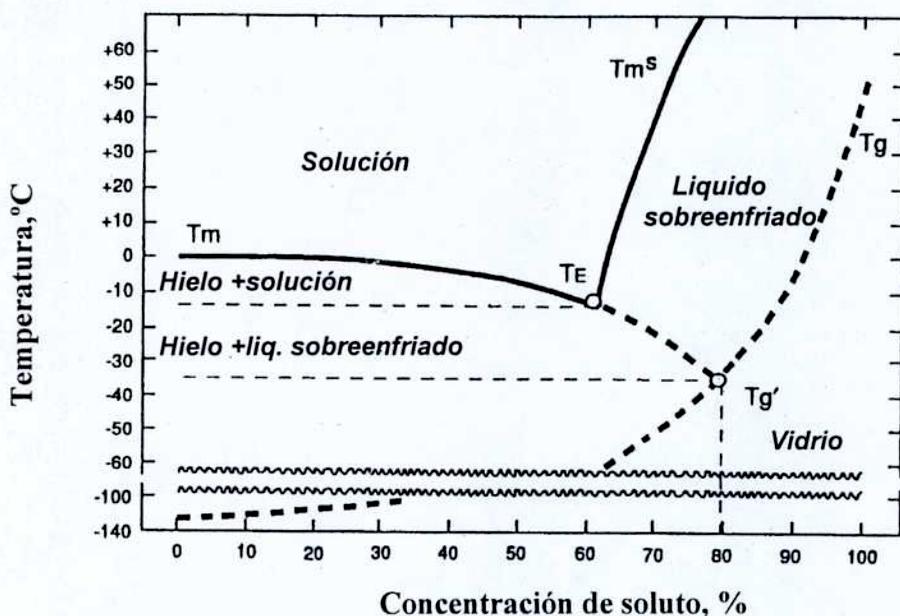


**Figura I.6.** Isotermas correspondientes a sistemas amorfos, cristalinos, y materiales amorfos que cristalizan a medida que aumenta el contenido de agua y la  $a_w$  (Adaptado de Mazzobre, 2001).

En un sistema amorfó (Figura I.6,A) las moléculas se encuentran en un ordenamiento al azar, y están relativamente más libres para interactuar con el agua, por lo tanto la adsorción de agua a bajas  $a_w$  es mayor en los sistemas amorfos que en los cristalinos. Un sólido cristalino (Figura I.6,B) adsorbe muy poca agua hasta una  $a_w$  dada, a partir de la cual comienza la disolución de cristales. Existen otros materiales (azúcares, por ejemplo) que a bajos contenidos de agua y bajas  $a_w$ , son amorfos, pero cristalizan con la adición de agua (Figura I.6,C). Las isotermas permiten obtener información sobre la cristalización y la plastificación de un sistema.

#### **I.D. DIAGRAMAS DE ESTADO**

Cuando se congela un alimento y/o se reduce su contenido de agua son de gran utilidad los diagramas de fase suplementados que contienen información sobre los estados de equilibrio termodinámicamente estables y metaestables e incluyen la noción de tiempo (Fennema, 2000). Cuando el agua se encuentra formando parte de una mezcla binaria con un soluto es importante determinar cuáles son las fases presentes en función de la composición, temperatura o de la presión. Dichas curvas, temperatura de transición vítreo ( $T_g$ ), fusión de hielo ( $T_m$ ) y solubilidad ( $T_m^s$ ) definen regiones de estabilidad variable y representan regiones de no equilibrio. La Figura I.7. representa a un diagrama de fase temperatura-composición de una mezcla binaria, suplementado con las líneas discontinuas que delimitan diversos estados metaestables.

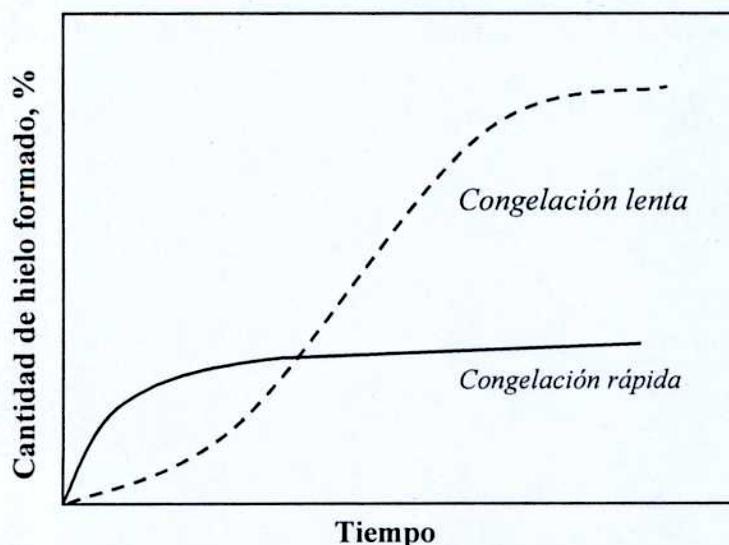


**Figura I.7.** Diagrama de fases temperatura-composición suplementado de una mezcla binaria soluto/agua (Adaptado de Fennema, 2000).

El punto  $(T_g', C_g')$  en el diagrama de estado definido por la intersección de las curvas de fusión ( $T_m$ ) y de  $T_g$  corresponde a una concentración de soluto/temperatura particular (mencionada previamente en I.B.1) a la cual la cristalización de agua está inhibida cinéticamente.  $C_g'$  es la concentración correspondiente a la matriz máximamente concentrada por formación de hielo, es decir que a  $C_g'$  se alcanza la mínima cantidad de agua asociada a la fase amorfa que se puede alcanzar por crioconcentración.  $T_g'$  es la temperatura de transición vítreo correspondiente a esa matriz máximamente concentrada (Simatos y Blond, 1991; Slade y Levine, 1991). Este valor es independiente de la concentración inicial, sólo depende de la composición o tipo de soluto. Por lo tanto, cada sistema tendrá su diagrama de estado característico que diferirá cuantitativamente pero no cualitativamente del diagrama mostrado en la Figura I.7 y se determina generalmente por

DSC a partir de soluciones que fueron almacenadas en condiciones de máxima formación de hielo. La formación de hielo se favorece congelando muy lentamente, y se hace máximo a temperaturas entre  $T_E$  y  $T_g$  (punto eutéctico). A temperaturas mayores de  $T_m$  se produce la fusión de hielo y a inferiores de  $T_g$  el sistema es altamente viscoso y la cristalización está impedida (Fennema, 2000). Conocer el valor de  $T_g'$  es importante para evaluar la estabilidad de productos congelados (los cuales a  $T_g'$  son estables, sin cristalización de agua o soluto por largos períodos de tiempo).

Cuando el enfriamiento a temperaturas menores de  $T_g$  es rápido (por ejemplo con nitrógeno líquido) se obtienen sistemas en estado sólido vítreo con escasa formación de hielo y con mayor contenido de agua en la fase amorfa, por lo tanto la  $T_g$  del sistema disminuye a temperaturas menores de  $T_g'$  (Luyet y Rasmussen, 1968, Hartel, 2001). En la Figura I.8. se observa la cinética de la formación de hielo según la velocidad de enfriamiento, las cuales son significativamente diferentes.



**Figura I.8.** Formación de hielo según la velocidad de congelación (Adaptado de Hartel, 2001)

## **I.E. ASPECTOS TECNOLÓGICOS**

Como vimos, una solución práctica al problema de la estabilidad de los materiales lábiles es el almacenamiento a bajas temperaturas o la eliminación del agua. La temperatura de almacenamiento disponible en la práctica para los alimentos congelados (-26°C) está generalmente por encima de la temperatura de transición vítrea de la matriz crioconcentrada ( $T_g'$ ) de la mayoría de los alimentos, por lo tanto la movilidad molecular puede ser intensa. Durante el almacenamiento, entonces, las biomoléculas no estarían protegidas por una matriz vítrea y se tornarían inestables. La liofilización (congelamiento-secado) sería el mejor proceso para preservar las proteínas (Pikal, 1999), pero no garantiza una estabilidad adecuada a largo plazo a temperatura ambiente ya que durante el congelamiento y la deshidratación se producen daños por mecanismos fundamentalmente diferentes (Crowe y col., 1994).

### **I.E.1. CONGELACIÓN**

El congelamiento de soluciones biológicas puede ocasionar la agregación irreversible de las proteínas y en consecuencia la pérdida de la actividad catalítica de las enzimas (Franks, 1985). El daño durante el congelamiento es producido por la baja temperatura y/o la formación de hielo.

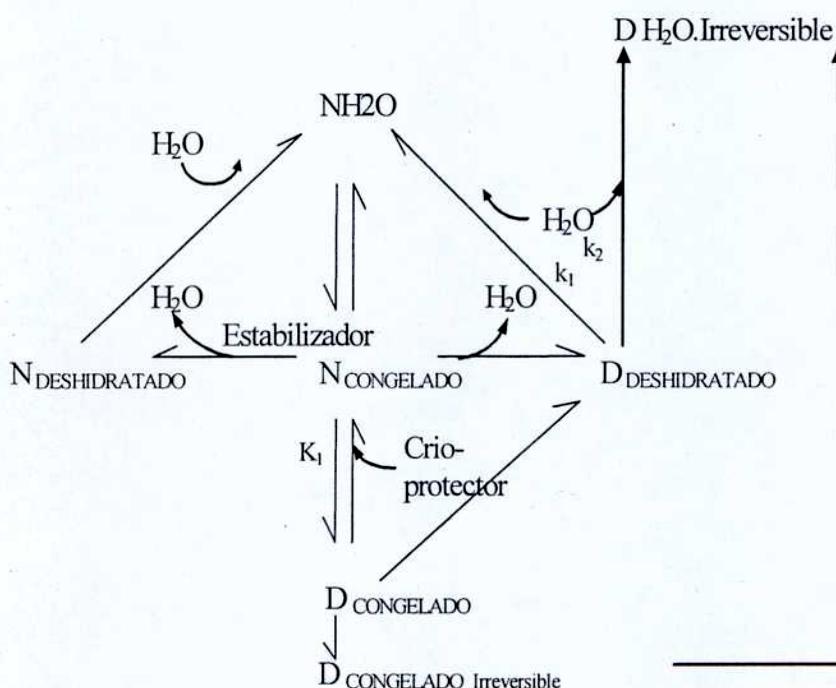
La desnaturización por frío ha sido documentada para muchas proteínas y la susceptibilidad al congelamiento se debe a la disruptión de interacciones hidrofóbicas

intramoleculares (Fennema, 2000). Estudios recientes observaron, usando mediciones de fluorescencia, la alteración de la estructura terciaria y cuaternaria durante el congelamiento de numerosas proteínas como azurín, ribonucleasa,  $\alpha$  amilasa, alcohol deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, fosfato deshidrogenasa, 3 gliceraldehido, y lactato deshidrogenasa (Strambini y Gabellieri, 1996; Gabellieri y Strambini, 2006).

Por otra parte, la formación de hielo aumenta la concentración de solutos en la fase no congelada donde se particiona la proteína y produce cambios drásticos de pH, causando importantes daños bioquímicos.

Finalmente, también se ha observado que ciertas proteínas en estado congelado pueden presentar un comportamiento diferente, que no se manifiesta en la deshidratación. Se ha comprobado que cuando se incrementa la concentración inicial de ciertas enzimas, se detecta un efecto “autoprotector” al congelamiento lo cual determina un aumento de la estabilidad biológica (Tamiya y col. 1985; Izutsu y col., 1995; Miller y col., 1998). Esta observación está relacionada con otras publicaciones donde los autores han interpretado que el aumento de la interfase hielo-agua opera como estrés para la proteína durante el congelamiento (Strambini y Gabellieri, 1996). Ellos concluyen que sólo se deteriora la proteína que rodea la superficie de hielo, por lo tanto cuando se supera esta cantidad inicial de proteína se reduce el porcentaje del daño. Estas deducciones están fundamentadas por experiencias donde la desestabilización de enzimas se logra con el aumento de la velocidad de congelamiento, condición que favorece la formación de cristales de hielo más pequeños. Concluyeron que la perturbación de la estructura terciaria de la proteína era casi dos veces mayor enfriando a 100°C/min que para las muestras enfriadas a 1°C/min. Este efecto se atribuyó a la formación de un área mayor de superficie de hielo producido por el

muestran en la Figura I.9. Este modelo propone que para recuperar estructura y función después de la rehidratación, las proteínas lágiles deben retener la estructura nativa durante el congelamiento y la deshidratación posterior. Durante la liofilización, los aditivos estabilizadores deben ser efectivos para proteger durante el congelamiento previo y evitar la pérdida de la conformación en la deshidratación posterior. Los azúcares han demostrado minimizar la pérdida de actividad en ambos procesos (Pikal, 1999).



**Figura I.9** Representación esquemática del modelo de cambios conformacionales durante el congelamiento, secado y rehidratación. *N*, nativo; *D*, desnaturalizado, *K<sub>1</sub>* conformación de equilibrio en el congelamiento con dirección hacia el estado nativo en presencia de crioprotectores, *k<sub>1</sub>* constante de renaturalización; *k<sub>2</sub>* constante de desnaturación irreversible (agregación).

### I.E.3. ESTRATEGIAS DE PROTECCIÓN

Para minimizar el daño de las enzimas durante la liofilización, es necesario que se establezcan las condiciones específicas óptimas (Manning y col., 1989; Devi y Appu Rao, 1998) y que se agreguen los aditivos estabilizadores no específicos apropiados (aquellos que generalmente estabilizan cualquier proteína). Como vimos, si una proteína no es adecuadamente protegida durante el congelamiento, puede desnaturalizarse y estará inactivada en el sólido seco final, no importa cuán efectiva sea la estabilización durante el paso de deshidratación (Carpenter y col., 1986). Por lo tanto, los agentes estabilizantes deben ser efectivos en los dos pasos del proceso, prevenir los daños por congelación e interactuar favorablemente con la proteína en la muestra seca. Para la protección durante la liofilización tanto los disacáridos reductores como no reductores son efectivos. Sin embargo, los azúcares reductores (ej. lactosa y maltosa) pueden degradar las proteínas durante el almacenamiento vía la reacción Maillard. Por lo tanto, la elección de los disacáridos se limita a los azúcares no reductores, sacarosa y trehalosa. El empleo del azúcar trehalosa ha resultado adecuado para la protección de la mayoría de las enzimas durante la liofilización y ha demostrado ser uno de los azúcares más efectivos a largo tiempo (Crowe y col., 1983, 1984a; Mouradian y col., 1984; Roser, 1991; Leslie y col., 1995; Uritani y col., 1995; Schebor y col., 1996, Murray y Liang, 2000). Como se explicará en la sección siguiente, la protección al congelamiento mediante el agregado de un azúcar está directamente relacionada con la concentración inicial del aditivo, mientras que la protección durante el secado se relaciona principalmente con la relación molar entre el aditivo y la proteína.

#### I.E.4. MECANISMOS DE PROTECCIÓN

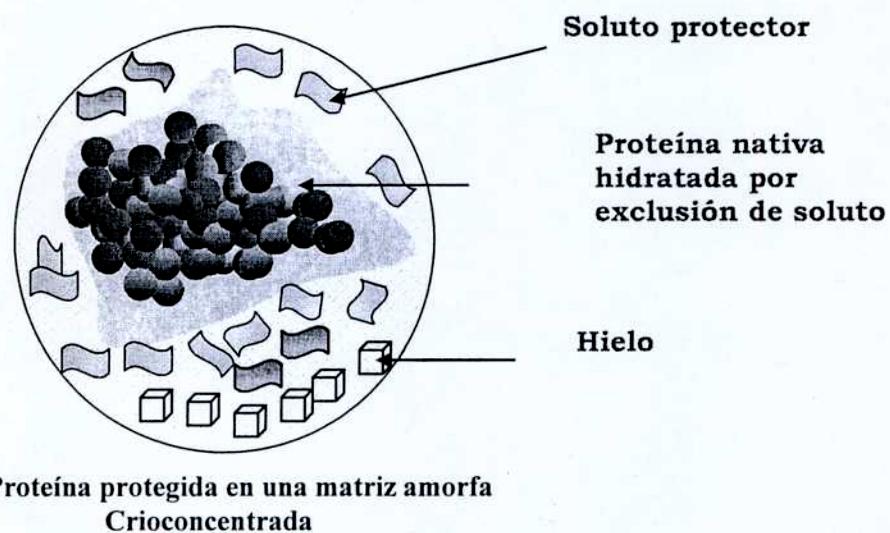
La acción protectora de numerosos compuestos (azúcares, polioles, aminoácidos, metilaminas, sales y polímeros sintéticos) puede ser atribuida tanto a efectos específicos como cinéticos. En base a observaciones experimentales se han postulado dos mecanismos diferentes de estabilización de estructuras biológicas (Carpenter y col., 1986):

- a. Crio- dehidroprotección: cuando se favorece termodinámicamente la estructura nativa de la proteína por la adición de osmolitos compatibles y/o polioles (compuestos como azúcares de bajo peso molecular acumulados en células o organismos como mecanismos de adaptación)
- b. Crio-dehidroestabilización: cuando se mantiene a la proteína en un vidrio, los procesos de deterioro están inhibidos por la adición de polímeros de alto peso molecular.

##### I.E.4. a Adición de Osmolitos

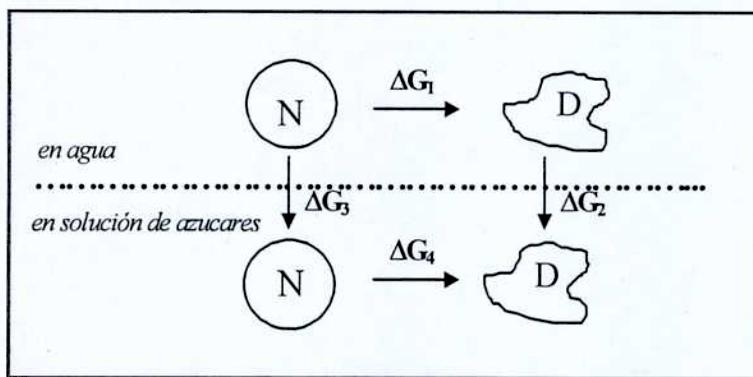
En soluciones congeladas la protección por presencia de osmolitos (crio-dehidroprotección) está planteada en base al mecanismo universal definido por Arakawa y Timasheff (1982a) como de “hidratación preferencial por exclusión de soluto”. El proceso de desnaturización de una proteína en solución; a temperatura ambiente, es un modelo de dos estados en equilibrio. El estado nativo (N) es favorecido porque tiene menor energía libre que el estado desnaturizado (D). Cualquier alteración en el sistema que disminuya esta diferencia, reducirá la estabilidad. Por el contrario, los osmolitos son preferentemente

excluidos de la superficie de la proteína, lo cual aumenta el entorno del agua que la rodea y provoca un cambio en la energía libre, favorable para la estructura nativa (Lee y Timasheff, 1981; Xie y Timasheff, 1997; Cioni y col., 2005). En la Figura I.10 se muestra un esquema del mecanismo de “hidratación preferencial”.



**Figura I.10.** Representación esquemática del mecanismo de protección de azúcares de bajo peso molecular y polioles durante el congelamiento (MacDonald y Lanier, 1991).

La “exclusión preferencial”, en un sentido termodinámico, significa que existe un aumento en la diferencia de energía libre entre los dos estados y que en soluciones de azúcar la desnaturalización de proteínas es menos favorable que en agua ( $G_4 > \Delta G_1$ ) (Figura I.11).



$\Delta G_2 > \Delta G_3$  (dato experimental);  $\Delta G_1 + \Delta G_2 = \Delta G_3 + \Delta G_4$  luego:  $\Delta G_4 > \Delta G_1$

**Figura I.11** Representación esquemática de la conversión de una proteína en estado nativo (N) al estado desnaturizado (D) en agua o en solución de azúcar (osmolitos). MacDonald y Lanier, 1991.

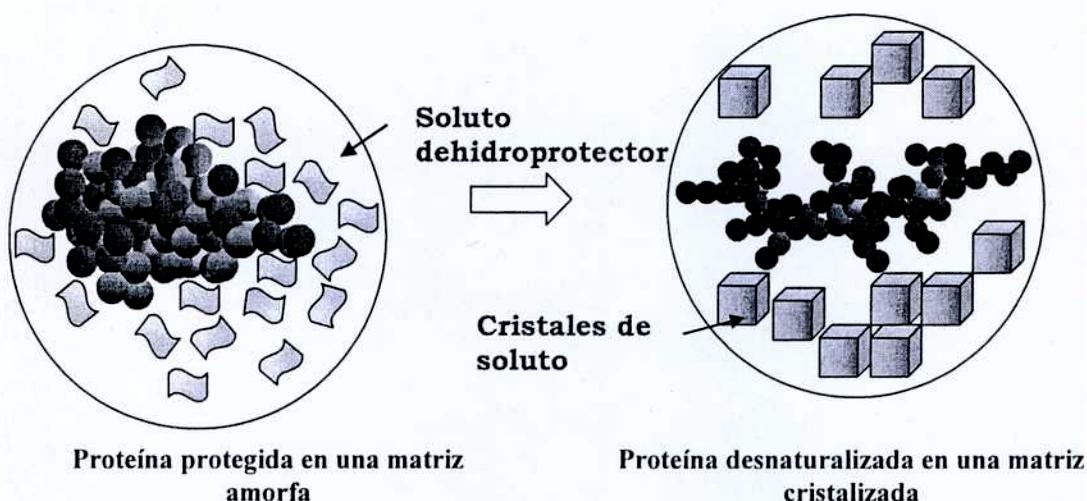
En condiciones de baja humedad, numerosos estudios avalan otro mecanismo, referido como la “hipótesis de reemplazo de agua”. De acuerdo con esta hipótesis, cuando el agua es removida, los azúcares forman uniones por puentes de hidrógeno con los grupos cargados de las proteínas evitando su desnaturización (Tanaka y col., 1991; Prestelski y col. 1993; Cioni y col., 2005). La estructura de las proteínas sería estabilizada por interacciones específicas azúcar-proteína y su efectividad estaría condicionada por el tamaño del azúcar (Francois, M.; 2004). Tanaka y col. (1991) encontraron que el grado de estabilización estaba basado en la relación molar del azúcar a la proteína. También se observó una correlación negativa entre la estabilización y el peso molecular del azúcar, lo cual es comprensible si la protección se efectúa por la interacción del hidrógeno a la proteína en el sólido seco.

#### I.E.4. b Vitrificación

El segundo mecanismo (crio-dehidroestabilización) implica el concepto de la formación de una matriz protectora modificando la estructura física del sistema, siendo definida por el componente mayoritario y por su historia térmica. Numerosos estudios han mostrado que la estabilización de una proteína durante la liofilización requiere la presencia de un compuesto que quede parcialmente amorfo y que también forme una sola fase con la proteína (Pikal, 1999). Las propiedades del material amorfo en equilibrio metaestable deben ser conservadas durante el proceso completo de la liofilización (congelamiento-secado) para asegurar la recuperación de la proteína nativa en el sólido seco y la rehidratación (Suzuki y col. 1997, Sun y Leopold, 1997; Mazzobre y Buera, 1999; Burin y col., 2004; Buera y col., 2005; Acevedo y col., 2006). Esto se cumple cuando las biomoléculas están cinéticamente estabilizadas, aunque no estén bajo una condición termodinámicamente estable. Desde este punto de vista, la formación de una matriz amorfa vítreo restringe severamente los movimientos translacionales y rotacionales de las proteínas, retrasando su desnaturización (Burke, 1985; Green y Angell, 1989; Levine y Slade, 1992a). La inhibición del desplegamiento de la proteína se mantendría por la separación espacial entre las moléculas de proteínas impidiendo la agregación. Entonces, la capacidad de un aditivo de proteger específicamente durante la deshidratación debería depender de la relación final entre aditivo/proteína. Al incrementar esta relación se favorecerá la separación espacial y la inmovilización de la proteína en la matriz vítreo.

Muchos carbohidratos forman estructuras amorfas a partir de soluciones congeladas y durante el secado (por ejemplo, sacarosa y trehalosa), pero algunos presentan separaciones

eutécticas en las soluciones congeladas y pueden cristalizar en condiciones de humedad reducidas en muestras deshidratadas. Por ejemplo, el manitol en estado amorfo, en un rango de concentración definida, es un buen protector de enzimas durante la liofilización pero pierde esta capacidad cuando cristaliza. La Figura I.12. muestra un esquema del efecto que tendría la cristalización del azúcar sobre la desnaturización proteica.



**Figura I.12** Representación esquemática de la cristalización del azúcar sobre la desnaturización proteica (Adaptado de Levine y Slade, 2001a)

Es importante señalar que otros estudios concluyen que la vitrificación por sí misma, parece no ser suficiente para asegurar la estabilización de proteínas. Los polímeros como los dextrans podrían proveer muchas propiedades deseables (ej: alto  $T_g'$  o  $T_g$ ) pero no protegen eficazmente a enzimas como PFK y LDH durante la liofilización, aunque las muestras secas estaban amorfas (Zhang y col., 1994).

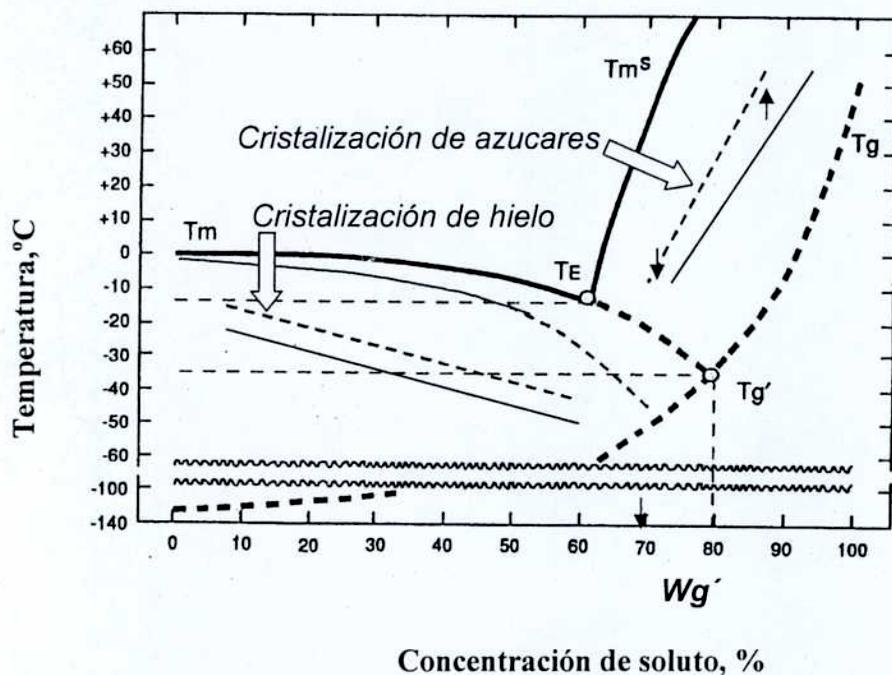
En las soluciones congeladas, la presencia de polímeros de alta masa molar estabiliza por que aumenta rápidamente el valor de  $T_g$  (Fox y Flory, 1950). La combinación de la alta

reducción de agua congelable. La distorsión de la estructura del agua mediante el agregado de azúcares o sales a una solución acuosa es bien conocida. Es generalmente aceptado que la esfera de hidratación de moléculas de agua envuelve los iones solvatados, con los átomos de oxígeno orientados hacia los cationes, o los átomos de hidrógeno orientados a los aniones. De esta manera, la auto-asociación de moléculas de agua directamente adyacentes al ion es interrumpida porque están orientadas en el campo eléctrico al ión. Esta orientación modifica los diferentes tipos de estructuras de agua local dependiendo del tamaño de los iones y de la extensión de la hidratación. Los iones conocidos como agentes de estructura o cosmotrópicos son los que imponen mayor orden local a las moléculas de agua que los rodean (haciéndolas menos móviles) y fortalecen las uniones del hidrógeno entre ellos, mientras que los iones caotrópicos incrementan el desorden y debilitan las uniones del hidrógeno entre moléculas de agua adyacentes, induciendo la desnaturización de la proteína. Debe notarse que las propiedades más importantes para definir el efecto de un ion dado son la carga, el tamaño y el poder polarizante (Leontidis, 2002). Los agentes de estructura o cosmotrópicos (citrato, acetato;  $Mg^{+2}$ ) son grandes, generan fuertes campos eléctricos, son creadores de estructura neta, se espera que tengan una fuerte dispersión de interacciones con interfaces y estabilizan proteínas. Por otro lado, los disruptores de la estructura del agua ( $K^{+}$ ), interrumpen la coordinación tetraédrica y reducen la cantidad de agua congelable. Algunos iones, como  $Na^{+}$  o  $Cl^{-}$  son considerados neutrales (Calligaris y Nicoli, 2006). Las proteínas son generalmente estabilizadas por aniones fuertemente cosmotrópicos y desestabilizadas por cationes cosmotrópicos fuertes. Por lo tanto, la estabilización óptima es lograda a través del uso de sales que contienen aniones cosmotrópicos y cationes caotrópicos (Zhao y col., 2006), las cuales juegan un rol

importante para determinar la cantidad de agua congelable. La trehalosa actúa como un interruptor de la estructura pero provee la estabilización de la enzima mediante interacciones de uniones fuertes de hidrógeno (Patist and Zoerb, 2005).

En relación al efecto combinado de los azúcares y las sales, se ha observado que la presencia de ciertas sales, como cloruros o tetraborato de sodio modifica las propiedades termofísicas de soluciones concentradas de trehalosa (Miller y col., 1997; Longinotti y col., 2002). Varios métodos físicos han confirmado, además, la existencia de complejos de azúcar-metal en la solución, y muchos complejos de azúcares y derivados del azúcar con sales inorgánicas han sido aislados en sólido y a menudo en formas cristalinas (Angyal, 1973; Morel-Desrosiers y col., 1991).

La Figura I.13 muestra el efecto de la adición de electrolitos (líneas coloreadas) en un diagrama de fase temperatura-composición de una mezcla binaria, suplementado (con las líneas discontinuas) delimitantes de los diversos estados metaestables.



**Figura I.12.** Diagrama de fases temperatura-composición suplementado de una binaria soluto/agua, modificado por el agregado de electrolitos (líneas coloreadas). Mazzobre y Buera, 2000

En general, la introducción de distintas especies químicas en la solución produce el descenso del punto de congelación ( $T_m$ ), (efecto esperado por ser una propiedad coligativa, que depende del número de moléculas presentes) y no afecta la curva de temperatura de transición vítreo (Fennema, 2000) pero influye sobre la cristalización del agua y sobre el valor de  $T_g'$  en sistemas con el mismo contenido de agua inicial (Herr y col.; 1995; Miller y col., 1998 y Mazzobre y col., 2001).

## **I.F. ENZIMAS COMO MARCADORES DE LA ESTABILIDAD DE LOS SISTEMAS AMORFOS.**

La estabilidad enzimática es usada en numerosos estudios de investigación como un indicador para evaluar la eficiencia de los solutos que pueden usarse como aditivos para reducir los efectos desfavorables del procesamiento de los alimentos (Tamiya y col., 1985; Carpenter y col., 1986; Suzuki y col. 1997; Miller y col., 1998; Mazzobre y Buera, 1999; Burin y col., 2004; Kajiwara y Imai, 2004; Santagapita y Buera., 2006).

Cada tipo de enzima tiene sus propias características fisicoquímicas, con caminos de degradación química y física característicos durante el tratamiento, procesado y almacenamiento. Por lo tanto, es necesario el estudio de los mecanismos de protección de los agentes estabilizantes no específicos y documentar, por medio de estudios de casos, la aplicabilidad de las reglas generales a enzimas individuales.

Los experimentos de esta Tesis fueron conducidos para evaluar el perfil enzimático de soluciones biológicas de distintas fuentes con actividad catalítica cuantificable para investigar las condiciones de estabilidad en situaciones extremas de humedad y temperatura, como son las halladas en sistemas congelados y deshidratados.

También se estudió la preservación con trehalosa y el efecto del agregado de varias sales en sistemas expuestos a dos situaciones límites: por un lado crioconcentración de soluciones acuosas mantenidas a -26°C, y por otro lado deshidratación con almacenamiento en condiciones de humedad reducida a 55°C. Por último, se evaluaron las propiedades físicas de los sistemas en donde resultó eficaz la presencia de este hidrato de carbono y el efecto de la modificación del entorno molecular por el agregado de sales.

## **II. OBJETIVOS**

## II. OBJETIVOS

- Analizar la funcionalidad de enzimas de interés en Ciencia de Alimentos en condiciones extremas (baja humedad, temperaturas subcero) en función de la concentración de agua, la temperatura, las propiedades termofísicas del medio y el grado de cristalinidad de agua o solutos.
- Estudiar el efecto del agregado de sales sobre las propiedades físicas de sistemas de trehalosa liofilizados o congelados y su relación con la estabilidad enzimática.
- Generar diagramas de estado y localizar los sistemas y sus condiciones para comprender o predecir los cambios físicos y su relación con la funcionalidad enzimática.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **III.A ELECCIÓN DE ENZIMAS Y SISTEMAS MODELOS**

- Se seleccionaron como fuentes de enzimas: semillas (soja y cebada germinada) y miel. En las semillas hay enzimas críticas para su viabilidad y longevidad como amilasas, transferasas, etc. (Walters, 1998), que se inactivan con el tiempo y que en general son susceptibles de degradación durante el envejecimiento celular (Wettlaufer y Leeopold, 1991; Zhang y col., 1994b; Sun y Leopold, 1994 ay b). En el presente trabajo, se separaron los materiales insolubles de los tejidos vegetales y se estudió *in vitro* el comportamiento de algunas enzimas de los extractos enzimáticos de los granos. La miel es un alimento interesante a estudiar, ya que las moléculas con actividad biológica (por ejemplo enzimas, provenientes del aparato digestivo de las abejas) están protegidas por una matriz natural de azúcares (White y col., 1964.). Se buscó entonces, desestabilizar este sistema variando el contenido de agua y la temperatura.
- En todas las fuentes se determinó la actividad de la enzima *amilasa*. Además, en los extractos vegetales se estudió la actividad de las enzimas *ureasa* y *aspartato amino transferasa* (GOT/AST). Se evaluó la estabilidad de las mismas en un sistema modelo de azúcar (trehalosa) y azúcar-sal, capaz de formar una matriz amorfa por congelación o deshidratación. Los sistemas fueron almacenados en condiciones de estrés hídrico y térmico: baja temperatura, deshidratación y exposición en ambientes de humedad reducida

- **Una breve reseña de las características de las enzimas analizadas.**

Las amilasas, enzimas que hidrolizan almidones, se encuentran en animales, en plantas superiores y en microorganismos. Las  $\beta$  amilasas hidrolizan los enlaces glucosídicos  $\alpha$ - 1-4 del almidón a partir del extremo no reductor para dar maltosa. La  $\beta$  amilasa es una enzima con grupos sulfhidrilo y puede ser inhibida por reactivos que reaccionan con estos grupos.

La miel tiene ambas amilasas (Duisbbbbeerg y Hardorn, 1966) pero se conoce poco acerca de la cinética, modos de acción y el significado de su presencia ya que el néctar no contiene almidón ni dextrinas.

En la malta, la  $\beta$  amilasa está a menudo unida covalentemente, por medio de enlaces disulfuro, a otros grupos sulfhidrilo, por lo tanto un compuesto como la cisteína aumentaría su actividad. Se utiliza para maximizar la fermentación y disminuir la velocidad de endurecimiento del pan.

La ureasa actúa sobre la urea (producto final del metabolismo proteico) produciendo  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$ . La ureasa tiene aplicaciones tecnológicas y analíticas, por ejemplo se utiliza para eliminar restos de carbamatos y urea en vinos, para la determinación de urea proveniente de fermentaciones (Kodama y Suzuki, 1995). También la actividad ureasa es un marcador adecuado para detectar la inactivación de antinutrientes en productos de leguminosas, ya que es más estable que los factores antitrípticos y hemaglutininas.

La GOT/AST interviene en la degradación oxidativa de los aminoácidos (asparagina): el aspartato experimenta transaminación formándose ácido oxalacético y ácido glutámico. Esta enzima tiene un papel importante durante la humectación y germinación de las semillas en el proceso respiratorio. Los productos de su reacción, de

cuatro átomos de carbono pueden incorporarse al ciclo del ácido tricarboxílico en forma de oxalacetato, cetoácidos (a cetoglutarato, piruvato), los cuales son importantes intermediarios en la cadena respiratoria, son químicamente inestables y pueden estar ausentes en la semilla seca (Bewley 1998). Durante la humectación de las semillas, inicialmente hay un incremento en el consumo de oxígeno atribuido a la activación de las enzimas mitocondriales involucradas en el ciclo del ácido tricarboxílico del transporte de electrones. En los primeros minutos después de que el agua entra en las células, ocurre un rápido cambio metabólico con la reformación de aminoácidos por reacciones enzimáticas de desaminación y transaminación. GOT/AST tiene aplicaciones en carnes para evaluar efectos del congelado y descongelado. Puede emplearse como agente mejorador en procesos de panificación ya que produce entrecruzamientos en las proteínas del gluten y una aplicación potencial importante es la generación de compuestos del flavor (Fenemma, 2000).

### **III.B MATERIALES**

#### **Fuentes biológicas:**

- *Semillas para la preparación de los extractos vegetales:*
  - Poroto de Soja: certificado por Argencred- resol N° 423/92 IASCAV- 100% de soja orgánica en paquete.
  - Malta: granos de cebada germinada, cedida por Cervecería Quilmes -año 2000
- *Miel:* La miel utilizada en este estudio fue miel polifloral de la provincia de Chaco (Argentina). La miel no fue pasteurizada y se mantuvo a -26°C hasta el momento del ensayo.

**Equipos:**

- Espectrofotómetro Shimadzu UV-1203 (empleando cubetas de cuarzo de caras paralelas de 1 cm de espesor)
- Agitador - De Calab
- Baño termostático - Memmert
- Freezer
- Liofilizador. Heto Ioteen A/S, con una trampa de enfriamiento modelo CT 110 (Heto Lab equipment, Denmark)
- Calorímetro de barido diferencial. Mettler-Toledo modelo 822 (Mettler-Toledo AG, Suiza)

**Sistemas:**

➤ *Sistemas líquidos*

Se prepararon soluciones o extractos de las fuentes biológicas para estudiar la estabilidad de las enzimas presentes:

- *Extracto acuoso de soja (E.A.S.):* Se empleó el método de Natelson y col. (1951) modificado. Consiste en mezclar 30 g de harina de soja (recién molida) con 50 ml de ácido sulfúrico N/1000. La mezcla se agita luego en un agitador de Khan durante 20 minutos. Se añaden 150 ml de agua destilada y se continúa la agitación durante 15 minutos más. Se filtra la mezcla y se preparan las diluciones adecuadas. Se determinó la actividad de las enzimas *amilasa*, *ureasa* y *GOT/AST*.
- *Malta:* El extracto de malta fue preparado con 50 g de cebada germinada y 150ml de agua destilada. Las enzimas fueron extraídas incubando a 55°C durante dos horas

tras posterior filtración (Analytica EBC, 1998). Se filtra la mezcla y se preparan las diluciones adecuadas. Se determinó la actividad de las enzimas *amilasa*, *ureasa* y *GOT/AST*.

- *Miel*: se diluyó al 1/2, 1/4 y al 1/8 (p/p) con agua destilada, se fraccionó en alícuotas de 1 ml, para su congelación/liofilización y almacenamiento. Se determinó la actividad de la enzima *amilasa*.

➤ *Sistemas modificados:*

Los sistemas anteriores fueron modificados agregando trehalosa (Treh.) (Hayashibara Co, Ltd., Shomoishii, Okasama, Japan/ Cargill Inc., Minneapolis, Minnesota, U.S.A):

- E.A.S./Treh.: se agregó trehalosa (20% p/v) al extracto acuoso de soja preparado, fracción en masa de agua (W)=0.8.
- Miel/Treh.: se preparó diluyendo al 1/2, 1/4 y al 1/8 (p/p) la miel con solución de trehalosa 20% (p/v).

➤ *Sistemas combinados o mezclas de Treh./sal*

- Los sistemas anteriores, puros o modificados con trehalosa (T), fueron preparados en presencia de diferentes sales (NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, todos grados p.a Merck, Darmstadt, Germany,) en una proporción molar azúcar:sal 5:1.

La composición de los sistemas modelo se resume en la Tabla III. 1.

**Tabla III.1** Composición y contenido de sólidos (% p/p) de los sistemas puros o modificados con trehalosa.

---

<i>Sistemas:</i>	<i>Sólidos totales, %:(p/p)</i>
<b>1. MIEL:</b>	
<i>a) Miel- agua:</i>	
50% Miel ( 50:50 )	41,5
25% Miel ( 25:75 )	20,75
12.5% Miel ( 12.5:87.5 )	10,4
<i>b) Miel- sol. de Trehalosa (20% p/v):(Miel/Treh.)</i>	
50% Miel/Treh. ( 50:50 )	51,5
25% Miel/Treh. ( 25:75 )	35,75
12.5% Miel/Treh. ( 12.5:87.5 )	27,9
<b>2. SOJA:</b>	
<i>a) Extracto acuoso de soja (E.A.S.)</i>	0.1
<i>b) E.A.S- sol. de Trehalosa (20% p/v):(E.A.S /Treh.)</i>	20
<b>3. MALTA (extracto enzimático)</b>	0.1

---

### **III.C PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS MODELO.**

#### **III.C.1 SISTEMAS AMORFOS CONGELADOS.**

Las soluciones que contenían el correspondiente extracto enzimático (con o sin 20% p/v de trehalosa o mezclas de azúcar:sal) se distribuyeron en alícuotas de 1 ml que fueron almacenadas en congelador a -26°C.

#### **III.C.2 SISTEMAS AMORFOS DESHIDRATADOS.**

Los sistemas deshidratados amorfos fueron obtenidos mediante la liofilización de las soluciones que contenían el correspondiente extracto enzimático (con o sin trehalosa). Alícuotas de 1 ml de cada solución fueron colocadas en viales de 3 ml, congelados 24 hs a - 26°C e inmersos en aire líquido (temperatura - 200°C) antes de la liofilización en un liofilizador que operó a una temperatura de placa condensadora de -110°C, a una temperatura de cámara de 25°C y una presión de  $4.10^{-4}$  mbar. A fin de obtener muestras con una fracción de masa de agua (W) desde 0.05 a 0.15, las muestras liofilizadas fueron transferidas a desecadores en vacío y expuestas durante una semana a 25 °C sobre las siguientes soluciones salinas saturadas: LiCl; K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y NaCl que permitieron obtener humedades relativas (HR) de 11, 44 y 75% respectivamente, según los requerimientos de cada experimento (Greenspan, 1977).

### **III.D DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AGUA EN SISTEMAS DESHIDRATADOS**

El contenido de agua total en los sistemas se determinó colocando las muestras en estufa de vacío durante 48 hs a 70°C (Cardona y col. 1997). Los resultados se expresaron en fracción en masa de agua (W) y corresponde a la diferencia de peso antes y después del secado.

En matrices donde se produjo la cristalización parcial de la trehalosa como dihidrato, el contenido acuoso de la fase amorfa ( $W_A$ ) se calculó utilizando las siguientes ecuaciones:

$$X+Y = 1$$

$$W = X \cdot 0.1 + Y \cdot W_A$$

$$Y \cdot W_A = W - (X \cdot 0.1)$$

$$W_A = (W - X \cdot 0.1) / (1-X) \quad (III.1)$$

donde X: fracción en masa de trehalosa cristalina; Y: fracción en masa de trehalosa amorfa; W: fracción en masa de agua total;  $W_A$ : fracción en masa de la fase amorfa; 0.1: fracción en masa de agua del cristal dihidratado.

### **III.E. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO**

Las soluciones para los estudios de crio-concentración fueron almacenadas a – 26°C hasta 60 días. Los sistemas deshidratados se ajustaron al contenido de agua deseado, luego los viales fueron herméticamente sellados y la estabilidad de las preparaciones de enzimas

fue testeada a 55°C. A intervalos de tiempo adecuados, dos muestras fueron removidas del *freezer* o estufa respectivamente, mantenidas 15 minutos a 25° C y la actividad remanente fue determinada como se describe a continuación.

### **III.F DILUCIÓN ÓPTIMA Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA REMANENTE.**

#### **III.F.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.**

En cada caso se realizaron las mediciones en exceso de sustrato respecto a la enzima (la dilución adecuada de enzima se obtuvo por diluciones sucesivas de los extractos, para hallar una respuesta lineal y correspondería a una concentración de sustrato equivalente a 10K<sub>M</sub>, donde K<sub>M</sub> es la constante de Michaelis-Menten, para obtener la máxima velocidad catalítica. Se realizaron los blancos de muestra (enzima inactivada) y de reactivos. Se midió la cantidad de productos de reacción como indicador de actividad previo comprobaciones discontinuas de que las mediciones se realizaron sobre una porción significativa de la curva de reacción. Como referencia (100%) se usó la actividad de una alícuota a tiempo cero.

##### *III.F.1.1. Amilasa:*

El grado de hidrólisis fue empleado como medida de actividad de amilasa, según el método de Tietz (1999). Todos los reactivos provistos por Wiener Lab, Rosario, Argentina).

- *Fundamento del método:* El sustrato (almidón) se incuba con la muestra, produciéndose la hidrólisis enzimática. Esta se detiene por el agregado de reactivo de yodo, por su alto pH, y al mismo tiempo produce color con el remanente de

almidón no hidrolizado. La disminución de color respecto de un sustrato color (sin muestra) es la medida de la actividad enzimática, que se expresa en UA%.

- *Sustrato:* Solución de almidón 500mg/l, tamponado a pH 7 con buffer fosfatos 0.1 mol/l en NaCl 0.15mol/l. Wiener lab.
- *Reactivos de Iodo:* Solución 0.01 eq./l de iodo en ácido clorhídrico 0.02 mol/l. Wiener lab.
- *Técnica:* Se incubó 1ml de sustrato atemperado a 37°, con 50μl del extracto diluido muestra en baño de agua a 37°C. A los 7 minutos y medio exactos, se agregó 1 ml de Reactivo de Yodo. Se mezcló por agitación suave y se retiraron los tubos del baño. Inmediatamente se agregó 8 ml de agua destilada. Luego de mezclar por inmersión, se leyó la absorbancia a 640 nm., llevando a cero con agua destilada dentro de los 20 minutos.

#### *III.F.1.2. Ureasa*

La actividad enzimática fue determinada mediante la medición de la cantidad de urea hidrolizada por el Método Faulkner and King (1970), con los reactivos provistos por Wiener Lab, Rosario, Argentina.

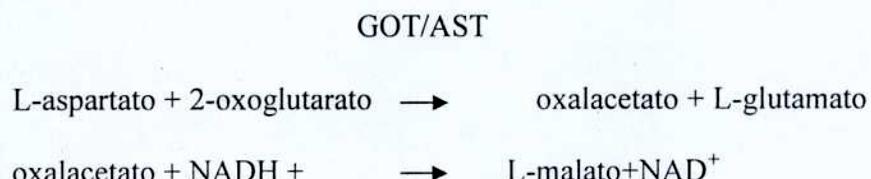
- *Fundamento del método:* la hidrólisis enzimática (ureasa) de la urea origina anhídrido carbónico y amoniaco, que se hace reaccionar con fenol e hipoclorito (reacción de Berthelot), en presencia de nitroprusiato como catalizador. El color desarrollado es proporcional a la cantidad de urea hidrolizada.
- *Sustrato:* Solución de urea. Concentración: 60 mg%

- *Reactivos:*
- -Reactivos 1 (reactivo fenólico): fenol, nitroferricianuro de sodio y etilen-bis-ditiocarbamato manganoso.
- -Reactivos 2 (hipoclorito alcalino): hipoclorito de sodio y p-toluen sulfocloramida en hidróxido de sodio.
- *Técnica:* Se mezcló el extracto con 20 µl de solución estándar de urea (0.6 g/l) por agitación suave y se incubó a 37°C durante 5 minutos a 37°C. Luego se agregó 1 mL del reactivo 1 y 1 mL del reactivo 2. Se mezcló por agitación suave e incubó a 37°C durante 5 minutos a 37°C y se agregó 8 ml de agua destilada. Se mezcló por inversión. Se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 640 nm, dentro de los 20 minutos, llevando a cero el aparato con agua destilada.

#### *III.F.1.3. Aspartato amino transferasa GOT (AST)*

La determinación de actividad enzimática se realizó según el método de Amador y Wacker (1962).

- *Fundamento del método:* se utilizó un método cinético UV para la determinación de la actividad según el consumo de NADH, basado en el siguiente esquema reaccionante:



*Sustrato:* 2-oxoglutarato, nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH), malato deshidrogenasa (MDH) y lactato deshidrogenasa (LDH). Wiener lab. Buffer: solución de buffer TRIS pH 7.5 con L-aspartato.

- *Técnica:* La disminución de absorbancia/min. ( $\Delta A/min$ ) dentro de 3 minutos de registrada la reacción a 340 nm multiplicada por un factor (1,740) es la medida de la actividad enzimática, que se expresa en UI.

Para cada enzima contenida en el sistema, se tomaron dos muestras independientes, a un tiempo seleccionado y se analizaron dos réplicas de cada muestra, informando el promedio de cuatro medidas para cada tiempo de almacenaje. El error relativo (para un intervalo de confianza de 95 %) fue de 5%.

La actividad de la enzima determinada después de un tratamiento dado (A) fue relacionada a la actividad medida en condiciones iniciales ( $A_0$ ) y la actividad remanente (AR) calculada como:

$$AR = 100 A/A_0. \quad (III.2)$$

### III.G. PROPIEDADES TERMOFÍSICAS

#### III.G.1. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC):

Se utilizó un calorímetro diferencial de barrido (DSC) y el Sistema de análisis térmico STARE versión 3.1 (Mettler Toledo AG) para todas las mediciones. El instrumento fue calibrado con indio (punto de fusión 156.6°C) y zinc (punto de fusión 419.6°C).

Un análisis estadístico con varias réplicas indicó que para las propiedades termodisfísicas determinadas en los sistemas analizados, un mínimo de dos réplicas deben ser medidas para obtener valores oscilantes cercanos al 95% del intervalo de confianza. Los análisis se realizaron por duplicado en recipientes de aluminio (Mettler, 40  $\mu$ l) herméticamente sellados conteniendo las muestras (entre 10-15 mg). Un recipiente vacío fue usado como referencia.

#### III.G.2. DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE TRANSICIÓN VÍTREA

( $T_g$ ):

El método dinámico fue usado para determinar la temperatura de transición vítreo ( $T_g$ ), en los sistemas modelos. Cada muestra fue calentada a una velocidad de 10°K/min. Las temperaturas de las transiciones vítreas fueron determinadas a partir de las discontinuidades detectadas en las curvas de flujo de calor versus temperatura de calentamiento. La  $T_g$  se consideró como la temperatura a la cual comienza el cambio en el

calor específico (valor “onset”) que se detecta en el termograma como un corrimiento endotérmico de la línea de base.

### III.G.3. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE CRISTALIZACIÓN DE AZÚCAR O AGUA:

Se realizaron mediciones dinámicas para determinar las temperaturas de cristalización de azúcar ( $T_c$ ) o agua ( $T_{wc}$ ), entalpías de cristalización del azúcar ( $\Delta H_c$ ) o fusión ( $\Delta H_m$ ) y calores de cristalización de agua ( $\Delta H_{wc}$ ) o fusión ( $\Delta H_{wm}$ ). Las temperaturas de cristalización informadas corresponden a la temperatura a la cual la línea de base comienza a desviarse para dar el pico exotérmico de cristalización. Los valores de entalpía de cristalización o fusión se obtuvieron calculando el área de la transición exotérmica o endotérmica respectivamente, en relación a la masa de la muestra. El área de los picos endotérmicos obtenidos en los termogramas por DSC para muestras deshidratadas fue usada para estimar el grado de cristalización de trehalosa, relacionándola con la entalpía de fusión del cristal dihidrato puro de trehalosa, la cual fue de 139 J/g medida en las mismas condiciones.

En las muestras congeladas, la cantidad de hielo formado después del almacenaje bajo condiciones isotérmicas a -26°C fue calculado relacionando la diferencia entre los picos endotérmicos obtenidos en los termogramas ( $\Delta H_m$ ) y los picos exotérmicos correspondientes al agua cristalizada durante el calentamiento dinámico ( $\Delta H_c$ ), con la entalpía de fusión de agua pura (330 J/g). El agua asociada a la fase amorfa se calculó restando al agua inicial del sistema el agua congelada después del almacenaje, previo a la corrida por DSC.

## **IV. RESULTADOS**

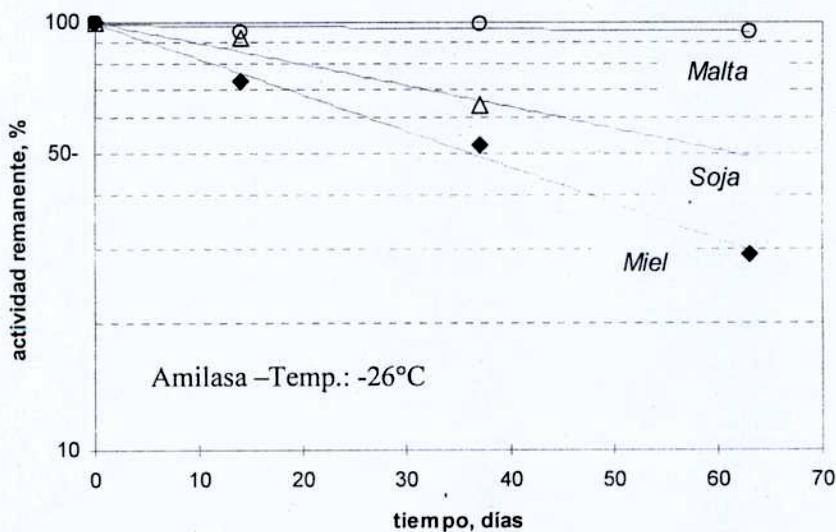
#### **IV. A. ESTABILIDAD DE LAS ENZIMAS EN MODELOS DE ALIMENTOS CONGELADOS.**

La preservación de productos biológicos lábiles tiene importantes aplicaciones en los campos de la biología, la bioquímica, la medicina y la ciencia de los alimentos. La congelación se considera el mejor método de conservación a largo plazo de los alimentos, pero la integridad de las proteínas puede verse afectada (Carpenter y col., 1986; Kerr y col., 1993). Los alimentos o sistemas de alimentos congelados tienen regiones amorfas en equilibrio metastable y, dependiendo de la temperatura de almacenamiento, la temperatura y velocidad de congelación, pueden contener una cantidad significativa de agua sin congelar donde los solutos se concentran en una fase no congelada con propiedades (como pH, fuerza iónica y viscosidad) significativamente diferentes respecto al sistema original. La estabilidad de las biomoléculas en sistemas de alimentos congelados no sólo se asocia entonces con la temperatura, sino también con la transición vítreo y la cantidad de agua no congelada (Sallinen. y Ross, 1988). Las enzimas presentes en los alimentos constituyen un sistema útil para estudiar los factores que afectan las reacciones de deterioro típicas de los alimentos congelados.

En esta sección se estudió la estabilidad al congelado de las distintas enzimas de alimentos como miel y semillas, seleccionadas como modelos de sistemas en matrices naturales o modificadas por el agregado de trehalosa y el posible efecto sinérgico entre este azúcar y algunos iones. Las muestras fueron almacenadas isotérmicamente a -26°C para evaluar el comportamiento de los sistemas a la temperatura de almacenamiento recomendada para los alimentos congelados.

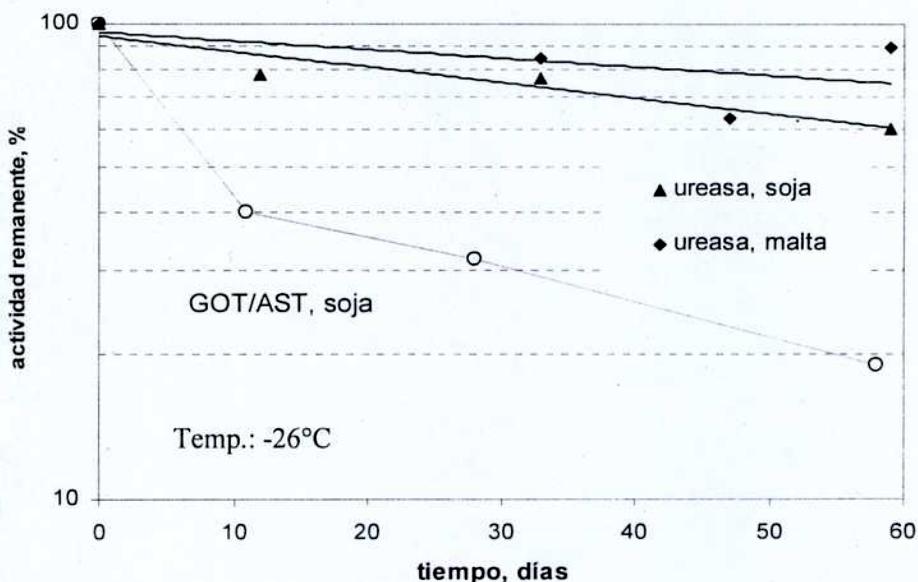
#### IV. A.1 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ESTABILIDAD DE LAS DIFERENTES ENZIMAS EN LOS SISTEMAS CONGELADOS.

En primer término, se analizó la estabilidad de distintas enzimas: amilasa, ureasa y aspartato amino transferasa (GOT/AST) en sistemas naturales acuosos (fracción en masa de agua (W) igual o mayor a 0.9, ver sección III.A.) en ausencia de aditivos que fueron almacenados a -26 °C. La Figura IV.A.1 muestra la actividad remanente de la enzima amilasa de las diferentes fuentes estudiadas (miel, soja y malta) en función del tiempo de congelamiento a -26°C.



**Figura IV.A.1.** Actividad remanente de amilasa de distintas fuentes, en función del tiempo de almacenamiento a -26°C. ○ Malt: extracto acuoso de cebada germinada; △ soja: extracto acuoso de soja; ♦ solución de miel (12.5 % p/p).

La Figura IV.A.2. muestra la actividad remanente de las enzimas de los extractos vegetales: ureasa (soja y malta) y aspartato amino transferasa (GOT/AST) (soja) en función del tiempo de almacenamiento a -26°C.



**Figura IV.A.2.** Actividad remanente de las soluciones de enzimas de la fracción soluble de las semillas de soja y malta en función del tiempo de almacenamiento a -26°C. ▲ Ureasa (soja); ◆ Ureasa (malta) y ○ Aspartato amino transferasa (GOT/AST) (soja).

La pérdida de actividad de las enzimas estudiadas durante el almacenamiento isotérmico mostró una dependencia logarítmica en función del tiempo, que se ajustó a una cinética de primer orden (característica de los procesos de desnaturación de proteínas) según la ecuación:

$$\ln a/a_0 = - k_i \cdot t \quad (\text{IV.I.})$$

donde  $t$ : tiempo de incubación

$a_0$ : actividad de la enzima a  $t=0$

$a$ : actividad de la enzima al tiempo  $t$

$k_i$ : constante de velocidad de inactivación enzimática.

Aplicando este modelo cinético se calcularon las constantes de inactivación y los tiempos de vida media (tiempo para disminuir en un 50% la actividad inicial,  $t_{1/2}$ ) a -26°C para todas las enzimas estudiadas, excepto para la enzima GOT/AST de soja que mostró un coeficiente de correlación bajo y por lo tanto se estimó el  $t_{1/2}$  a partir de la interpolación de los datos experimentales directamente. Los valores obtenidos y los coeficientes de correlación correspondientes se muestran en la Tabla I.V.A.1. La constante de inactivación para la enzima amilasa de malta no pudo ser calculada ya que los valores de actividad fueron prácticamente constantes a esa temperatura.

**Tabla IV.A. 1.** *Constantes de inactivación ( $k_i$ ) y tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) para las enzimas amilasa (soja y miel), ureasa (soja y malta) y GOT/AST (soja) calculadas con un ajuste correspondiente a una cinética de orden 1 para los sistemas almacenados a -26°C. Se muestra también el coeficiente de correlación lineal ( $r^2$ ) correspondiente.*

Enzimas	$k_i$ (días <sup>-1</sup> )	$r^2$	Temperatura °C	$t_{1/2}$ (días)
<b>Amilasa:</b>				
• Soja	0,0113	0,9405	-26	61
• Miel solución 12,5 % p/p	0,0193	0,9629	-26	36
• Miel sin diluir *	0,0004214	np	21	1650
<b>Ureasa:</b>				
• Soja	0,0092	0,8485	-26	75
• Malta	0,0052	0,8415	-26	132
• Soja	0,0312	0,6472	-26	10 **

np: no publicado

\* Se incluyeron datos para miel sin diluir, medidos por White y col. (1964) como actividad diastásica.

\*\* Valor estimado por interpolación de los datos experimentales

**IV. A.1.a. Amilasas (miel, soja, malta)**

La enzima amilasa del extracto de malta fue la que se mantuvo más estable durante el almacenamiento a  $-26^{\circ}\text{C}$ , con valores de actividad remanente prácticamente constantes en el periodo de tiempo estudiado (Figura IV.A.1). La actividad de la enzima del sistema de miel fue la que más disminuyó con el tiempo de almacenamiento, el tiempo de vida media fue de 36 días, siendo este valor aproximadamente la mitad del  $t_{1/2}$  determinado para la amilasa de soja.

Estudios previos comprobaron que la cinética de desnaturización térmica de amilasa de miel en un rango de  $-20$  a  $71^{\circ}\text{C}$  se ajustaba al modelo de Arrhenius (White y col., 1964; Babacan y col.; 2002). Estos autores calcularon el valor de la energía de inactivación ( $E_a$ ) para esta enzima encontrando una alta variabilidad debido a la diversidad de tipos de miel y de los métodos de medición. Los valores obtenidos en el presente trabajo para la constante de inactivación de amilasa en un sistema tan diluido como el ensayado, difieren notablemente de los estimados por White y col. (1964) para miel pura (ver Tabla IV.A.1). Sin embargo, estudios recientes mostraron que la enzima amilasa de miel en su forma purificada fue menos resistente al tratamiento térmico que la enzima en su entorno original, revelando el efecto protector de los componentes naturales sobre la enzima (Babacan y Rand, 2007). Se sabe que la miel pura es un sistema sobresaturado de azúcares (glucosa y fructosa) que confieren alta viscosidad al medio y protegen a sus biomoléculas. Es de esperar entonces un efecto desestabilizante por el agregado de agua al sistema de miel. Se observó que la enzima amilasa en una solución de 12,5 % de miel ( $W=0,9$ ) fue particularmente susceptible a la inactivación por congelación.

**IV. A.1.b. Ureasa (soja, malta)**

Las enzimas ureasas de soja y malta fueron muy estables a -26°C. Los valores de actividad remanente luego de 60 días de almacenamiento fueron entre 60-70% respecto de la actividad inicial, dependiendo de la variedad botánica estudiada (Figura IV.A.2.)

**IV. A.1.c. Aspartato amino transferasa (GOT/AST) (soja)**

Se observó que la estabilidad de la enzima GOT/AST de soja en el extracto acuoso se perdió rápidamente al almacenarla a -26°C, siendo el tiempo de vida media aproximadamente de 10 días (Figura IV.A.2). Comparando los  $t_{1/2}$  (Tabla IV.A.1) se observa que la GOT/AST de soja es la enzima más lábil de las enzimas analizadas.

Como la estabilización o inhibición de la actividad enzimática en sistemas congelados depende de los efectos generales provocados por la congelación (concentración de sales, cambios en el pH, transiciones de estado, etc.) y de la naturaleza de la enzima en particular (Carpenter y col., 1986), en el presente trabajo, se seleccionaron las enzimas que fueron más lábiles a las condiciones de almacenamiento (GOT/AST de soja y amilasa de miel) como sistemas modelos para estudiar el efecto de las distintas variables (composición, estado físico del medio) que permitirían aumentar *in-vitro* la estabilidad durante el congelado. Se realizaron ensayos para estudiar conjuntamente la preservación de las enzimas y las propiedades físicas de los sistemas modelos modificados por el agregado de trehalosa y trehalosa con sales.

#### IV. A.2. ESTRATEGIAS PARA AUMENTAR LA ESTABILIDAD ENZIMÁTICA EN MODELOS DE ALIMENTOS CONGELADOS: EMPLEO DE AZÚCARES PROTECTORES.

Los azúcares de bajo peso molecular y polioles son utilizados como agentes crioprotectores en la industria alimentaria; por ejemplo la sacarosa y el sorbitol son usados comúnmente en la estabilización de proteínas miofibrilares de pescado (Noguchi y Matsumoto, 1970; Noguchi, 1974). Se sabe que el azúcar trehalosa (disacárido de glucosa) es un buen agente estabilizante de materiales biológicos durante el congelamiento y tiene el beneficio adicional de proteger a ciertas proteínas durante el secado posterior (Crowe y col., 1996; Miller y col, 1997, 1998; Mazzobre, 2001; Mazzobre y col.; 2006). Este azúcar es un osmolito natural que se acumula en las células de organismos vivos como mecanismo de adaptación a ambientes con temperaturas extremadamente bajas (Montiel, 1998). *In vitro*, no es posible generalizar estos efectos ya que esta protección depende también de la naturaleza de las proteínas (Kaushik y Bhat, 2003). En los últimos años la trehalosa fue aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) como aditivo de uso alimentario.

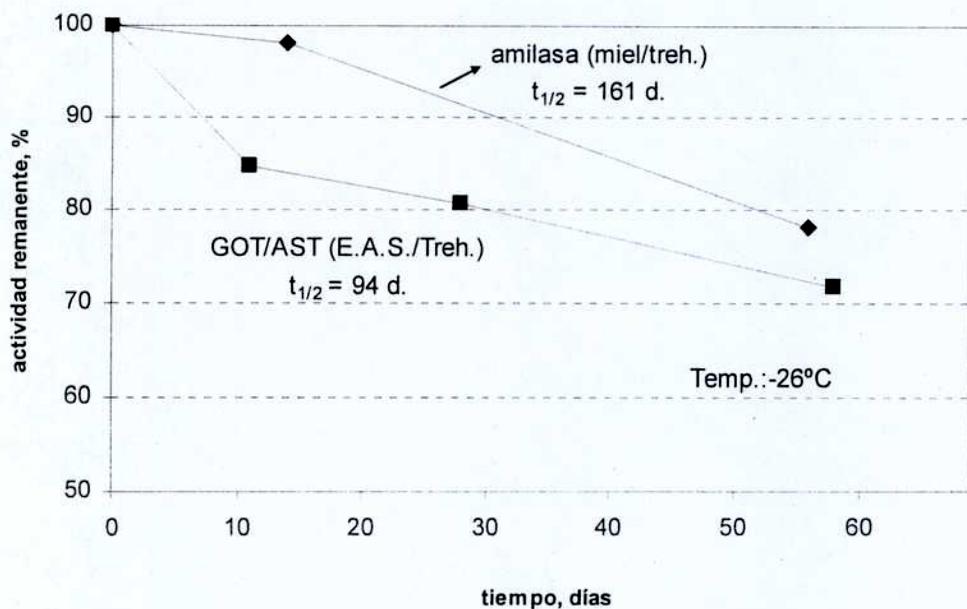
Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo se eligió a este disacárido para evaluar su efecto sobre la estabilidad de los sistemas enzimáticos de los distintos alimentos que fueron afectados por el congelado. Como la capacidad protectora de un aditivo durante el congelamiento está directamente relacionada con su concentración inicial y se necesitan concentraciones relativamente altas (más de 0,3 M) para afectar la estabilidad de la proteína (Arakawa y col, 1993), se estudió la protección de las enzimas empleando una concentración inicial de trehalosa de 20% (p/v).

#### **IV. A.2.1 Estabilidad de las enzimas de sistemas modelos de alimentos congelados en presencia de trehalosa.**

Se examinó el efecto de la incorporación de trehalosa sobre la estabilidad de los sistemas enzimáticos conteniendo amilasa de miel y GOT/AST de soja, seleccionadas en la sección anterior.

En los sistemas modificados por el agregado del disacárido aumentó la cantidad de sólidos totales. Los sistemas de miel puros tenían 10,4% p/p de sólidos de miel y los modificados 27,8% p/p de sólidos totales (10,4% sólidos de miel y 17,4 % de trehalosa), el sistema de la enzima GOT/AST (soja) modificado con el agregado de trehalosa (E.A.S./Treh) tenía 20% de sólidos (trehalosa) ( $W=0,8$ ) (ver Tabla III.1.).

La Figura IV.A.3 muestra la actividad remanente de la enzima amilasa en el sistema modificado miel-trehalosa (Miel/Treh.) y de la enzima GOT/AST de soja en el extracto acuoso modificado con el agregado de trehalosa (E.A.S./Treh.) en función del tiempo de almacenamiento a  $-26^{\circ}\text{C}$ . Para cada sistema se indican los tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) correspondientes. Ajustando los datos experimentales a una cinética de orden uno se obtuvo la constante de inactivación a  $-26^{\circ}\text{C}$  de la enzima amilasa en el sistema Miel/Treh. ( $k_i = 0.0043 \text{ días}^{-1}$ ) y de la enzima GOT/AST (soja) en el sistema E.A.S./Treh. ( $k_i = 0.0074 \text{ días}^{-1}$ ), los coeficientes de correlación lineal fueron 0.9475 y 0.8482, respectivamente.



**Figura IV.A.3.** Actividad remanente de las enzimas: ◆ amilasa (miel), en el sistema modificado miel-trehalosa (27.8% de sólidos totales) y ■ GOT/AST (soja) en el sistema modificado con el agregado de trehalosa (E.A.S/Treh.)(20% de sólidos totales) en función del tiempo de almacenamiento a -26°C. Para cada sistema se indican los tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) correspondientes.

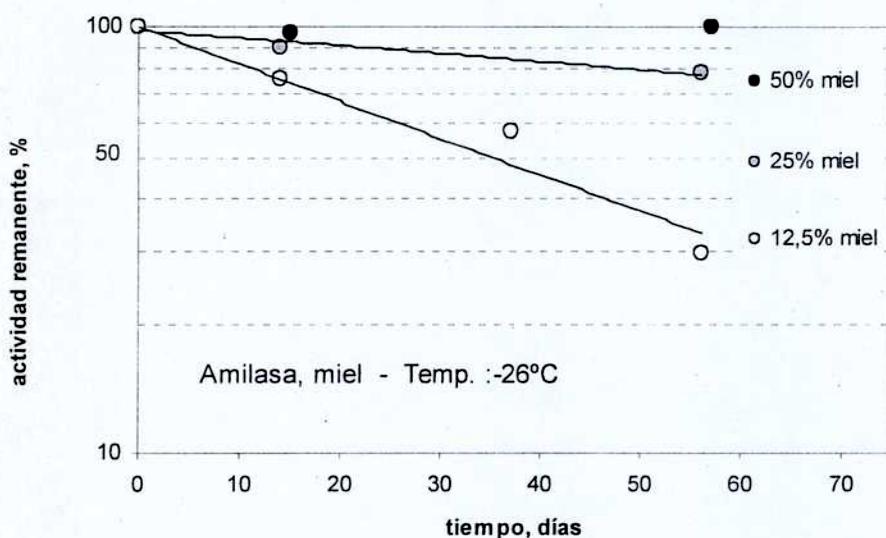
Se observó que en los sistemas modificados la  $k_i$  disminuyó y por lo tanto los  $t_{1/2}$  a -26°C de las enzimas aumentaron (respecto a los valores obtenidos para los sistemas puros en la Tabla IV.A.1), alcanzando un valor de 161 días y de 94 días para la amilasa (miel) y la enzima GOT/AST (soja) respectivamente, lo cual indica que en presencia de trehalosa la estabilidad de las enzimas al congelado fue mayor.

Debe tenerse en cuenta que la adición de trehalosa a la miel aumentó el contenido de sólidos y modificó el perfil de los azúcares (mono y disacáridos) de la matriz. Por lo tanto podrían haber dos efectos involucrados en el incremento de la estabilidad enzimática observado: un efecto dado por el aumento en el contenido de sólidos del sistema y otro específico del azúcar trehalosa. La evaluación del efecto crioprotector a nivel molecular resulta entonces compleja ya que podría haber también interacciones específicas

adicionales de la trehalosa con los azúcares presentes en la miel. Sin embargo, es una situación interesante a examinar porque se sabe que la combinación de varios azúcares es una opción a considerar para la crioprotección de alimentos (MacDonald y Lanier, 1991). Se ha observado que ciertos insectos (*Eurosta solidaginis*) acumulan mezclas de carbohidratos, cuya síntesis está inducida estacionalmente en climas extremadamente fríos (Wasyluk y col, 1988).

#### IV. A.2.2. Efecto de la proporción de sólidos sobre la estabilidad al congelado de la enzima amilasa del sistema de miel.

Los resultados obtenidos en la sección anterior mostraron que el agregado del azúcar trehalosa al sistema de carbohidratos de miel mejoró la estabilidad de la enzima amilasa durante el congelamiento. Resultó interesante entonces analizar la relación entre la composición y el contenido de sólidos iniciales con la conservación de la actividad enzimática durante el almacenamiento isotérmico a -26°C en ambos sistemas (puros de miel y modificados). Los sistemas se prepararon en las proporciones señaladas en la Tabla III.1., en los sistemas modificados la cantidad de sólidos totales cambió por el agregado de trehalosa. En primer término se analizó la estabilidad de la enzima amilasa en el sistema de carbohidratos de miel (solución sobresaturada de glucosa y fructosa) con distintos contenidos de agua en función del tiempo de almacenamiento a -26°C (Figura IV.A.4).



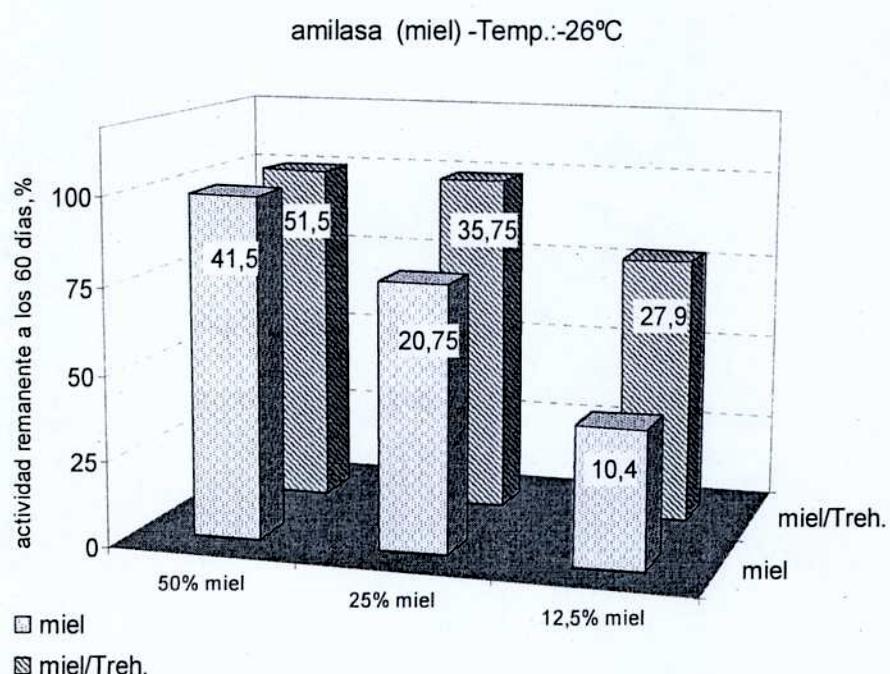
**Figura IV.A.4.** Actividad remanente de la enzima amilasa en el sistema de carbohidratos de miel/agua en función del tiempo de almacenamiento a -26°C. Sistemas: ● 50% miel, ○ 25% miel, ○ 12,5% de miel.

Se observó que a tiempos cortos (15 días) cualquiera de las diluciones de miel analizadas protegió satisfactoriamente a la enzima amilasa, pero a tiempos de almacenamientos mayores de 40 días la actividad remanente se conservó sólo en los sistemas con mayor cantidad de miel. Estos resultados estarían relacionados con dos factores. Uno sería el desarrollo de un mecanismo de “auto-protección” de la enzima con el aumento de su concentración, por lo cual mejoraría su estabilidad en los sistemas con mayor cantidad de miel. Este es un comportamiento que ya fue observado para otras proteínas y sólo se manifiesta en sistemas congelados (Tamiya y col. 1985; De Cordt y col., 1992; Izutsu y col., 1994; Miller y col., 1998; Lecker y Khan, 1998). Por otro lado, la dilución de la miel disminuiría el número de moléculas de azúcares que naturalmente brindan protección. Otros autores observaron también este efecto sobre las enzimas de la miel pero almacenando los sistemas a otras temperaturas. Por ejemplo la enzima invertasa resultó ser alrededor de 24 veces menos resistente al tratamiento térmico a 50 y 60°C cuando la miel fue diluida respecto a la enzima en la miel sin diluir (White y col. 1964) . También se informó que la resistencia térmica de la enzima amilasa disminuyó drásticamente cuando fue purificada; el valor de  $t_{1/2}$  a 40°C fue de 24 min, para la enzima purificada y de 31 días en la miel sin diluir (Babacan y Rand, 2007).

En el presente trabajo la estabilidad enzimática a -26°C disminuyó marcadamente al aumentar la dilución de la miel.

En un segundo grupo de experimentos se comparó la estabilidad de la enzima amilasa en sistemas modificados con trehalosa. Las muestras de los sistemas modificados tenían igual cantidad de miel (o igual cantidad de enzima) que las muestras de miel sola (50, 25 y 12.5% de miel) pero distinta cantidad de sólidos. La cantidad de sólidos totales

aumentó por el agregado de trehalosa (ver Tabla III.1). En la Figura IV.A.5 se compara la actividad remanente de la enzima amilasa en las muestras de los sistemas diluidos de miel y miel modificada con trehalosa (Miel/Treh.) luego de 60 días de almacenamiento a -26°C (tiempo de máxima desestabilización, ver Figura IV.A.1).

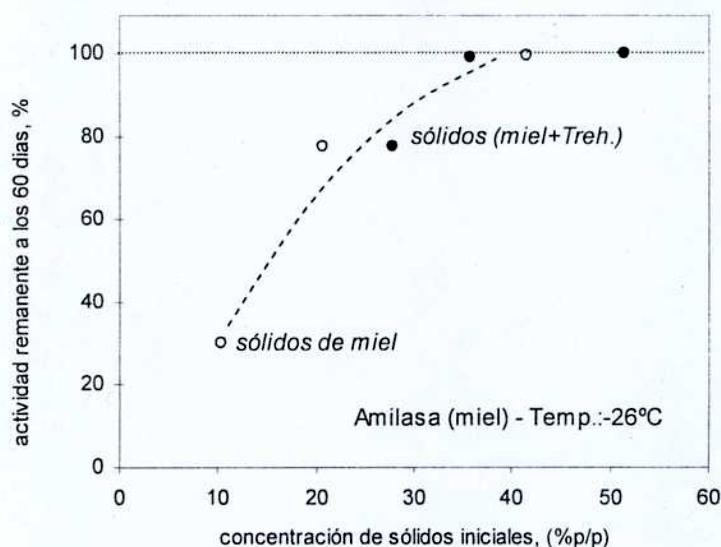


**Figura IV.A.5.** Actividad remanente de la enzima amilasa en sistemas miel/agua y sistemas modificados miel/trehalosa (miel/Treh.) luego de 60 días de almacenamiento a -26°C. Los sistemas modificados tienen igual cantidad de miel que el sistema de miel sola, la cantidad de sólidos totales aumentó por el agregado de trehalosa. Se indica en cada barra el contenido de sólidos totales de la matriz (% p/p).

En todos los sistemas estudiados (tanto sistemas puros como sistemas mezcla), la estabilidad de la enzima aumentó al aumentar la proporción de miel en la matriz. En las muestras con 50% de miel la actividad enzimática inicial se mantuvo luego del tiempo de congelamiento y no se observaron diferencias debidas a la incorporación de trehalosa.

Probablemente la cantidad de enzima en estos sistemas concentrados sea lo suficientemente alta para “auto-protecterse” del deterioro provocado durante el congelamiento. Este efecto “auto-protector” puede ser atribuido a la disminución del porcentaje de proteína dañada por la interfase hielo-agua (ver IV A.2.1.3). Por otro lado, en los sistemas más diluidos (12.5 y 25% de miel) la adición de trehalosa mejoró la estabilidad de la enzima con respecto a la obtenida en la matriz de miel sola, y el efecto crioprotector fue mayor al disminuir la concentración de miel.

En base a estas observaciones, se analizó si la mayor estabilidad de los sistemas conteniendo trehalosa se debía a una acción crioprotectora específica del azúcar o fue consecuencia del aumento del contenido de sólidos en estas matrices modificadas. La Figura IV.A.6. muestra la actividad remanente de la enzima amilasa luego de 60 días de congelamiento a  $-26^{\circ}\text{C}$  en los dos sistemas: miel/agua y modificado miel/trehalosa en función de la concentración de sólidos de la solución inicial .



**Figura IV .A.6.** Efecto del contenido de sólidos sobre la actividad remanente de amilasa almacenada durante 60 días a  $-26^{\circ}\text{C}$  en sistemas miel/agua y miel/trehalosa. Los datos de contenido de sólidos se discriminaron en los aportados por la miel (○) y los aportados por la miel y la trehalosa en los sistemas modificados (●).

Se observó que la actividad enzimática remanente a los 60 días de congelado dependió del contenido de sólidos iniciales de las muestras, hasta alcanzar la estabilidad máxima de amilasa en los sistemas con una concentración de 40% (p/p) de sólidos. Este sería un valor crítico de concentración a partir del cual se logra estabilizar los sistemas en las condiciones analizadas. Además, los puntos correspondientes a los sistemas miel/trehalosa en la Figura IV.A.6 siguen prácticamente la misma tendencia que aquellos sin trehalosa, lo cual indica que en estos sistemas no se observó un efecto especial del disacárido, más que el de incrementar el contenido de los azúcares en la solución. Otros autores también observaron que la efectividad crioprotectora está directamente relacionada con la concentración inicial de los azúcares. Miller y col., (1998) trabajando con la enzima lactato deshidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27, Tipo II, músculo de conejo) y MacDonald y col., (1996) con la enzima que hidroliza el adenosintrifosfato (Ca-ATPasa, actomiosina de *Tilapia nilotica*) encontraron que la estabilidad enzimática durante el congelamiento fue proporcional a la concentración de azúcares hasta alcanzar una cantidad óptima, a partir de la cual en algunos casos podría disminuir incluso la protección. Este valor fue dependiente de la enzima y varió con el azúcar y la composición del medio.

En el presente trabajo la adición de trehalosa permitió mejorar la estabilidad de la enzima amilasa de miel y de la enzima GOT/AST de soja en los sistemas contenido 40% y 20% de sólidos iniciales respectivamente. Esta información podría resultar útil si se desea diseñar una formulación que provea protección frente a la desnaturalización proteica en sistemas congelados (Izutsu y col., 1995; Miller y col., 1998; Kaushik y Bhat, 2003).

El mecanismo de estabilización de la trehalosa ha sido ampliamente estudiado y se relacionó con la capacidad de establecer interacciones específicas azúcar-proteína, por la capacidad de formar un sólido amorfo y por el efecto adicional observado a bajas

temperaturas de disminuir la formación de cristales de hielo (Carpenter y col., 1986; Crowe y col., 1994; Miller y col., 1998, Fields y col., 2001). Desde el punto de vista termodinámico, los azúcares favorecen la estructura nativa del biomaterial porque estabilizan las interacciones hidrofóbicas intramoleculares, incrementando la hidratación preferencial de la proteína con exclusión selectiva del azúcar y aumento del agua que rodea la superficie (Arakawa y Timasheff, 1982a; Kaushik y Bhat, 2003.). Desde el punto de vista cinético, se observó que el agregado de azúcares promueven la formación de regiones amorfas que se encuentran en equilibrio metaestable (o estado de no equilibrio), donde los cambios son dependientes del tiempo (Crowe y col., 1996; Miller y col, 1997).

Además, el azúcar trehalosa ha demostrado tener un efecto caótropico sobre la estructura del agua que distorsiona la estructura tetraédrica de la molécula e inhibe la formación de cristales de hielo (Patist y Zoerb, 2005).

Teniendo en cuenta estos antecedentes se estudiaron los cambios térmicos de las matrices de carbohidratos de miel, carbohidratos de miel/trehalosa y solución del extracto de soja/trehalosa por DSC, para obtener información sobre los estados de equilibrio termodinámicamente estables y metaestables, la cinética de cristalización del hielo en los distintos sistemas y su relación con la capacidad crioprotectora de los mismos (ver sección IV.A.3).

#### IV. A.3. ESTABILIDAD DE LAS ENZIMAS DE SISTEMAS MODELOS DE ALIMENTOS CONGELADOS EN SOLUCIONES SALINAS O SOLUCIONES SALINAS COMBINADAS CON TREHALOSA.

El efecto de los electrolitos tiene un interés especial debido a que están presentes en todos los sistemas biológicos, afectan la estructura del agua y serían capaces de interactuar con moléculas biológicas. Existen evidencias que indican que ciertas sales pueden estabilizar proteínas, en términos generales esta habilidad se debería a un balance entre los efectos específicos que se producen por la unión de los iones a la proteína y por la modificación del equilibrio fisicoquímico del medio (Arakawa y Timashoff, 1982 b; Arakawa y col., 1993). Se ha comprobado un sinergismo entre cationes divalentes y matrices de sacarosa para proteger ciertas enzimas en sistemas congelados (Okada: 1963; Castell y col., 1970; Carpenter y col., 1987; Hazen y col., 1988). Sin embargo la información del efecto de los iones sobre la funcionalidad/estabilidad en matrices de trehalosa durante el congelamiento no es concluyente (Miller y col., 1998; Mazzobre, 2001; Longinotti y col., 2002). El efecto de los iones sobre el entorno está establecido por las llamadas series liotrópicas de Hofmeister, de acuerdo a esta teoría, los iones imponen un orden local sobre el agua que los rodea, donde los agentes cosmotrópicos refuerzan su estructura y por el contrario los caotrópicos aumentan el desorden molecular. Las propiedades del agua son entonces profundamente modificadas y pueden afectarse también las interacciones entre las macromoléculas, especialmente en los sistemas concentrados; sus efectos son estudiados recientemente en sistemas biológicos y alimentos (Lo Nostro y col., 2005; Calligaris y Nicoli, 2006)

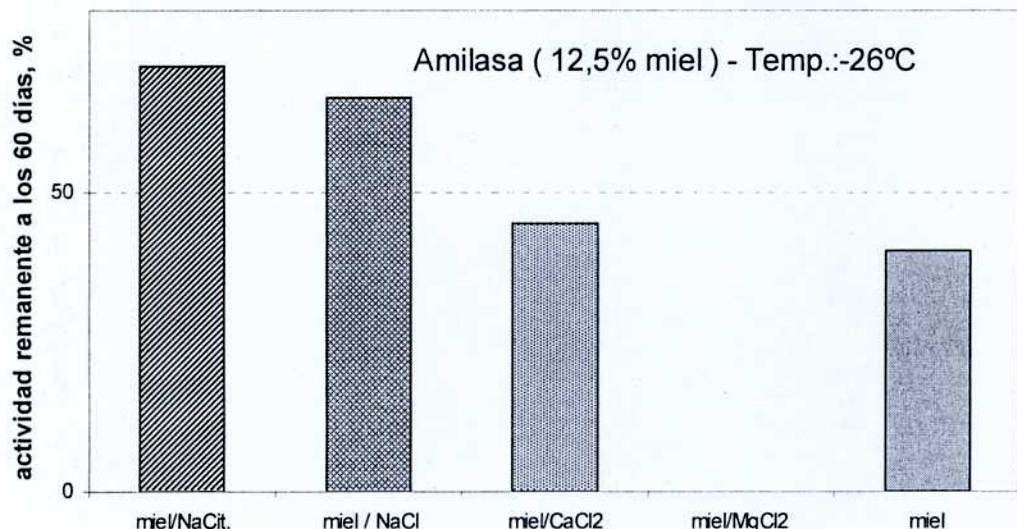
En base a estas observaciones, en esta sección del trabajo se investigó el efecto del agregado de varias sales sobre la estabilidad de las enzimas estudiadas (amilasa de miel y aspartato amino transferasa (GOT/AST) de soja y sobre las propiedades físicas de los sistemas originales o modificados por el agregado de trehalosa. Se seleccionaron varios cloruros ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $NaCl$ ,  $Ca_2Cl$ ) y citrato de sodio ( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ), sales potencialmente importantes en el estudio de la ciencia de los alimentos. Las especies iónicas tienen efecto cosmotrópico (citrato,  $Mg^{++}$ ), caotrópicos (cloruros) y neutrales ( $Na^+$  y  $Ca^{++}$ ).

#### **IV. A.3.1. Amilasas en sistemas de miel**

El efecto específico de ciertas sales sobre la actividad de amilasas en solución ya fue estudiado. Estudios previos establecieron que la mayoría de las enzimas  $\alpha$  amilasas de origen animal y algunas amilasas de origen bacteriano son estabilizadas por la presencia de iones pequeños como cloruros. Levitzky y Steer (1971) demostraron que la unión esteroespecífica de estos aniones con la enzima inhibe su desnaturación al estabilizar la unión de la proteína con su cofactor, el ión calcio. De acuerdo con esto, los aniones más grandes no podrían incorporarse a este sitio especial de unión y no protegerían la enzima. Sin embargo, ensayos posteriores informaron que los iones de citrato de sodio, en cierto rango de concentración, pueden formar un complejo con la enzima aumentando su estabilidad (Lecker y Khan, 1998). En general, se podría suponer que cualquier factor que altere termodinámicamente la estabilización de una proteína nativa en solución tenderá a tener el mismo efecto durante el congelamiento. Sin embargo, cuando un sistema de multicomponentes (como la miel) es congelado se producen además cambios drásticos del

entorno que podrían afectar las interacciones entre la enzima y estos componentes (Carperter y col., 1987). Para analizar este efecto se evaluó experimentalmente el comportamiento de los aniones de diferente tamaño (cloruros y citrato) y de los distintos cationes sobre la actividad de la enzima en sistemas sobreenfriados. La concentración de sales se mantuvo en valores constantes, (0.1M) en todos los casos.

En primer lugar, se analizó el efecto del agregado de las distintas sales sobre la estabilidad de la enzima en el sistema de miel (12.5% miel). En la Figura IV.A.7 se comparó la actividad remanente de la enzima amilasa luego de 60 días de almacenamiento a -26°C (condiciones de tiempo y concentración críticas para la estabilidad de la enzima (ver Figura IV.A.4)) en los sistemas con 12.5% de miel y los sistemas combinados con las sales (III.B)

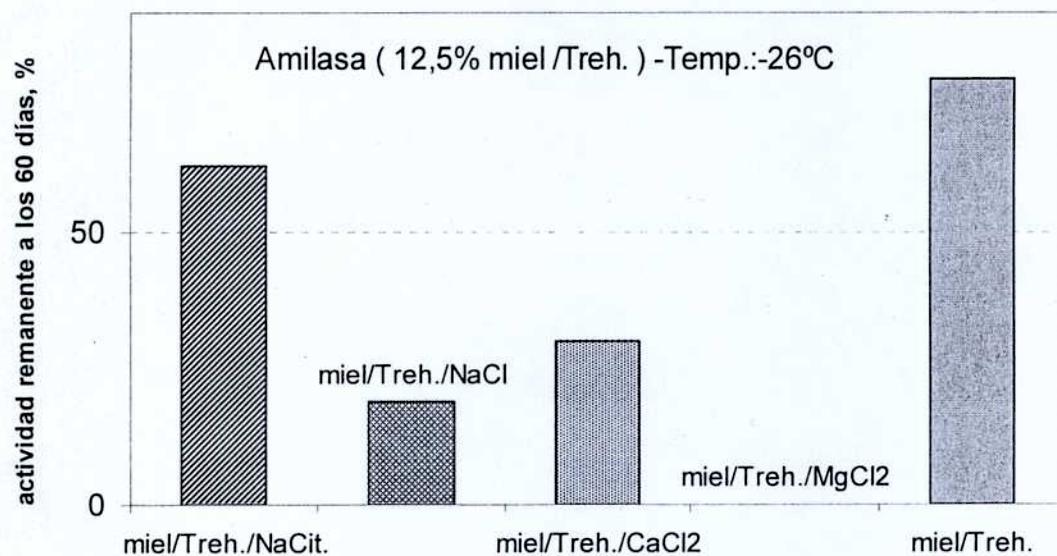


**Figura IV.A.7.** Actividad remanente de la enzima amilasa en el sistema miel/agua (12.5% miel) en presencia de distintos cloruros:  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $NaCl$ , y  $Ca_2Cl$  y citrato de sodio ( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ) luego de 60 días de almacenamiento a -26°C. Concentración de sal: 0.1M en todos los casos.

Se observó que el agregado de las sales de sodio (citrato y cloruro) al sistema de carbohidratos de la miel antes del congelado mejoró la estabilidad de la enzima amilasa con respecto a la observada en las muestras sin sal. El cloruro de calcio tuvo muy poco efecto y en presencia de cloruro de magnesio la enzima se inactivó completamente. El efecto de los distintos cloruros sobre la actividad remanente de la enzima dependió del tipo de catión involucrado. El catión  $\text{Na}^+$  brindó mayor estabilidad que los cationes divalentes, el efecto de  $\text{Ca}^{+2}$  fue muy débil, mientras que el  $\text{Mg}^{+2}$  inhibió a la enzima. Estudios recientes mostraron resultados similares acerca de la influencia de estas sales sobre la actividad de la enzima amilasa de miel. Babacan y Rand (2007), observaron que la enzima purificada es inhibida por  $\text{MgCl}_2$  (22.4%) mientras que el  $\text{CaCl}_2$  (en una concentración normalmente presente en la miel, 0.4 mM) no tuvo ningún efecto. Se sabe que la mayoría de las  $\alpha$ -amilasas son metaloenzimas que necesitan iones calcio como cofactor para su actividad (Thoma y col., 1971), pero según se observó en el presente trabajo el agregado de  $\text{Ca}^{+2}$  no aumentó la estabilidad de esta enzima en estado congelado. Otros autores ya habían encontrado que la presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  extrínseco no mejoraba la resistencia térmica de la enzima amilasa en miel y amilasa en secreción salival de abeja (Rinaudo y col., 1973). Por otro lado, Lecker y Khan (1998), trabajando con amilasa de papa, comprobaron que la asociación de cationes fuertemente desestabilizantes (como es en este caso el ión magnesio) con los cloruros, producía la pérdida del efecto positivo que estos tienen sobre la estabilidad de la enzima. El empleo de sales que tienen el mismo catión, permitió examinar el efecto de los aniones (Figura IV.A.7.). El citrato, con tres cargas negativas y mayor tamaño tuvo un efecto estabilizante similar, e incluso algo mejor, que los iones cloruros que tienen el tamaño adecuado para insertarse en el sitio de unión de los aniones que consolidan

la estructura de la enzima. Resultados similares observaron Lecker y Khan, (1998) empleando concentraciones moderadas de sales de citrato para estabilizar en solución la estructura de la enzima  $\alpha$ -amilasa de origen microbiano.

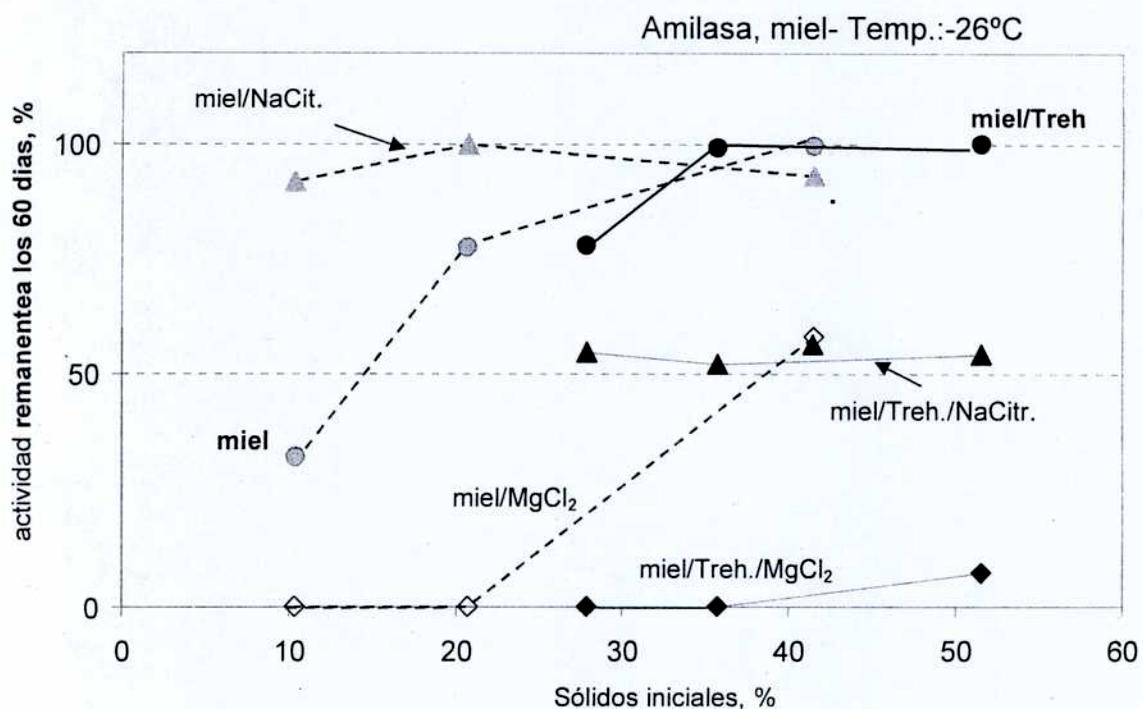
Luego se analizó el efecto del agregado de las distintas sales sobre la estabilidad de la enzima en el sistema miel/trehalosa (12.5%miel/Treh.) para evaluar el efecto de una posible interacción de los iones con la trehalosa. En la Figura IV.A.8 se comparó la actividad remanente de la enzima amilasa luego de 60 días de almacenamiento a -26°C en los sistemas con 12.5% de miel y los mismos sistemas de miel conteniendo trehalosa/sales (R=5).



**Figura IV.A.8.** Actividad remanente de la enzima amilasa en el sistema de miel conteniendo trehalosa/sal (R=5) (12,5% miel/Treh.) luego de 60 días a -26°C. Sales: MgCl<sub>2</sub>, NaCl, Ca<sub>2</sub>Cl y Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, (NaCit.) concentración 0,1M en todos los casos.

Se puede ver que cuando la trehalosa estuvo presente, el agregado de las sales al sistema tuvo un efecto negativo sobre la protección de la enzima con respecto a la observada en las muestras con trehalosa sin sales (Figura IV.A.7). En presencia de citrato de sodio este efecto fue menor. Nuevamente se observó el efecto negativo del cloruro de magnesio que inactivó completamente la enzima.

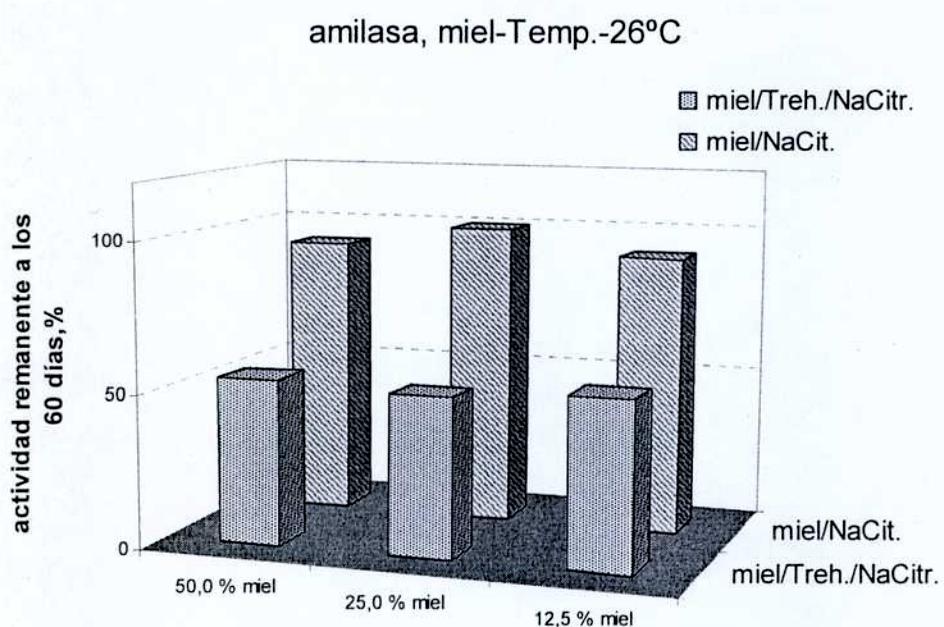
Para lograr una mayor comprensión del efecto de la presencia de estas sales y la eficiencia crioprotectora de los sistemas, se analizó la influencia de las sales que estabilizaron/desestabilizaron mayoritariamente al sistema sobre la estabilidad de la enzima amilasa en las matrices con distinta concentración de sólidos iniciales (ver Tabla III.1). La Figura IV.A.9 muestra la actividad remanente de amilasa luego de 60 días de almacenamiento a -26 °C en los sistemas de miel sin sal (miel) y con el agregado de citrato de sodio y cloruro de magnesio (miel/sal: línea discontinua) y miel modificados con trehalosa sin sal (miel/Treh.) y con el agregado de citrato de sodio y cloruro de magnesio (miel/Treh./sal: línea continua) en función de la cantidad de sólidos iniciales.



**Figura IV.A.9.** Actividad remanente de la enzima amilasa en los sistemas miel/sales en presencia/ausencia de trehalosa en función de la concentración de sólidos luego de 60 días de almacenamiento a -26°C. Sistemas miel/sal:  $\diamond$   $MgCl_2$  y  $\Delta$   $Na_3C_6H_5O_7$ , (NaCit.) Sistemas miel-Trhe/ sal( $R=5$ ):  $\blacklozenge$   $MgCl_2$  y  $\blacktriangle$   $Na_3C_6H_5O_7$ , (NaCit.) Sistemas sin sal:  $\circ$  miel sin sal y  $\bullet$  miel/trehalosa sin sal

Se observó que la presencia de citrato de sodio o cloruro de magnesio afectó negativamente la estabilidad de la enzima en todas las matrices de miel que fueron congeladas con trehalosa. En los sistemas de miel/Treh/ $MgCl_2$  la estabilidad fue buena durante los primeros días de ensayo (dato no mostrado) pero luego de 60 días de almacenamiento se observó una pérdida total de la actividad con respecto al sistema de miel original. En las soluciones de miel sola la adición de citrato de sodio mejoró la estabilidad de amilasa principalmente en los sistemas más diluidos.

En la Figura IV.A.10 se compararon los valores de actividad remanente de amilasa en ambos sistemas (miel pura y modificada con trehalosa) con distinto contenido de miel, en presencia de citrato de sodio.



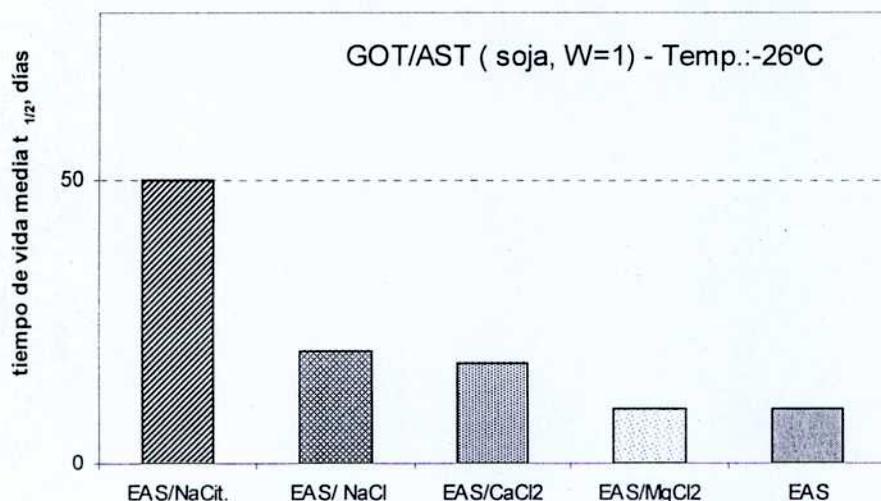
**Figura IV.A.10.** Actividad remanente de la enzima amilasa en los sistemas de miel/NaCit. y miel/Treh./NaCit. luego de 60 días de almacenamiento a -26°C.

Según se pudo observar la presencia de citrato de sodio mantuvo la actividad enzimática en niveles constantes en ambos sistemas, independientemente de la dilución de los mismos. Este efecto dependería exclusivamente de la cantidad de sal presente en la matriz de azúcar y se observó nuevamente el efecto negativo de la adición de la sal sobre la protección de la trehalosa en todos los sistemas. Al respecto se sabe que las sales pueden interactuar con los componentes del medio modificando las interacciones hidrofílicas/hidrofóbicas establecidas entre las moléculas (Walstra, 2003). En general, la

efectividad de azúcares o sales para preservar materiales biológicos ha sido relacionada con el efecto que estos tienen sobre la estructura normal del agua (basada en una estructura tetraédrica unida por enlaces hidrógeno) y sobre la cantidad de agua congelada (Patist y Zoerb, 2005). En particular la trehalosa y el ión citrato (el catión Na que forma la sal tiene un efecto neutral) influyen de modo diferente. El ión citrato es un agente cosmotrópico, que refuerza la red estructural de agua que lo rodea y aumenta la cantidad de enlaces hidrógeno entre las moléculas. Mientras que la adición de trehalosa distorsiona la configuración tetraédrica (efecto caotrópico) y disminuye la cantidad de agua congelada. Por lo tanto mientras la trehalosa altera la estructura del agua, el ión citrato la refuerza. Esta situación tendría importancia en dos factores que afectan la estabilidad de los sistemas: en el agua disponible que modifica la estructura y propiedades funcionales de las macromoléculas en las matrices concentradas por congelación y sobre la cantidad de agua congelada.

#### IV. A.3.2. Aspartato amino transferasa (GOT/AST) (soja)

En primer término se analizó el efecto específico de las sales sobre la estabilidad de la enzima aspartato amino transferasa (GOT/AST) del extracto acuoso de soja congelado en ausencia de trehalosa. La Figura IV.A.11 muestra los valores de tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), expresados en días, obtenidos para la enzima GOT/AST en el sistema acuoso ( $W=1$ ) y en el sistema acuoso en presencia de sales.

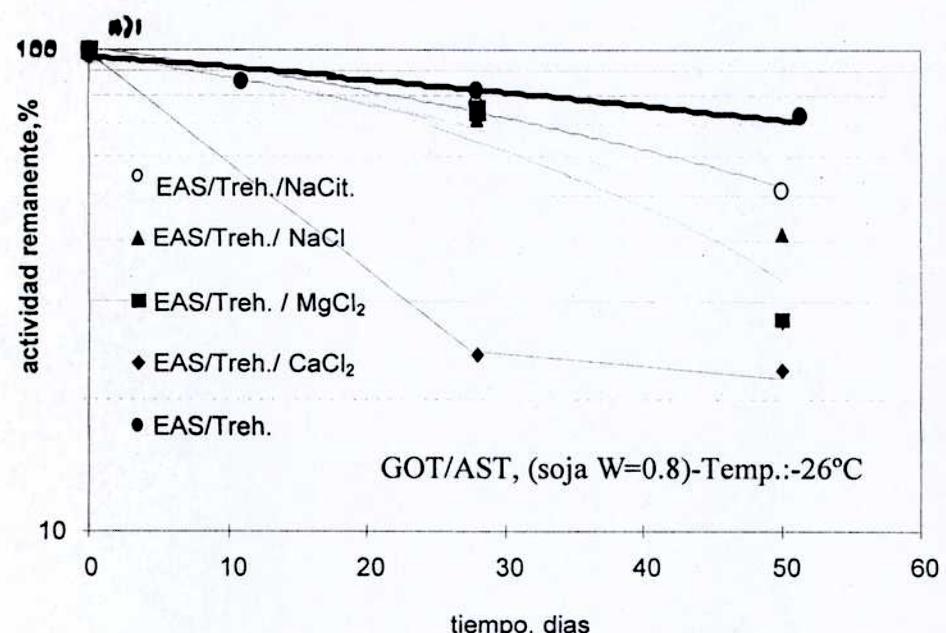


**Figura IV.A.11.** Valores de tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) a -26°C de la enzima GOT/AST presente en la fracción soluble de semilla de soja conservada en el extracto acuoso (EAS) en presencia/ausencia de distintas sales. Concentración EAS  $W=1$ , concentración de sal 0.1 M en todos los casos.

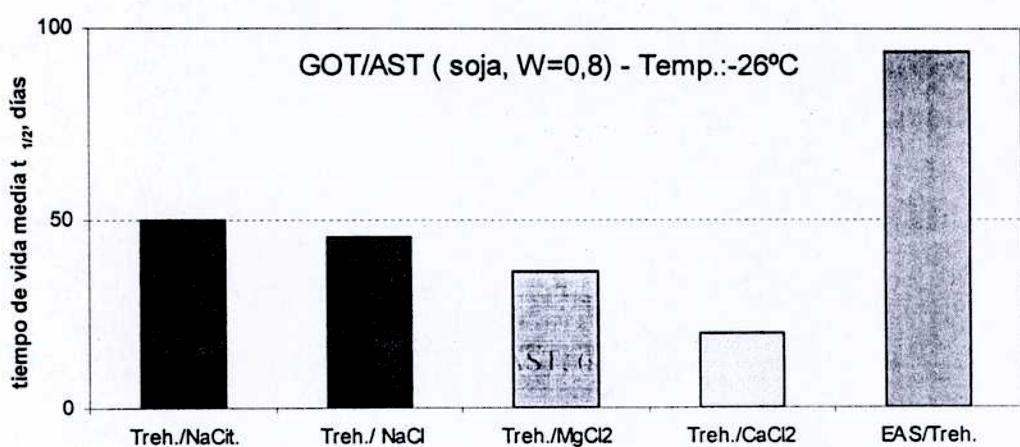
En este ensayo se observó que el agregado de las sales al EAS mejoró la estabilidad de GOT/AST al congelado, la excepción fue el cloruro de magnesio que no produjo

cambios sobre la estabilidad de la enzima (el valor de  $t_{1/2}$  fue aproximadamente de 10 días, similar al obtenido para el EAS solo). Si bien los cloruros de sodio y calcio duplicaron el  $t_{1/2}$  respecto al valor obtenido para el sistema sin sales, el efecto más notorio se evidenció en presencia de citrato de sodio. Los sistemas conteniendo el mismo catión, como EAS/NaCit y EAS/NaCl, permitieron evaluar el efecto del anión. El citrato mejoró la estabilidad de la enzima respecto a la observada en el extracto acuoso sin el agregado de sales, aumentando el  $t_{1/2}$  a 50 días.

En segundo término se analizó la influencia de las posibles interacciones azúcar/sal sobre la protección de la enzima en las matrices que contenían el disacárido trehalosa. La Figura IV.A.12 muestra: a) la actividad remanente de GOT/AST del extracto de soja en matrices ( $W=0,8$ ) conteniendo trehalosa sin sal y trehalosa con el agregado de sales almacenados a  $-26^{\circ}\text{C}$  en función del tiempo y b) los  $t_{1/2}$  calculados para cada uno de los sistemas.



b):



**Figura IV.A.12.a).** Actividad remanente de la enzima GOT/AST en la fracción soluble del extracto acuoso de semilla de soja en presencia de trehalosa (EAS/Treh.) y trehalosa con el agregado de distintas sales (R=5) en función del tiempo de almacenamiento a -26°C.. **b).** Tiempos de vida media calculados para los distintos sistemas. Concentración EAS W= 0.8, concentración de sal 0.1M en todos los casos.

Al igual que lo observado para amilasa (Figura IV.A.8) se puede ver que en presencia de trehalosa, el agregado de cualquiera de las sales tuvo un efecto negativo sobre la estabilidad de la enzima *GOT/AST* con respecto a la observada en las muestras conteniendo el azúcar sin sales. Las formulaciones que contenían los cationes calcio y magnesio fueron las más afectadas. La pérdida de actividad enzimática mostró una dependencia logarítmica en función del tiempo para las mezclas que contenían trehalosa y cationes sodio o magnesio, la muestra adicionada con calcio tuvo un comportamiento diferente (Figura IV.A.12 a). Para una mejor visualización de los resultados, en la Figura IV.A.12 b, se compararon los valores de tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) a -26°C calculados a partir de los datos cinéticos de la Figura IV.A.12 a) en los sistemas analizados.

#### **IV. A.3.3. Conclusiones de la sección**

En los sistemas ensayados conteniendo trehalosa la presencia de sales no mejoró la estabilidad al congelado de las enzimas amilasa (miel) y *GOT/AST* (soja) y todas las sales tuvieron un efecto negativo sobre la protección del azúcar. Resultados similares han encontrado otros autores que estudiaron la influencia de la asociación azúcar/sal sobre la estabilidad de biomoléculas durante el congelamiento. Por ejemplo, la presencia de borato de sodio fue perjudicial en la estabilización de la enzima lactatodehidrogenasa (LDH) en una matriz con trehalosa (Miller y col., 1998). MacDonald y col (1996) observaron también que la adición de sulfato de zinc desestabilizó al sistema crioprotector de sacarosa, y disminuyó la estabilidad de la enzima adenosintrifosfato hidrolasa (Ca-ATPasa, miosina de pescado). Sin embargo, en sistemas de trehalosa combinados con  $MgCl_2$ , la estabilidad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa (lactasa) a -26°C fue mayor que con trehalosa sola (Mazzobre y

Buera, 2001). Los resultados disímiles encontrados en bibliografía indicarían que el tipo de efecto (sinérgico o antagónico) de la adición de sales dependería en gran medida de la enzima, además de la concentración y tipo de iones y de azúcares presentes.

A partir de los resultados analizados en la sección IV.A.3. puede proponerse el siguiente orden de estabilización de la actividad de la enzima GOT/AST (soja) y amilasa (miel) congeladas a -26°C en los sistemas con trehalosa.

### Adición de aniones:

(Orden de estabilización)  $\text{ion citrato} >> \text{Cl}^-$

### Adición de cationes:

(Orden de estabilización)  $\text{Na}^+ > \text{Ca}^{++} > \text{Mg}^{++}$

Se sabe que el efecto de la adición de iones sobre la estabilización de biomoléculas en sistemas concentrados depende de un balance de interacciones entre las sales y las proteínas, y entre las sales y los azúcares presentes (Arakawa y col., 1990). Por otro lado, en estos sistemas diluidos, como se ha discutido anteriormente, son importantes los efectos que los iones tienen sobre el agua y la formación de cristales de hielo.

Por lo tanto se analizó también el efecto de los electrolitos sobre las propiedades físicas de las matrices durante el congelamiento.

#### **IV. A.4. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS SISTEMAS SOBRESTURADOS POR CONGELACIÓN EN RELACIÓN CON SU CAPACIDAD PROTECTORA.**

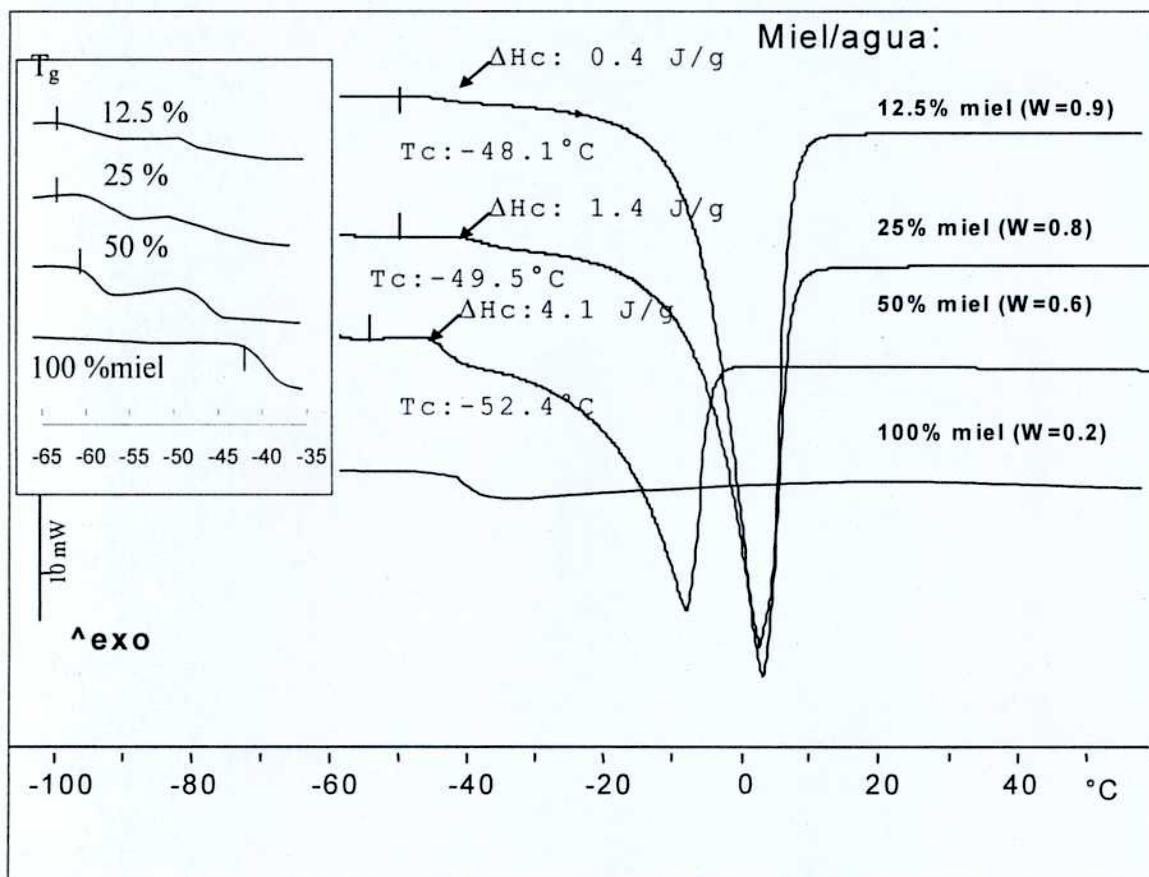
En las secciones anteriores (IV.A.1, 2 y 3) los resultados obtenidos mostraron que existe una relación entre la estabilidad de las enzimas estudiadas y la composición de los sistemas. Distintos autores asociaron la estabilidad enzimática en sistemas congelados con el estado físico (amorfo/cristalino) de los componentes de los sistemas y encontraron que la formación de hielo podría afectar negativamente el efecto protector de la matriz (Sallinen y Roos, 1988; Miller y col., 1998; Mazzobre y col, 2001). Recientemente se ha informado que el contacto de los cristales de hielo con las proteínas provoca la desnaturalización y es la causa de la pérdida de la funcionalidad de las biomoléculas durante el congelamiento (Gabellieri y Strambini, 2006).

En esta sección se analizó el efecto de la cantidad de hielo formado (dependiente del tiempo, velocidad de congelación y composición) en los sistemas crióconcentrados durante el almacenamiento a -26°C sobre la capacidad protectora de las distintas matrices (puras, modificadas con trehalosa, combinadas trehalosa/sal). Para obtener información de las propiedades termofísicas ( $T_g$ , cristalización y fusión de hielo) de los distintos sistemas, se empleó calorimetría diferencial de barrido (DSC).

*IV.A.4.1. Sistemas conteniendo miel. Efecto del agregado de agua y trehalosa en el comportamiento térmico*

El estudio de las propiedades fisicoquímicas y estructurales por DSC es una técnica empleada para detectar adulteraciones con jarabes en muestras de miel (Kantor y col., 1999; Cordella y col., 2002). En el presente trabajo, resultó interesante entonces comparar los termogramas obtenidos para los sistemas de miel con los obtenidos para los sistemas modificados con el agregado de trehalosa (ver Tabla III.1.). Los sistemas fueron congelados 30 días a  $-26^{\circ}\text{C}$  previo a la medición por DSC. Se sabe que la formación de hielo en el sistema se favorece congelando lentamente, y se hace máxima a temperaturas entre la temperatura de fusión del eutéctico ( $T_E$ ) y  $T_g'$ . Entre  $T_E$  y  $T_g'$  el sistema es altamente viscoso, la movilidad molecular está muy reducida y hay limitaciones difusionales para que ocurra la cristalización de agua (ver Figura I.7.) (Fennema, 2000). Como las muestras tenían un alto contenido de agua ( $W = 0,9$  a  $0,5$ ), el enfriamiento lento a  $-26^{\circ}\text{C}$  (templado) favoreció la formación de hielo en la solución sobreenfriada.

En primer término se analizaron por DSC los sistemas de miel pura. En la Figura IV.A.13 se muestran los termogramas obtenidos por DSC para los sistemas de miel que fueron preparados con distinto contenido de agua inicial ( $W$ ). En el gráfico inserto de la Figura IV.A.13 se realizó una ampliación para poder visualizar mejor la temperatura de transición vítrea de los sistemas estudiados.



**Figura IV.A.13.** Termogramas obtenidos por DSC para mezclas miel-agua en distintas proporciones iniciales que fueron congelados 30 días a -26°C previo a la determinación por DSC. En el grafico inserto se realizó una ampliación para poder visualizar mejor la  $T_g$  de los sistemas. Para miel sin diluir (100% de miel) el dato se obtuvo de Cordella y col., 2002).

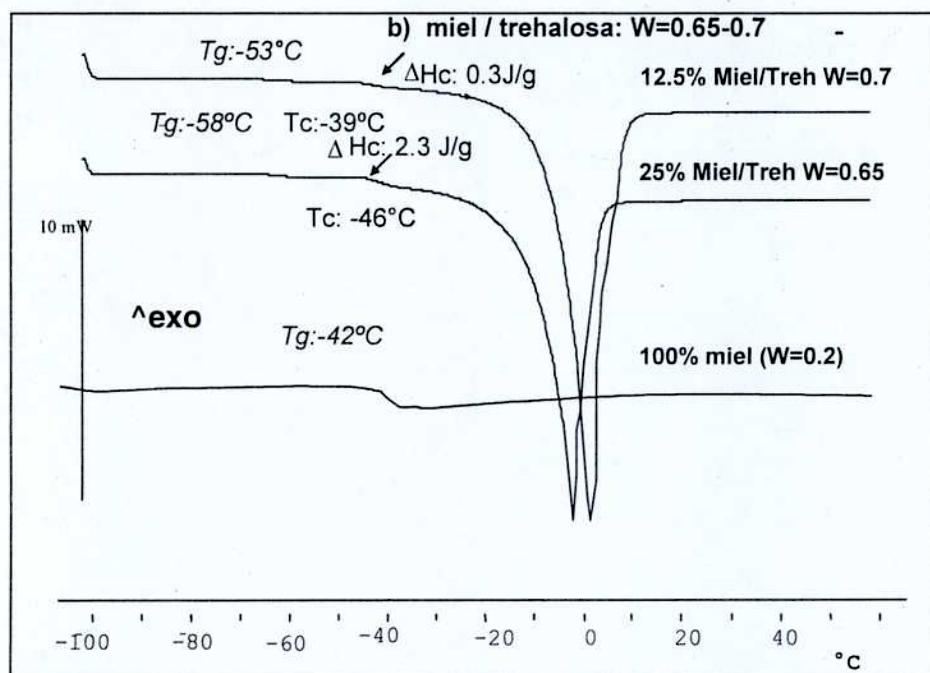
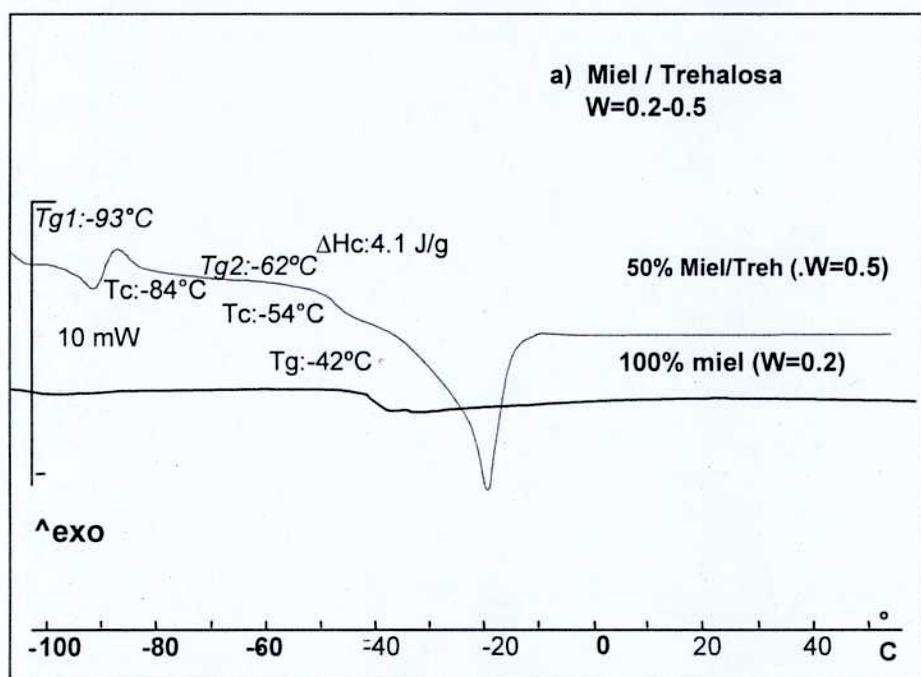
Los cambios en la línea de base representan las temperaturas de transición vítreo ( $T_g$ ) de los sistemas sobreenfriados y los picos exotérmicos y endotérmicos corresponden a la cristalización o fusión de agua respectivamente. Las temperaturas de cristalización ( $T_c$ ) y de fusión de agua ( $T_m$ ) corresponden a las temperaturas de inicio de la transición. Los termogramas obtenidos en la Figura IV.A.13 permitieron determinar los valores de  $T_g$ , la temperatura de transición vítreo de la matriz con máxima crioconcentración ( $T_g'$ ) y las entalpías de cristalización del agua ( $\Delta H_c$ ) y de fusión del hielo ( $\Delta H_m$ ) (Tabla IV.A.3).

En los termogramas se puede ver que la temperatura de fusión fue menor al aumentar la proporción de miel y en las muestras más diluidas fue cercana a 0°C. Todos los sistemas presentaron un pico exotérmico pequeño ( $T_c$ ) que estaría indicando que no toda el agua cristalizó en las condiciones de tiempo/temperatura empleadas durante el almacenamiento previo y por lo tanto una pequeña proporción de agua cristalizó durante el calentamiento dinámico en el DSC. En el termograma de miel sin diluir (100% miel,  $W= 0,2$ ) no se observó cristalización ni fusión de agua, ya que al ser un sistema muy concentrado el agua interactúa fuertemente con la matriz amorfá de azúcares y no tiene la movilidad suficiente para cristalizar (Cordella y col., 2002).

Estos autores observaron que la temperatura de transición vítreo de la miel pura fue de -46°C y observaron otra transición a menor temperatura (-61°C). Esta estructura de doble paso ya había sido detectada tanto a través de DSC (Kantor, Z. y col., 1999) como de RMN (Rubin y col., 1990) y la transición de menor temperatura fue relacionada con las distintas formas anoméricas de la fructosa. En el presente trabajo, los valores de  $T_g$  obtenidos para los distintos sistemas fueron prácticamente constantes (-61°C a -63°C) independientemente de la concentración inicial de miel (12, 25 o 50%). Esto indicaría que durante el almacenamiento a -26°C previo a la corrida, en todas las muestras se separó gran parte del agua en forma de hielo y en consecuencia se obtuvieron matrices crioconcentradas con igual proporción de sólidos y agua sin congelar (formando parte de la matriz amorfá) y por lo tanto valores similares de  $T_g$ . Los valores de  $T_g$  publicados para miel pura ( $T_g= -46.5^{\circ}\text{C}$ ) son mayores que los obtenidos en este trabajo para los sistemas diluidos de miel, ya que como se discutió anteriormente, el templado a -26°C no fue suficiente para alcanzar la matriz máximamente concentrada y una pequeña proporción de agua se encontraba plastificando la matriz vítreo. Rubin y col. (1990) y Kantor y col. (1999) realizaron

mediciones de  $T_g$  de mieles diluidas utilizando un enfriamiento rápido, sin almacenamiento previo, que permitió la vitrificación de la muestra sin formación de hielo; realizaron las mediciones en sistemas con diferente contenido de agua y observaron una disminución significativa de  $T_g$ , desde -48.2°C, -62.6°C, hasta -78.8°C para muestras con un contenido de miel de 98, 90 y 80% p/p respectivamente. Cabe resaltar que para determinar la curva de  $T_g$  en sistemas con alto contenido acuoso es importante establecer las condiciones experimentales (temperatura, velocidad de enfriamiento/calentamiento) y evaluar correctamente las transiciones obtenidas en el termograma (enthalpía de cristalización de agua) para poder calcular el contenido de agua de la matriz amorfa asociado al valor de  $T_g$  obtenido.

En segundo término se analizaron por DSC los sistemas de miel modificados por el agregado de trehalosa. En la Figura IV.A.14 (a y b) se compararon los termogramas obtenidos por DSC para los sistemas de miel/trehalosa con distinto contenido de agua inicial a): 50% de miel/Treh.; b): 25-12.5% de miel/Treh. almacenados 30 días a -26°C con el obtenido en bibliografía para miel pura.



**Figura IV.A.14.** Termogramas obtenidos por DSC para sistemas mezcla miel/trehalosa con distinto contenido de agua inicial ( $W$ ) que fueron almacenados 30 días a  $-26^{\circ}\text{C}$  previo a la determinación por DSC. a)  $W = 0.5$ , b)  $W = 0.7$  y  $W = 0.65$ . Para miel sin diluir (100% de miel) el dato se obtuvo de Cordella y col., (2002).

En presencia de trehalosa se observaron algunas variaciones en los valores de  $T_g$  y en el  $\Delta C_p$  correspondiente, respecto a los valores determinados para miel sola. En el sistema mezcla miel-trehalosa más concentrado ( $W = 0,5$ ) se observó la presencia de dos eventos térmicos correspondientes a transiciones vítreas, uno a  $-95^\circ\text{C}$  ( $T_{g1}$ ) y otro a  $-61^\circ\text{C}$  ( $T_{g2}$ ) (Figura IV.A.14 a). Esto puede ocurrir en sistemas con alta concentración de solutos, cercanas a la concentración de saturación, porque el agua se encuentra inicialmente inmovilizada en un medio de alta viscosidad. Durante el calentamiento dinámico el material sufre la transición vítreo ( $-95^\circ\text{C}$ ), el agua de la fase amorfa se moviliza y puede cristalizar, la solución remanente se concentra y sufre otra transición a un valor de  $T_g$  mayor ( $-61^\circ\text{C}$ ). Esa situación no se vió en los sistemas modificados que tenían menor proporción de miel (12,5% y 25% de miel) y la presencia de trehalosa modificó la  $T_g$  de los mismos con respecto a las preparaciones basadas solo en miel. En los sistemas diluidos la cantidad de azúcar es pequeña para observar la segunda  $T_g$ . Los resultados se resumen en la Tabla IV.A.3, donde se muestran los valores de las transiciones térmicas obtenidas a partir de los termogramas de las Figuras IV.A.13 y IV.A.14 para los sistemas de miel y modificados miel/trehalosa respectivamente, con distinto contenido de agua.

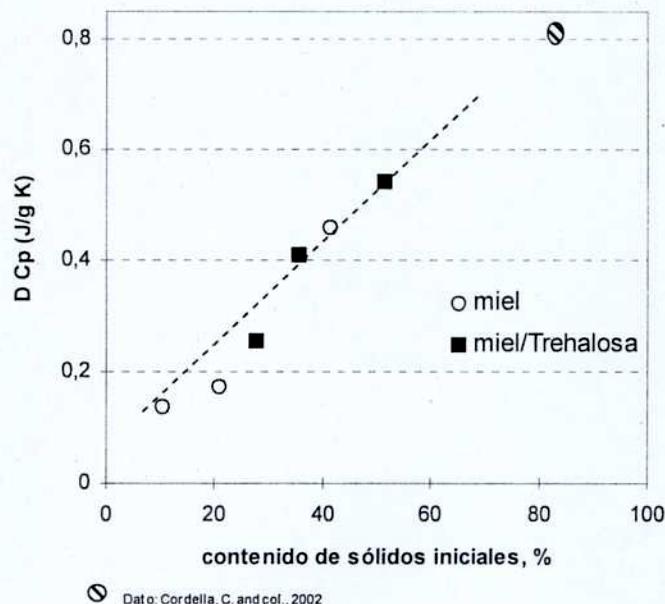
**Tabla IV.A 3.** Valores de temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), capacidad calorífica ( $\Delta Cp$ ), temperaturas de cristalización ( $T_c$ ) y fusión de hielo ( $T_m$ ) y entalpias de cristalización ( $\Delta H_c$ ) y fusión de hielo ( $\Delta H_m$ ) determinados por DSC para los sistemas miel-agua y mezclas miel-trehalosa (20%) con distinto contenido de agua inicial que fueron almacenados 60 días a -26° (los termogramas correspondientes se muestran en las Figuras IV.A.13 y IV.A.14).  $\Delta Cp$ :  $J.K^{-1}g^{-1}$ ,  $\Delta H$ :  $J/g$

muestras:	Termogramas:					
	Transición vítrea		Cristalización de agua		Fusión de hielo	
	$T_g$ (°C) onset	$\Delta Cp$	$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$
<b>100% *miel</b>	-42,5	0,8	A	A	A	A
<b>a) Miel</b>						
50.0% miel	-61,45	0,458	-44,26	4,13	-17,25	97,73
25.0% miel	-63,52	0,173	-43,37	1,41	-8,33	150,57
12.5% miel	-63,8	0,134	-43,89	0,41	-5,08	217,11
<b>b) Miel/Trehalosa</b>						
50.0% miel/Treh.	-61,62	0,530	-84	0,15	-26,41	63,35
25.0% miel/Treh.	-57,55	0,406	-40,27	2,32	-14,41	104,8
12.5% miel/Treh	-53,18	0,252	-36,26	1,2	-8	146

\*Dato: Cordella, y col., (2002). A=ausente

La variación de los parámetros térmicos y la formación de hielo en los sistemas miel-agua o combinados miel-trehalosa se analizó también en función de la concentración de sólidos iniciales. La Figura IV.A.15 muestra los valores experimentales de los cambios en el calor específico de las transiciones vítreas medidas por DSC para los sistemas de miel

y miel modificada con trehalosa en función de la cantidad de sólidos iniciales de los sistemas.

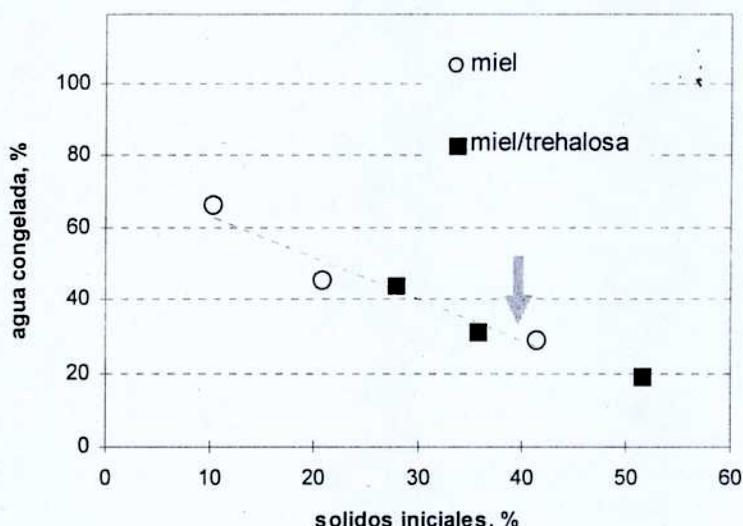


**Figura IV.A.15.** Cambios en el calor específico ( $\Delta Cp$ ) de las transiciones vítreas medidas por DSC en relación al porcentaje de sólidos iniciales de los distintos sistemas:  $\circ$  miel-agua y  $\blacksquare$  modificados (miel / trehalosa).

En el presente trabajo, los cambios observados en los valores de  $\Delta Cp$  asociados a la transición vítreo permitieron diferenciar mejor el efecto de dilución de los sistemas que la  $T_g$ , ya que el valor de  $T_g$  fue constante debido a la crioconcentración. El  $\Delta Cp$  fue dependiente de la proporción inicial de sólidos ya que en las matrices inicialmente más diluidas la cantidad de material que sufre la transición es menor. Por lo tanto el valor de  $\Delta Cp$  permitiría caracterizar sensiblemente sistemas con  $T_g$  igual o parecida como en este caso (alrededor de  $-61^{\circ}\text{C}$ ). Se encontró una relación directamente proporcional entre ambas

variables en todas las preparaciones, incluyendo el valor informado para mieles sin diluir de bibliografía.

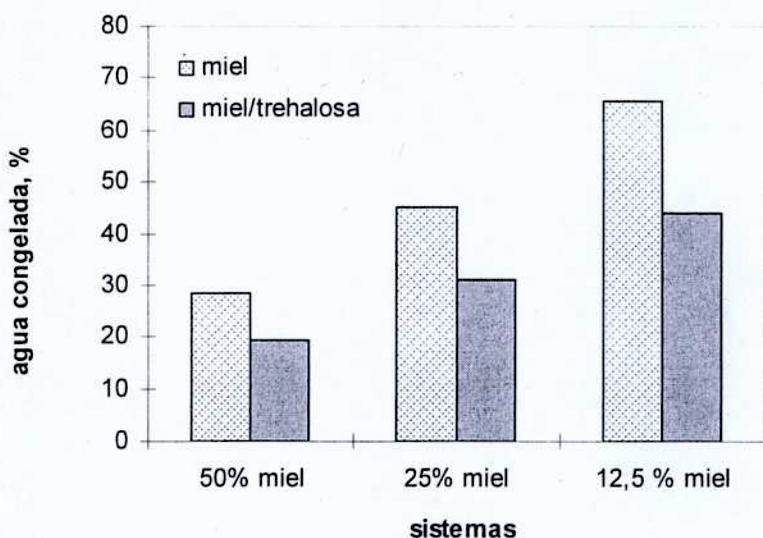
Como se discutió anteriormente la cristalización de hielo ( $T_c$ ) luego de la transición vítrea y su fusión posterior ( $T_m$ ) en ambos sistemas de miel, con o sin trehalosa, dependió de la movilidad y del contenido de agua en los sistemas. El porcentaje de agua congelada se estimó relacionando el área correspondiente a la entalpía de fusión ( $\Delta H_m$ ) y la cantidad de agua total del sistema, según se detalla en sección III. G.3. En la Figura IV.A.16 se muestra el porcentaje de agua congelada (%) en función del contenido de sólidos iniciales, luego del templado de los sistemas de miel puros o modificados con adición de trehalosa.



**Figura IV.A.16:** Porcentaje de agua congelada en los distintos sistemas de miel y modificados con trehalosa (miel Treh.) luego del templado (30 días a -26°C) en función del contenido de sólidos iniciales. La flecha indica la cantidad mínima de sólidos necesarios para mantener la estabilidad.

Se observó una relación inversamente proporcional entre la cantidad de hielo formado y la cantidad de sólidos iniciales en los sistemas. El aporte de trehalosa como azúcar

adicional al sistema de carbohidratos de miel no influyó significativamente en la evolución de este parámetro. La extrapolación de los datos experimentales de  $\Delta H_m$  hacia concentraciones mayores reveló que la formación de hielo es bastante improbable en mezclas con más de 70 % de sólidos (80% de contenido de miel en sistemas puros) en cualquier circunstancia. Otros autores encontraron resultados similares utilizando otra metodología como resonancia magnética nuclear (RMN) y concluyeron que la cristalización del agua sólo se puede observar a partir de diluciones con un contenido de miel menor de 80 % ( $W = 0.3$ ) (Rubin y col.; 1990). Es interesante destacar que el contenido mínimo de 40% de sólidos iniciales, que fue necesario para mantener la estabilidad enzimática luego de 60 días de almacenamiento a -26°C (ver Figura IV.A.6) corresponde a sistemas donde la cristalización del agua disponible fue menor del 30%. Se podría plantear entonces que la cantidad de hielo formado, el cual aumenta en los sistemas mas diluidos, afectaría negativamente la estabilidad de la enzima amilasa de miel. De acuerdo a esta hipótesis, se sabe que no sólo la movilidad de los sistemas, definida por ( $T - T_g'$ ) afecta la estabilidad de las proteínas (Slade y Levine, 1991; Kerr y col., 1993) sino que la presencia de superficies o interfaces tienen un efecto negativo importante (Privalov, 1990; Arakawa y col., 1993). Para analizar mejor este efecto se comparó la cantidad de agua congelada en los sistemas que contenían la misma cantidad de miel (o igual cantidad de enzima) pero con distinta cantidad de sólidos. La Figura IV.A.17 muestra los valores en porcentaje de agua congelada luego del templado de los sistemas que contenían las mismas cantidades de miel pero con distinta cantidad de sólidos (puro o modificada con la adición de trehalosa)



**Figura IV.A.17.** Porcentaje de agua congelada calculada por DSC en los sistemas con miel y miel modificados por el agregado de trehalosa luego del templado

Para los sistemas que contenían igual cantidad de miel (e igual cantidad de enzima) la formación de hielo fue mayor en las matrices de miel sola con respecto a la observada en las matrices de miel con trehalosa. En los sistemas que formaron mayor cantidad de hielo (miel /agua) comparados con los modificados (miel/Treh.), la estabilidad de la enzima amilasa fue menor (ver Figura IV.A.5). En este sentido, estudios recientes mostraron que la cristalización del agua tendría un rol preponderante en la desnaturización de enzimas en sistemas congelados y observaron que la interfase hielo-agua altera la estructura terciaria de las proteínas (Strambini y Gabellieri 1996; Gabellieri y Strambini, 2006). Estos autores plantean que, dada una concentración proteica, la superficie del cristal de hielo formado (que depende de las condiciones de enfriamiento) daña sólo al conjunto de proteínas en contacto directo con el cristal y el resto mantendría su funcionalidad. Por otro lado, la molécula de trehalosa tiene un efecto caotrópico sobre la estructura espacial de la molécula de agua, distorsiona su configuración y reduce su cristalización (Patist y Zoerb, 2005). Por

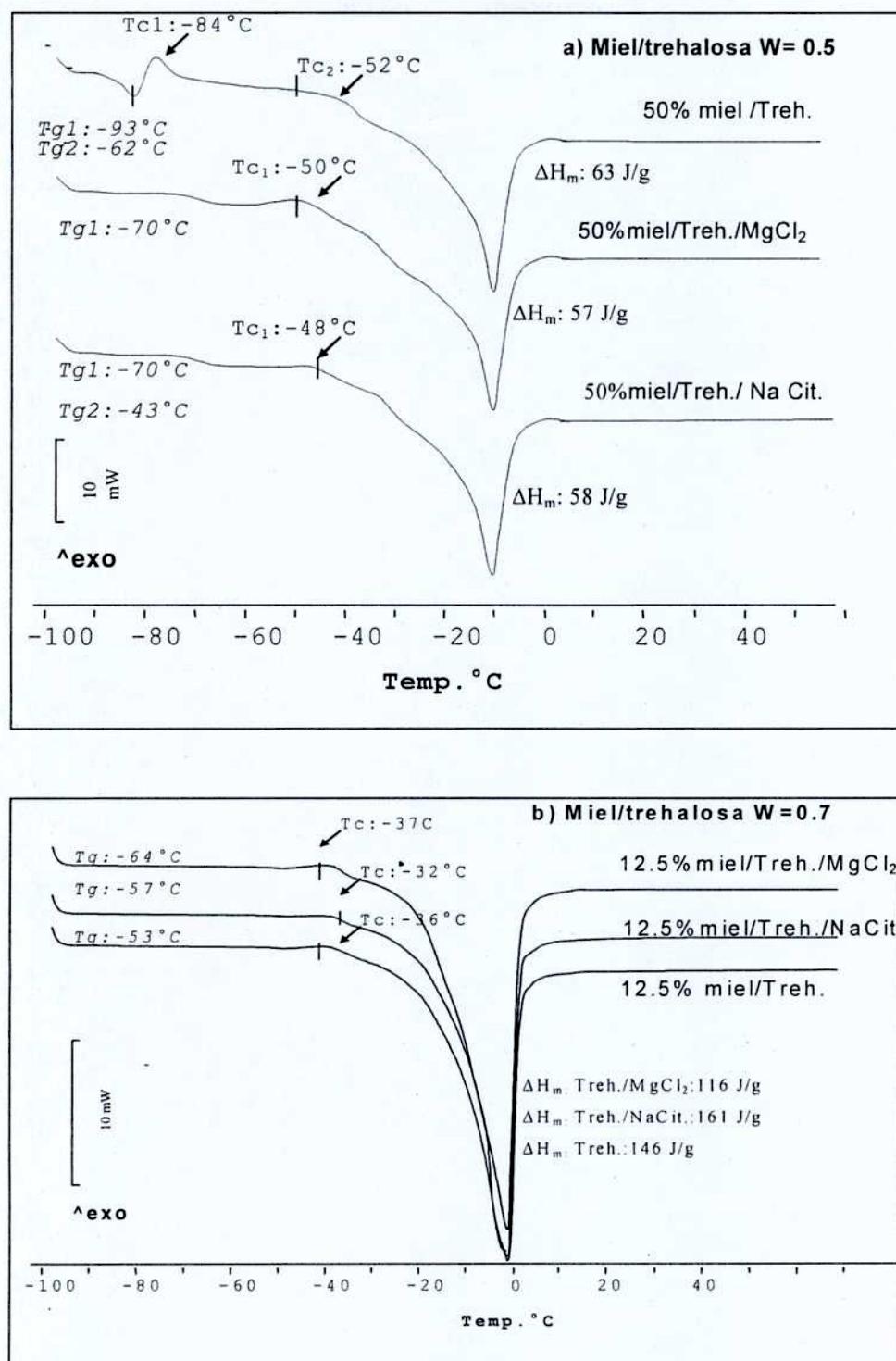
lo tanto, la presencia de trehalosa protegería la funcionalidad biológica no sólo por su habilidad de establecer enlaces de hidrógeno con las biomoléculas, sino también al reducir la cantidad de hielo formado y este sería un factor importante a considerar como responsable de la estabilización de la enzima amilasa en los sistemas congelados más diluidos (12.5 y 25% de miel). Sin embargo se requerirían más estudios para lograr una mayor comprensión del rol de la interfase hielo-agua como vector de stress en estos sistemas (Carpenter y col., 1986).

El mismo efecto que se logra disminuyendo la cantidad de cristales de hielo se obtendría aumentando la cantidad de proteína. Superando el nivel de concentración proteica que puede estar en contacto con la interfase cristalina, el exceso de proteína ya no se vería afectada por la superficie del cristal de hielo y sería menor en proporción el porcentaje de proteína dañada. Esta hipótesis explicaría el efecto “auto-protector” observado al aumentar la concentración enzimática en sistemas congelados por diferentes autores (Tamiya y col. 1985; Izutsu y col., 1995; Miller y col., 1998) y explicaría también los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo donde se observó que las muestras que tenían mayor concentración de enzima (50% de miel) fueron las menos afectadas por las condiciones extremas del almacenamiento (Figura IV.A.5).

***IV.A.4.2 . Efecto del agregado de sales en los sistemas de miel y miel/trehalosa: Transición vítrea y cristalización de hielo.***

Los termogramas dinámicos obtenidos por DSC permitieron analizar el efecto de las sales sobre los parámetros tales como  $T_g$  y cristalización/fusión de agua en los sistemas estudiados. Se observó que la adición de sales a la matriz de trehalosa disminuyó el efecto crioprotector de la matriz (Figura IV.A.8) y las sales que estabilizaron/desestabilizaron principalmente a los sistemas de miel puros y modificados fueron el citrato de sodio y el cloruro de magnesio (Figura IV.A. 9 y 10). En la Figura IV.A.18 a y b se muestran los termogramas obtenidos para las muestras de miel/trehalosa con distinto contenido de agua (W) adicionadas con  $MgCl_2$  y citrato de sodio (0.1 M) que fueron congeladas 30 días a –26°C previo a la determinación por DSC, a) W =0.5 y b) W=0.7).

En los sistemas más concentrados (W= 0,5) (Figura IV.A.18 a) hay impedimentos cinéticos para que cristalice el agua durante el almacenamiento y el termograma es más complicado de interpretar. Se puede ver más de una  $T_g$  debido a múltiples recristalizaciones del agua en el calentamiento dinámico. La presencia de las sales diminuyó la entalpía de fusión, lo cual indica que en estos sistemas se formó menos hielo durante el almacenamiento que en el sistema sin el agregado de sales.

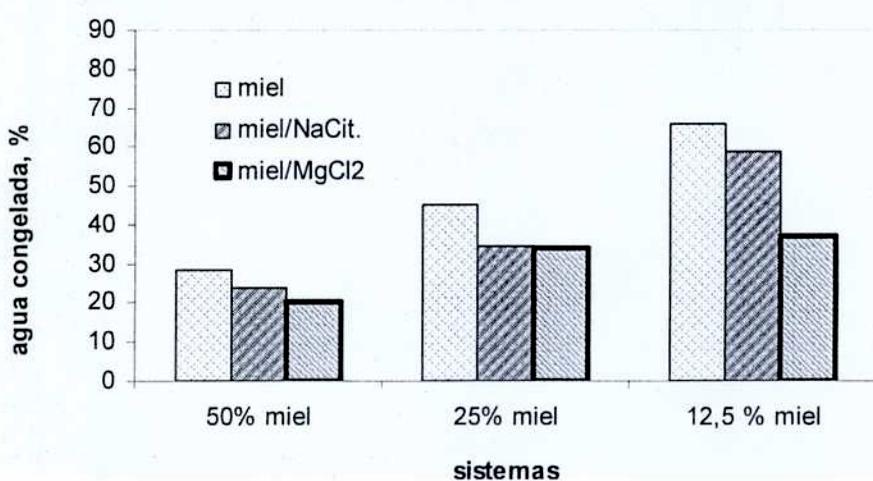


**Figura IV.A.18.** Termogramas obtenidos por DSC para sistemas de miel modificados con el agregado de trehalosa (miel/Treh) y sal (miel/Treh/sal) con distinto contenido de agua (W): a) W = 0.5 (50% de miel/Treh.), b) W = 0.7 (12.5% de miel/Treh.). Sales: Citrato de sodio y Cloruro de magnesio 0.1M. Las transiciones de baja temperatura no se aprecian en la escala del grafico pero si al ampliar la zona.

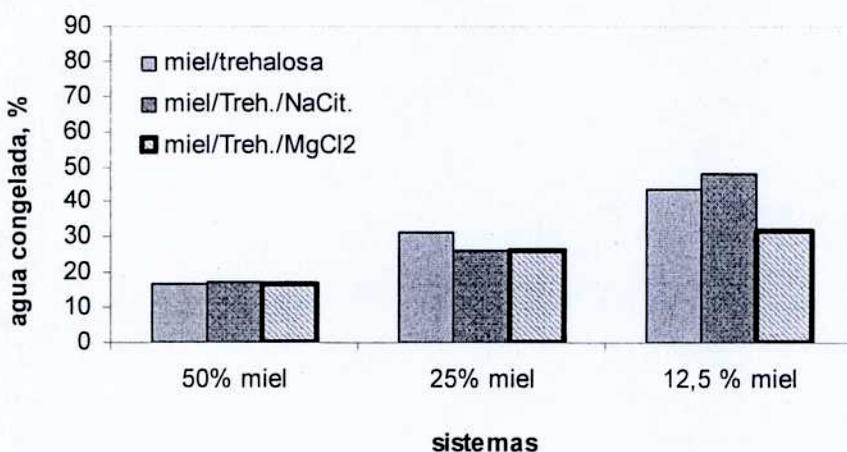
En los sistemas más diluidos (Figura IV.A.18 b) los efectos fueron los esperados de acuerdo a las propiedades coligativas. En estos sistemas no hay prácticamente impedimentos cinéticos y el agua cristaliza casi completamente durante el almacenamiento a -26°C (previo a la determinación por DSC) lo cual puede verse en el termograma por los mayores valores de  $\Delta H_m$  obtenidos para los sistemas  $W= 0.7$  en relación a los observados en sistemas  $W=0.5$ . La  $T_g$  se aproxima a los valores de  $T_g'$  (Cordella y col., 2002). También se observó que al diluir los sistemas aumentó la temperatura a la cual se produce la cristalización de parte del agua ( $T_c$ ) que no había cristalizado previamente (Figura IV.A.18 a y b).

La Figura IV.A.19 muestra el efecto de la presencia de citrato de sodio y cloruro de magnesio sobre la formación de hielo en los sistemas de miel (a) y miel/trehalosa (b) que fueron congelados 60 días a -26°C.

#### a) miel- miel/sal



## b) miel/trehalosa – miel/trehalosa/sal



**Figura IV.A.19.** Efecto del agregado de sales sobre el porcentaje de agua congelada en los distintos sistemas: a) miel y b) miel modificado por el agregado de trehalosa en presencia/ausencia de citrato de sodio y cloruro de magnesio 0.1M.

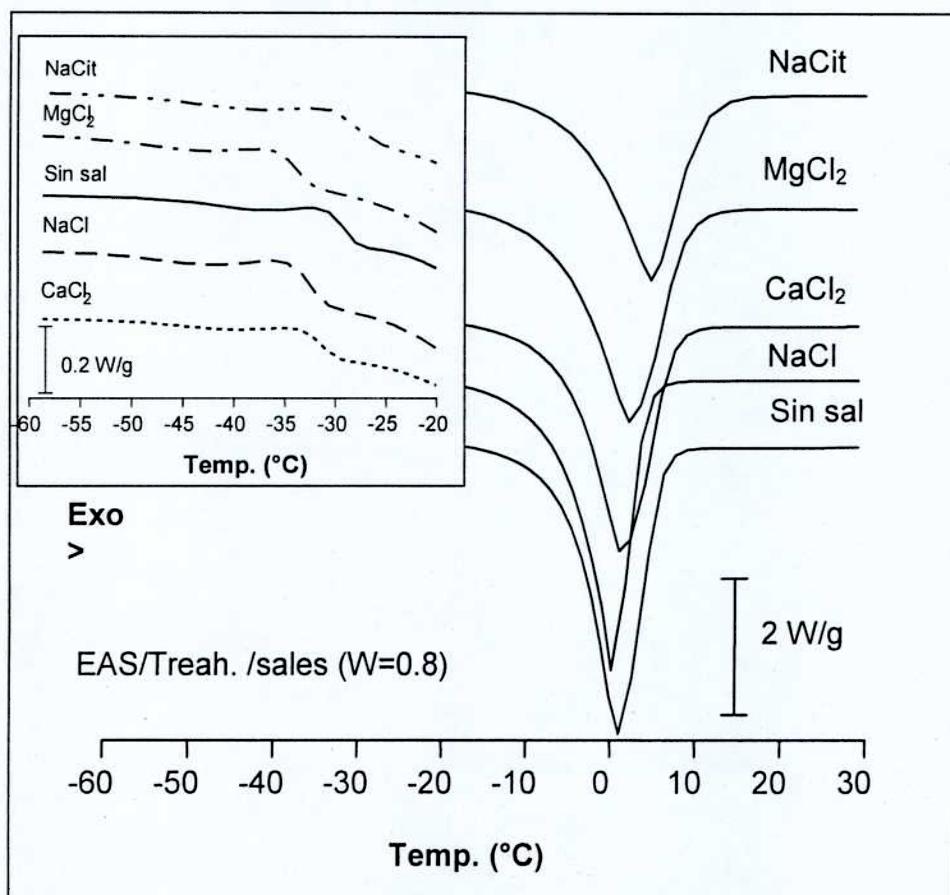
La incorporación de sales disminuyó la cantidad de hielo formado durante el enfriamiento tanto en los sistemas de miel como en los modificados por el agregado de trehalosa. En todos los casos la cantidad de agua congelada aumentó con la dilución del sistema, excepto para las muestras que contenían citrato de sodio (Figura IV.A.19 a y b). Se sabe que los iones imparten su carácter particular al entorno molecular y aunque el efecto de los aniones y cationes pueden ser aditivos, los aniones son dominantes. Los iones cloruros tienen un efecto neto demoledor de estructura (caotrópico), perturban las interacciones puente de hidrógeno del agua disminuyendo la formación de cristales de hielo. El ión citrato pertenece a la serie de iones cosmotrópicos que ejercen el efecto opuesto, son formadores de estructuras (Patist y Zoerb, 2005). Estos comportamientos se observan en la Figura IV.A.18 a y b donde la formación de hielo fue menor en presencia de cloruro de magnesio en ambos sistemas de miel (puros y modificados con trehalosa). Como

se ha discutido anteriormente el hielo puede ser considerado un vector de estrés, sin embargo la estabilidad enzimática fue menor en las matrices adicionadas con MgCl<sub>2</sub> (en las cuales la cristalización del agua fue menor) (Figura IV.A.7 y 8) debido a un efecto inhibidor específico de esta sal sobre la enzima amilasa de miel (Babacan y Rand., 2007). Por otro lado, debe considerarse que en sistemas multicomponentes como los estudiados, las sales pueden interactuar tanto con las enzimas como con los azúcares modificando las interacciones hidrofílicas/hidrofóbicas entre las moléculas (Walstra, 2003). Esta observación podría explicar el efecto negativo que tuvo la adición de sales a las matrices con trehalosa sobre la estabilidad de la enzima amilasa; los iones modificarían la flexibilidad de la molécula de trehalosa y disminuiría su capacidad protectora. Por lo tanto la cristalización del agua como vector del daño producido durante el congelamiento no sería el único factor a considerar cuando las sales están presentes en los sistemas de miel.

#### **IV. A.4.3. Efecto del agregado de sales en el sistema enzimático de soja con trehalosa sobresaturado por congelación: Transición vítrea y cristalización de hielo.**

Se sabe que el efecto de las sales sobre la temperatura de transición vítrea y la cristalización de agua en sistemas binarios de trehalosa sobresaturados por congelación depende de condiciones cinéticas. En sistemas con limitaciones difusionales importantes ( $W$  de 0 a 0.1), se observó que la adición de sales no afectaba la curva de temperatura de transición vítrea en función del contenido acuoso. Pero en sistemas en los que la formación de hielo está facilitada ( $W$  de 0.6 a 0.8), se observó que la concentración salina en sistemas conteniendo trehalosa influía sobre la cristalización del agua, y variaba el valor de  $T_g$  en sistemas con el mismo contenido de agua inicial (Her y col.; 1995; Miller y col., 1998 y Mazzobre y col., 2001).

En esta sección se analizó el efecto de las sales sobre la cristalización/fusión de hielo en los sistemas diluidos que contenían el extracto acuoso de soja (E.A.S.) en presencia de trehalosa. El contenido de agua inicial ( $W = 0.8$ ) y la relación molar trehalosa /sal ( $R=5$ ) fue constante para todos los casos. La Figura IV.A.20 muestra los termogramas de las soluciones de soja con trehalosa/sales que fueron almacenadas 60 días a  $-26^{\circ}\text{C}$ . En el cuadro superior de la Figura IV.A.20 se realizó una ampliación para poder visualizar mejor la temperatura de transición vítrea y la cristalización de los sistemas.



**Figura IV.A.20.** Termogramas dinámicos obtenidos por DSC para los extractos acuosos de soja que contenían trehalosa ( $W=0.8$ ) o trehalosa en presencia de sales ( $R=5$ ). Sales:  $Na_3C_6H_5O_7$ ,  $NaCl$ ,  $CaCl_2$  y  $MgCl_2$ . Los sistemas fueron almacenados a  $-26^{\circ}C$  durante 60 días antes de la medición.

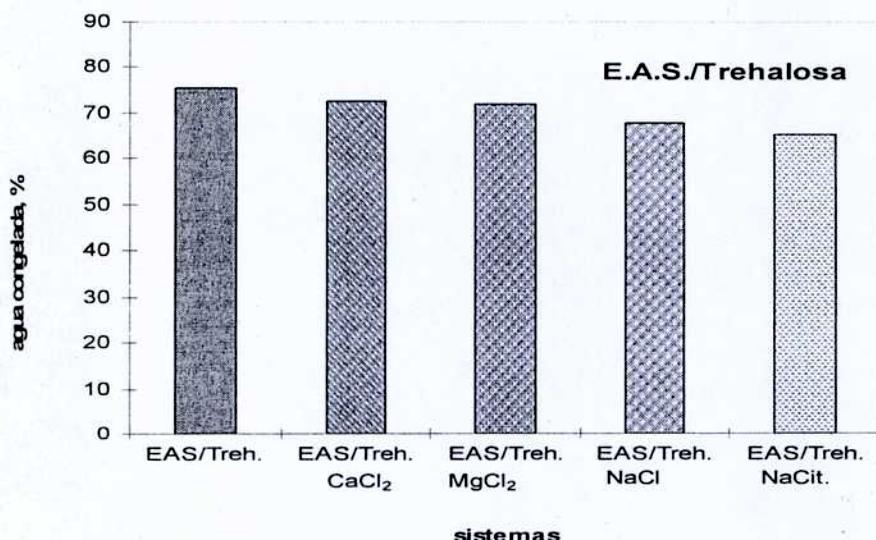
En todos los casos se observó un pico exotérmico pequeño en el termograma, indicando que no toda el agua había cristalizado en las condiciones del ensayo. Los valores obtenidos para la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), entalpias de cristalización de hielo ( $\Delta H_c$ ) y entalpias de fusión de agua ( $\Delta H_f$ ) se muestran en la Tabla IV.A.4.

**Tabla IV.A.4.** Eventos térmicos (DSC) determinados para el sistema extracto acuoso de soja adicionado con trehalosa ( $W=0.8$ ) y en presencia de distintas sales ( $R=5$ ) luego del almacenamiento a  $-26^{\circ}\text{C}$ . Sales:  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$  y  $(\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O})$ . E.A.S.= extracto acuoso de soja.

muestra/ sistemas	Transición vítrea		Cristalización de hielo	Fusión de hielo	
	$T_g$	Cristalización de hielo		$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H_m$ , J/g
		$T_g$ ( $^{\circ}\text{C}$ ) onset	$\Delta Cp_1$ , J/gK	$\Delta H_1$ , J/g	
EAS/Treh.	-47,7	0,213	1,37	-4,94	200
EAS /Treh./ $\text{MgCl}_2$	-56,11	0,273	1,732	-6,24	191,6
EAS /Treh./ NaCit.	-52,25	0,334	4,91	-5,09	177,2
EAS /Treh. / NaCl	-53,32	0,237	1,54	-4,81	180,6
EAS /Treh. / $\text{CaCl}_2$	-56,41	2,86E-02	0,59	-5,72	192

Los valores de  $\Delta H_m$ , fueron más bajos para los sistemas de trehalosa/sal comparados a aquellos sin sales, e indicaron una menor cantidad de hielo formado durante la conservación previa a  $-26^{\circ}\text{C}$ , lo que causó una mayor cantidad de agua presente en la fase amorfa (o agua no congelada) y por consecuencia valores de  $T_g$  más bajos. Después de almacenar los sistemas bajo condiciones de temperatura, tiempo y concentración que son favorables para la cristalización del agua, los valores de  $T_g$  de los sistemas se acercaron a los de  $T_g'$  (temperatura de la transición vítrea de la matriz máximamente concentrada) predichos en base a diagramas de fase/estado ( $-44^{\circ}\text{C}$  para la trehalosa,  $-52.5^{\circ}\text{C}$  para la trehalosa en presencia de  $\text{MgCl}_2$ ) (Mazzobre y col., 2001). Se observó también que la incorporación de las distintas sales en la solución produjo un descenso del punto de congelación ( $T_m$ ), este efecto fue el esperado por ser una propiedad coligativa.

La Figura IV.A.21 muestra el efecto de la adición de las sales ( $R=5$ ) sobre la formación de hielo en las soluciones E.A.S./ trehalosa ( $W=0.8$ ) congeladas a  $-26^{\circ}\text{C}$ .



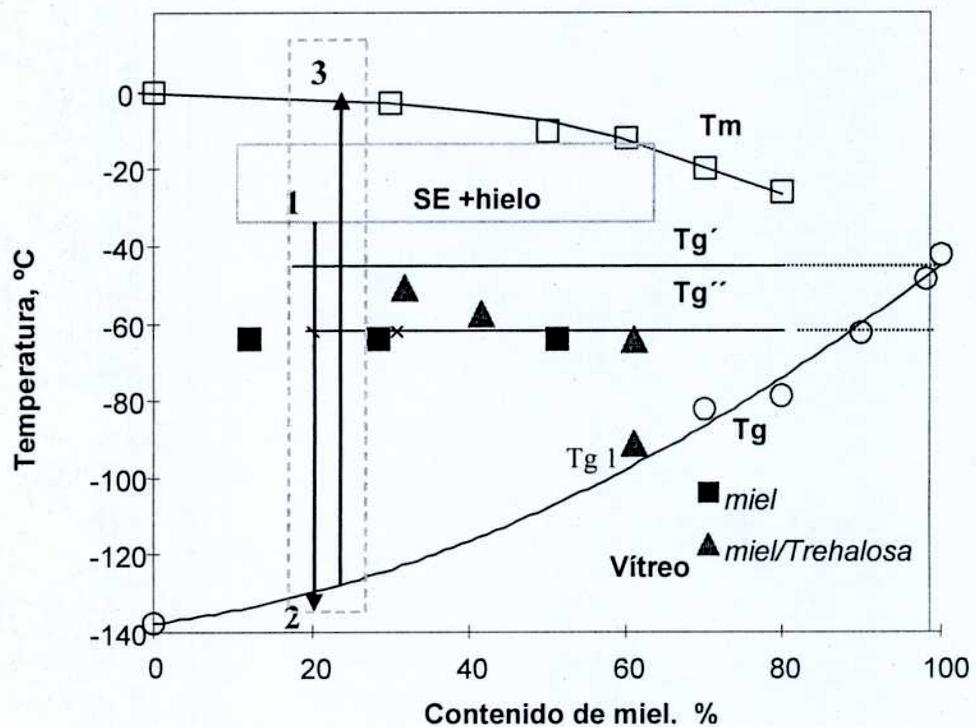
**Figura IV.A.21.** *Porcentaje de agua congelada en el sistema E.A.S. adicionado con trehalosa ( $W=0.8$ ) en ausencia/presencia de distintas sales ( $R=5$ ) luego del almacenamiento a  $-26^{\circ}\text{C}$ .*

Se observa que al igual que en los sistemas miel/treh, las sales disminuyeron la cantidad de agua congelada de los sistemas y el efecto fue dependiente de la sal agregada. La menor cantidad de hielo formado en los sistemas azúcar/sal condujo a una mayor cantidad de agua asociada a la matriz sobreenfriada (sin hielo), en consecuencia la  $T_g$  decrece y aumenta el volumen libre. La plastificación por el agua determina una mayor movilidad de las moléculas en las zonas amorfas y el aumento de la velocidad de reacciones de deterioro. Como se discutió anteriormente la formación de hielo no sería el único factor limitante para lograr la estabilización enzimática ya que la presencia de iones modificó también el ambiente molecular del azúcar protector y tuvo un efecto negativo sobre su capacidad protectora (Figura IV.A.12)

## IV.A.5. DIAGRAMA DE ESTADO Y ESTABILIDAD ENZIMÁTICA

IV.A.5.1. *Sistemas de miel*

El diagrama de estado es un mapa que permite identificar los diferentes estados y los cambios de fases y estado que puede sufrir un alimento en función del contenido de sólidos y la temperatura (Rahman, 2006). La Figura IV.A.22 muestra en el diagrama de fases para un sistema de miel publicado por Kantor y col. (1999) y los valores experimentales obtenidos en el presente trabajo.



**Figura IV.A.22.** Diagrama de estado del sistema miel / agua obtenido por DSC: □ Curvas de  $T_m$  y ○  $T_g$  publicados por Kantor, Z. y col., (1999). ■ Valores experimentales de  $T_g$  obtenidos en el presente trabajo para los sistemas de miel ▲ y sistemas de miel con agregado de trehalosa en el presente trabajo.

En la zona gris se ubicarían inicialmente los sistemas ensayados (soluciones con alto contenido en agua: 12.5, 25 y 50% de miel que se almacenaron a temperatura constante ( $-26^{\circ}\text{C}$ )), los sistemas se encontraban en estado sobreenfriado en equilibrio metaestable.

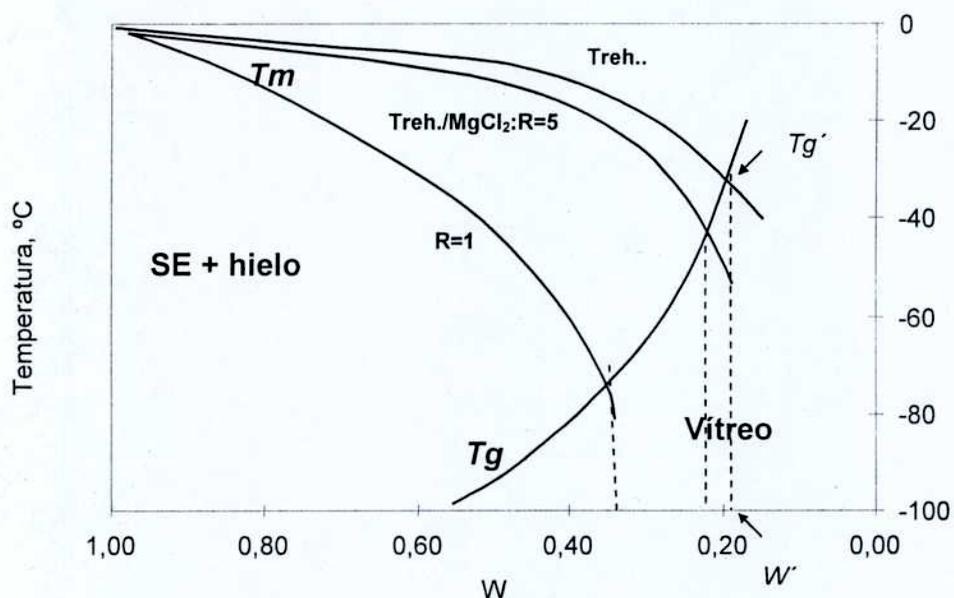
Para determinar la transición vítreo, tal como fue discutido en secciones previas, se realizó el recorrido de temperaturas indicado por las flechas 1-2 (desde la temperatura de almacenamiento a  $-26^{\circ}\text{C}$  hasta la vitrificación a  $-150^{\circ}\text{C}$ ) y luego se llevó a un estado sobreenfriado incrementando la temperatura (flecha 2-3 del área punteada de la Figura IV.A.22). En los sistemas que no congela nada de agua, se obtiene el valor de  $T_g$ . Si se congela parte del agua se obtiene un valor indicado en el grafico como  $T_g''$ . Si se congela toda el agua se obtiene la matriz máximamente crioconcentrada con una temperatura de transición vitrea  $T_g'$ , con una mínima cantidad de agua no congelada asociada a la fase amorfa (W'). Varios autores (Rubin y col., 1990; Simatos y Blond, 1993; Shalaev y Frank, 1995; Abblet y col., 1993) informaron una estructura de doble paso en sistemas de azúcar con dos  $T_g$ , ya que luego de la  $T_g$ , mas baja congela parte del agua y se obtiene otra  $T_g$ , del sistema mas concentrado, tal como se ha discutido en la sección I.A.4.2. Se observa que los valores experimentales de  $T_g$  son cercanos  $T_g'$  indicando que los sistemas estaban crioconcentrados luego del almacenamiento a  $-26^{\circ}\text{C}$ . Si bien pueden requerirse varios ciclos de congelación – calentamiento (templado o “annealing”) para alcanzar sistemas con la máxima concentración por cristalización del agua (Levine y Slade, 1989; Roos y Karel, 1991e, f), en el presente trabajo, el enfriamiento lento de las soluciones y el almacenamiento a temperaturas donde la movilidad molecular favorece la formación de hielo permitieron obtener sistemas crioconcentrados. La gran cantidad de hielo formado disminuyó la cantidad de agua asociada a la fase amorfa y aumentó la temperatura de transición vítreo ( $T_g$ ) de la solución a un nivel casi constante cercano a los valores de  $T_g'$ .

obtenidos en bibliografía. Ambas variables ( $T_g'$  y  $W'$ ) son importantes al analizar la estabilidad de los sistemas congelados (Slade y Levine, 1991, Simatos y Blond, 1991; Kerr y Reid, 1994).

Dependiendo de la temperatura y el tiempo, los alimentos congelados entonces pueden tener una cantidad significativa de agua congelada que disminuye la protección de las matrices amorfas y aumenta el deterioro de biomoléculas y estructuras biológicas. Como se ha discutido anteriormente los niveles de recuperación de la actividad de la enzima amilasa almacenada isotérmicamente dependió del tiempo, en un sistema en equilibrio metaestable donde la cantidad de agua congelada no sería el único factor que afectaría la estabilidad. La estabilidad enzimática en sistemas de miel almacenados a  $-26^{\circ}\text{C}$  dependió de la concentración de la matriz (proporción de azúcares / agua mínima del sistema) detectada en este caso en base al cambio en la capacidad calorífica, de la cantidad de agua congelada, y de la presencia de sales.

IV.A.5.2. Sistema E.A.S./Treh. ( $W=0.8$ )

Los resultados obtenidos en relación con el efecto de las sales sobre los parámetros físicos de los sistemas adicionados con trehalosa que contenían la enzima GOT/AST (Tabla IV.A.4.), se compararon con datos teóricos publicados en bibliografía (Miller y col, 1997; Corti, 2001). Los resultados obtenidos por estos autores para soluciones de trehalosa y trehalosa en presencia de  $MgCl_2$  se muestran en la Figura IV.A.23, donde se observa la curva de transición vítrea ( $T_g$ ) y la curva de fusión ( $T_m$ ), esta última calculada para distintas relaciones molares trehalosa/sal (se incluyen  $R=1$  y  $5$ ).



**Figura IV.A.23.** Curvas de fusión de hielo ( $T_m$ ) para soluciones de trehalosa pura (Treh) (Miller y col, 1997) y de trehalosa en presencia de  $MgCl_2$  ( $R= 1- 5$ ) (Corti, 2001) y la curva de transición vítrea para trehalosa. Fuente: Mazzobre y col., 2001.

El punto de intersección de ambas curvas define las condiciones de temperatura ( $T_g'$ ) y fracción en masa de agua (W') de la fase amorfía en las cuales la cristalización de agua está cinéticamente inhibida. Se observa que en presencia de  $MgCl_2$  disminuye la  $T_m$  y disminuyen los valores de  $T_g'$  (intersección de la curva de  $T_m$  con la curva de  $T_g$ ) mientras que los valores de W' aumentan respecto a los valores correspondientes al azúcar puro. Este efecto es mayor al aumentar la proporción de sal ( $R=1$ ).

La Tabla IV.A.5 muestra los valores de agua asociada a la fase amorfía (W) y  $T_g$  obtenidos en el presente trabajo para los sistemas enzimáticos crioconcentrados de trehalosa y trehalosa / sales ( $R=5$ ) ( $W$  inicial=0.8). (III.G.3)

**Tabla IV.A.5** *Valores experimentales de W y  $T_g$  para los sistemas enzimáticos crioconcentrados de trehalosa y trehalosa sales ( $R=5$ ) ( $W=0.8$ ). Sales: Cloruros de Mg, Ca y Na y citrato de Na.*

Sistemas	R	$T_g$ (°C)	W
EAS/T		-44	0.238
EAS /T / $MgCl_2$	5	-55	0.283
EAS /T / $CaCl_2$	5	-56	0.281
EAS /T / NaCl	5	-53	0.324
EAS /T/ NaCit.	5	-54	0.387

Se observó que los valores de  $T_g$  y W de las muestras obtenidos en las condiciones del ensayo son cercanos a los  $T_g'$  y W' teóricos obtenidos por extrapolación del diagrama

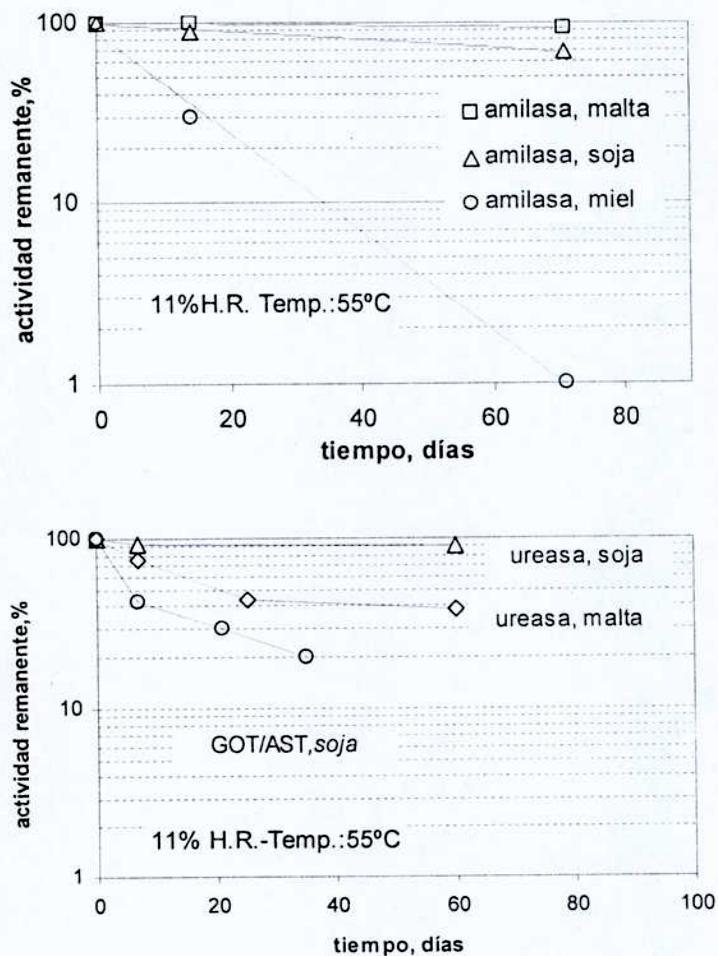
de fases para sistemas binarios de trehalosa ( $T_g' = -31^\circ\text{C}$ ,  $W' = 0.215$ ) y trehalosa con cloruro de Mg ( $T_g' = -42^\circ\text{C}$ ,  $W' = 0.225$ )

El aumento del valor de  $T_g'$  del sistema (por ejemplo por incorporación de biopolímeros) ha sido una estrategia utilizada para evitar la formación de hielo en aquellas preparaciones que requieren almacenamiento a bajas temperaturas (Levine y Slade, 1989; Slade y Levine, 1991). En este trabajo la inhibición/retraso de la cristalización de hielo en sistemas acuosos con trehalosa ( $W=0.8$ ) mostraron que el efecto de las sales no fue distinto del esperado en base a las propiedades coligativas; disminución del punto de fusión y disminución de  $T_g'$  con el correspondiente aumento de la cantidad de agua no congelada. Como la movilidad molecular varía directamente con el valor de  $W'$  e inversamente con la estabilidad del sistema, los incrementos del contenido de agua ( $W$ ) hicieron que la estabilidad de la enzima aspartato amino transferasa disminuyera en los sistemas combinados de trehalosa y sales (ver Figura IC.A.12).

**IV. B. ESTABILIDAD TÉRMICA DE LAS ENZIMAS EN MODELOS DE ALIMENTOS DESHIDRATADOS.**

En esta sección se analizó la estabilidad de las enzimas amilasa, ureasa y aspartato amino transferasa (GOT/AST) de distintas fuentes vegetales (extracto de soja y malta) y amilasa de miel, en los sistemas liofilizados. Se evaluó en particular la capacidad protectora del azúcar trehalosa en relación al estado físico-químico y la temperatura de transición vítrea de las matrices deshidratadas. Para ello se seleccionaron distintas condiciones de humedad y la temperatura del almacenamiento. Se eligió una temperatura de incubación de 55 °C como un límite superior al cual un producto biológico lábil podría estar expuesto durante un almacenamiento tórrido (Slade y Levine, 1991; 1993). Schebor y col. (1996); Terebiznik y col. (1998) y Mazzobre y col. (2003) encontraron que a temperaturas mayores (60-80°C) el daño térmico determinó la inactivación de otras enzimas y no se puede evaluar el efecto del estado físico del medio sobre la funcionalidad de las mismas. Por ello el almacenamiento isotérmico en sistemas semihúmedos a temperaturas intermedias (55°C), ligeramente superiores a las temperaturas de transición vítrea ( $T_g$ ), permitiría evaluar los cambios que ocurren con el tiempo de almacenamiento cuando el sistema se halla en estado de líquido sobreenfriado ( $(T-T_g) > 0$ ).

Como estudio preliminar, se analizó la estabilidad de las enzimas de los sistemas preparados según III.B, liofilizados en ausencia de aditivos (III.C.2). La Figura IV.B.1 muestra la actividad remanente de las enzimas de las distintas fuentes, liofilizadas y tratadas a 55°C en función del tiempo.



**Figura IV.B.1.** Actividad remanente de las distintas enzimas (fuentes: malta, soja, miel) en los extractos liofilizados en ausencia de aditivos y humidificados a 11% de H.R. en función del tiempo de almacenamiento a 55°C

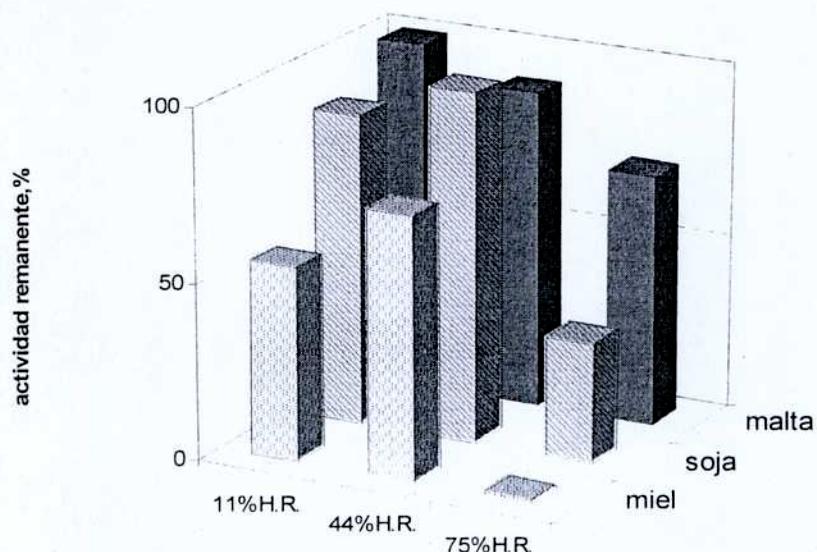
La enzima amilasa de las preparaciones liofilizadas de miel mostró mayor velocidad de inactivación térmica que las de origen vegetal. En los extractos vegetales liofilizados

(malta y soja) las enzimas ureasa y amilasa fueron mas estables que la enzima GOT/AST. La GOT/AST de soja y amilasa de miel fueron las más lábiles en las condiciones analizadas. La pérdida de actividad enzimática se ajustó a una cinética de primer orden, la pendiente de la recta ( $k_i$ ) corresponde a la constante de velocidad de inactivación de la enzima. Los valores de  $k_i$  (calculados según Ec. IV.I). para amilasa de miel y aspartato amino transferasa (GOT/AST) de soja fueron  $0.1155$  y  $0.073$  días $^{-1}$  respectivamente.

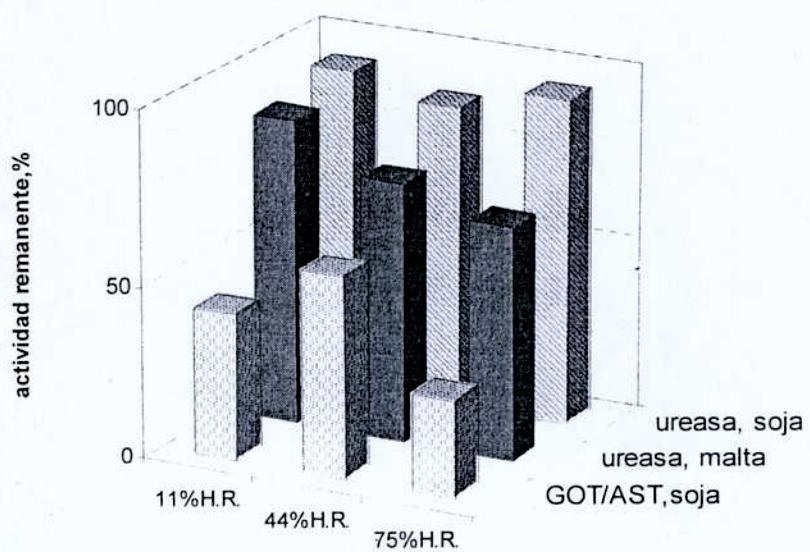
La estabilidad de las enzimas se analizó también en los sistemas liofilizados con distinto contenido de agua. Para ello los extractos fueron equilibrados también a 44 y 75% H.R. e incubados a 55°C. Los resultados obtenidos luego de 7 días de almacenamiento se muestran en la Figura IV.B.2 a y b. Se observó que la actividad de la enzima amilasa, de los sistemas expuestos hasta 44% H.R. e independientemente de la fuente, se conservó por encima del 50% de su valor inicial. A 75% H.R el aumento del contenido de agua fue crítico para la amilasa de miel que perdió totalmente su actividad (Figura IV.B.2a). La enzima amilasa del extracto de malta fue la más resistente durante el almacenamiento a 55°C, aún a tiempos prolongados (datos no mostrados).

La enzima ureasa, tanto de soja como de malta, fue muy estable en la condición ensayada y poco sensible a los cambios del contenido de agua de la matriz. La actividad remanente de la enzima GOT/AST fue menor al 50% del valor inicial para todas las H.R. estudiadas (Figura IV.B.2b).

a) Amilasas (miel, malta y soja)



b) ureasas (soja, malta) y GOT/AST (soja)



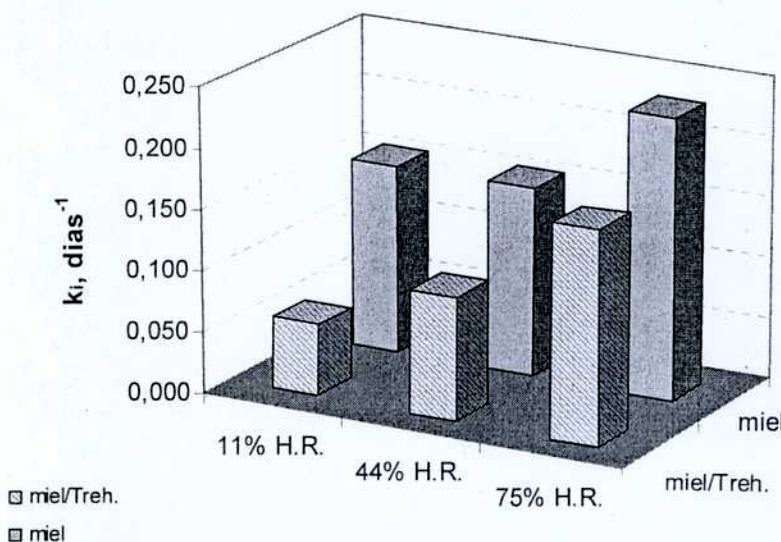
**Figura IV.B.2.** Actividad remanente de las distintas enzimas de diferentes fuentes en los extractos liofilizados y humidificados a distintas humedades relativas (HR.) luego de 7 días de almacenamiento a 55°C: a) Enzima amilasa de diferentes fuentes (miel, malta y soja), b) Ureasas (soja, malta) y GOT/AST (soja).

**IV. B.1. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ESTABILIDAD DE LAS DIFERENTES ENZIMAS EN LOS SISTEMAS SOBREENFRIADOS CON EL AGREGADO DE TREHALOSA.**

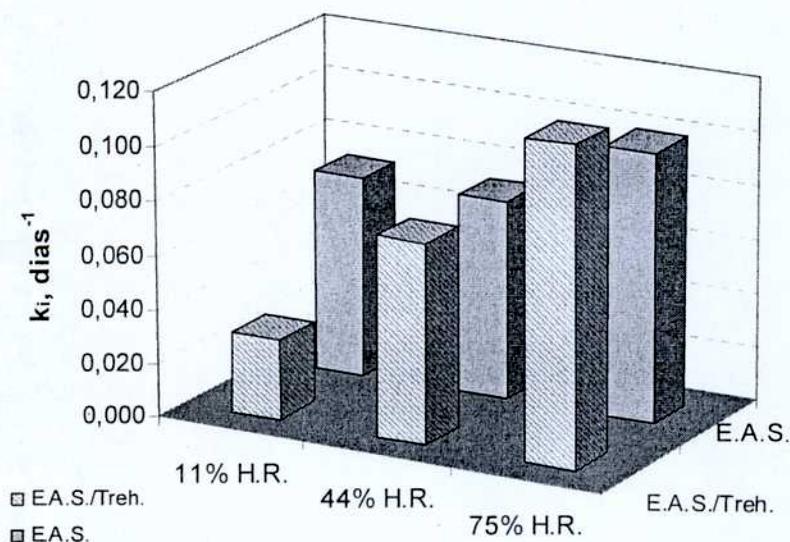
Como vimos en la sección IV.A el azúcar trehalosa resultó un agente crioprotector adecuado para estabilizar las enzimas, por lo tanto fue ensayado también en los sistemas liofilizados. Existen numerosas evidencias que indican que este azúcar es muy efectivo para preservar las biomoléculas en sistemas amorfos durante la deshidratación y el almacenamiento (Crowe y col., 1983, 1984a; Mouradian y col., 1984; Roser, 1991; Leslie y col., 1995; Uritani y col., 1995; Schebor y col., 1996, Murray y Liang, 2000). En la sección IV.B se observó que las enzimas amilasa de miel y aspartato amino transferasa de soja en los sistemas liofilizados fueron las más sensibles a las condiciones del almacenamiento ensayadas (Figura IV.B.2 a y b). Por lo tanto se seleccionaron estas enzimas como sistemas modelo para analizar el efecto protector del disacárido en función del contenido acuoso y de las características físicas de la matriz.

**IV. B.1.1. Efectos del contenido de agua.**

En la Figura IV.B. 3 y 4 se compararon las constantes de inactivación ( $k_i$ ) obtenidas para la enzima amilasa de miel y la enzima GOT/AST de soja en sistemas liofilizados (miel y el extracto acuoso de soja: E.A.S.) con o sin el agregado previo de trehalosa expuestos a distintas H.R. (11, 44 y 75% de H.R.) que fueron almacenados a 55°C..



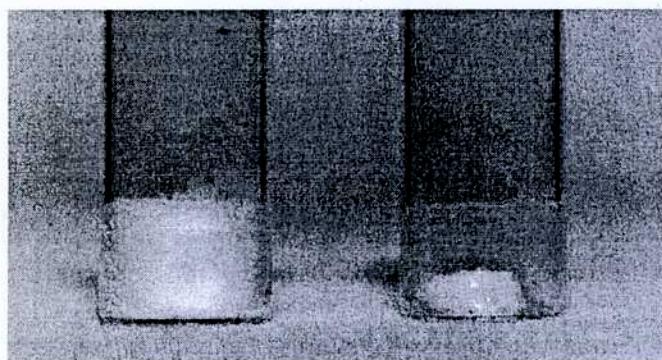
**Figura IV.B.3.** Constante de inactivación ( $k_i$ ) de la enzima amilasa de miel en sistemas liofilizados sin aditivos (miel) y con trehalosa (miel/Treh) humidificadas a distintas H.R. (11, 44 y 75%) almacenadas a 55°C.



**Figura IV.B.4.** Constante de inactivación ( $k_i$ ) de la GOT/AST (soja) en sistemas liofilizados sin trehalosa (E.A.S.) y con trehalosa (E.A.S./Treh.) humidificadas a distintas H.R. (11, 44 y 75%) almacenadas a 55°C.

El efecto protector de la trehalosa se observó en los sistemas expuestos a humedades bajas (11% H.R.) tanto para amilasa (miel) como para la enzima GOT/AST (soja) (Figura IV.B. 3 y 4). Al aumentar el contenido de agua de los sistemas (44 y 75 % H.R.) las constantes de inactivación en presencia de trehalosa se incrementaron marcadamente (la estabilidad disminuyó) para las dos enzimas estudiadas en comparación con los valores observados en la matriz de menor humedad (11% de H.R.) y los valores para la GOT/AST con trehalosa fueron similares a los observados en el E.A.S. solo.

La observación visual macroscópica del estado físico de los sistemas analizados en las Figura IV.B.3 y 4 coincidió con lo esperado a partir de sus valores de  $T_g$ . En el presente trabajo las muestras equilibradas a H.R. mayores a 44% mostraron un colapso estructural propio del estado líquido sobreenfriado, lo cual es una manifestación del hecho de que el valor de  $T_g$  de las formulaciones era menor que la temperatura de almacenamiento (Roos, 1995). En la Figura IV.B.5 se muestra la diferencia en el aspecto físico de una matriz amorfa en estado vítreo y en estado de líquido sobreenfriado (Mazzobre, 2001).

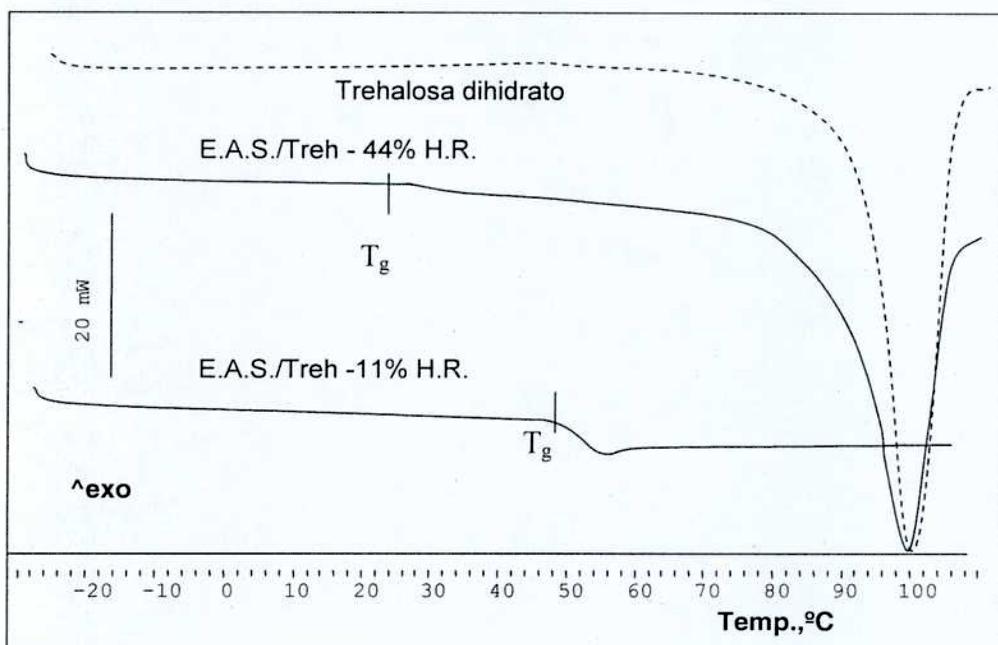


**Figura IV.B.5.** Aspecto físico de una matriz amorfa en estado vítreo y en estado de líquido sobreenfriado. Fuente: Mazzobre (2001).

#### IV. B.1.2. Efecto de la cristalización del disacárido trehalosa sobre la capacidad protectora del azúcar.

Según lo observado en la sección previa, la estabilidad térmica de los extractos enzimáticos estudiados en presencia de trehalosa fue afectada por el contenido acuoso de los sistemas. La cristalización de azúcares amorfos es un proceso dependiente del tiempo que ocurre a temperaturas mayores que el valor de  $T_g$ , siendo la velocidad de cristalización función del parámetro ( $T - T_g$ ). Se ha observado que el tiempo de cristalización aumenta al disminuir el valor de ( $T - T_g$ ) (Roos y Karel, 1991a<sup>3</sup>) y depende por lo tanto del contenido acuoso del sistema y de la temperatura de almacenamiento (Roos y Karel, 1992). La  $\alpha$ ,  $\alpha$ -trehalosa, empleada en el presente trabajo, forma cristales estables anhidros o dihidratados. Fue observado por calorimetría diferencial de barrido (DSC) que para obtener la forma cristalina anhidra a partir del azúcar amorfo se requiere una temperatura cercana a los 160°C (Sussich y col., 1998; Taylor y York, 1998; Mazzobre, 2001). Para cristalizar como dihidrato, la  $\alpha$ ,  $\alpha$ -trehalosa requiere (además de una cierta movilidad determinada por  $T > T_g$ ) de una fracción en masa de agua mínima de 0.1 ( $W = 0.1$  es la cantidad de agua asociada al cristal dihidrato). Las diferencias de estabilidad observadas durante el almacenamiento de las enzimas en trehalosa a distintas humedades relativas (Figura IV.B.4) se relacionó entonces con el proceso de cristalización del azúcar en las marices amorfas. En este sentido se evaluaron propiedades físicas como  $T_g$  y grado de cristalización, del sistema más simple que contenía un solo azúcar (E.A.S. / Treh.), usando calorimetría diferencial de barrido.

En la Figura IV.B.6. se comparan los termogramas obtenidos por DSC para los sistemas que contenían el extracto de soja liofilizado con trehalosa y expuestos a 11 y 45 % H.R. con el termograma obtenido para el cristal dihidratado puro de trehalosa (línea punteada) (Mazzobre y Buera, 1999).



**Figura IV.B.6.** Termogramas obtenidos por DSC para trehalosa cristalina dihidrato (Mazzobre y Buera, 1999) y para los extractos enzimáticos de soja liofilizados con trehalosa, humidificados a 11 y 44% H.R. en el presente trabajo.

Los sistemas expuestos a 11 y a 44% H.R. presentaron un cambio en la línea de base correspondiente a la transición vítrea. Los sistemas expuestos a 44% H.R mostraron además un pico endotérmico a la misma temperatura que el observado para la fusión del cristal de trehalosa dihidrato. Trabajos anteriores (Shafizadeh y Susott, 1973; Weast y col., 1986; Green y Angell, 1989; Roos, 1993) relacionan concluyentemente este evento

observado en los termogramas a 100 °C con la fusión de los cristales dihidratados de trehalosa. Por lo tanto estos resultados indicaron que el azúcar había cristalizado durante la humidificación a 44% H.R. en las condiciones del ensayo. La cantidad de trehalosa cristalina presente en cada muestra (fracción cristalina) se estimó comparando el área del pico endotérmico correspondiente con el área del pico (o entalpía) obtenida para el dihidrato puro de trehalosa (139 J/g medido en las mismas condiciones)(III.G.3). En la Tabla IV.B 1 se muestran los valores de contenido de agua (III.D),  $T_g$ , área del pico endotérmico y fracción de trehalosa cristalina obtenidos por DSC para de los distintos sistemas expuestos a 11, 44 y 75% H.R..

**Tabla IV.B.1.** *Temperaturas de transición vítrea ( $T_g$ ), contenido de agua, área del pico endotérmico y fracción cristalina obtenidos para el E.A.S. en presencia de trehalosa y para trehalosa dihidratada humidificados a distintas H.R.*

Matriz	H.R. %	Fracción en masa de agua (W)	Área del pico endotérmico (J/g)	Fracción cristalina	$T_g$ ,onset (°C)	$(T-T_g)$ (°C)
<i>Trehalosa<sup>1)</sup></i>	22	0.031	-	-	63	-8
	44	0.10	95	0.49	48	7
	75	0.11	139.5	1	-	-
<i>E.A.S./Treh</i>	11	0.025	-	-	48	7
	44	0.1	64.2	0.46	23	32
	75	0.1	114.5	0.82	-38	93

<sup>1)</sup> Mazzobre y Bueras (2001)

Se observó que en los sistemas deshidratados con trehalosa (E.A.S./Treh.) humidificados a 44 y 75% H.R., la cantidad de agua y la temperatura favorecieron la cristalización del dihidrato (fracción cristalina 0.46 y 0.82, respectivamente). La

cristalización del azúcar sumado a la mayor movilidad molecular de los sistemas a 44 y 75% H.R. probablemente afectó negativamente la estabilidad de la enzima (Figura IV.B.4).

El mecanismo de protección de las proteínas por la trehalosa en sistemas liofilizados puede ser explicado por dos efectos. Por un lado el rol que juega en el reemplazo del agua de la interfase (Arakawa y col., 1982a). Al respecto se ha señalado que la mayor efectividad de la trehalosa en relación a otros disacáridos está relacionada con la mayor flexibilidad que posee entre sus monómeros, comparada con la molécula de sacarosa o maltosa (Crowe y Crowe, 1983). Esta propiedad favorece las interacciones específicas entre la trehalosa con las proteínas “reemplazando” al agua perdida alrededor de los grupos polares de las macromoléculas y la conservación de las estructuras biológicas (Patist y Zoerb, 2005). Otro efecto a considerar sería el relacionado con el estado físico ya que la trehalosa en estado vítreo o sobreenfriado inmoviliza a las moléculas proteicas. En un sistema vítreo, altamente viscoso, estarían inhibidos los cambios físicos y químicos que dependen de la difusión de los reactivos involucrados (Franks, 1993) y estarían limitados los cambios conformacionales que dan lugar a la desnaturización proteica como así también las reacciones intra e intermoleculares que afectan su funcionalidad. En particular, la trehalosa anhidra tiene mayor temperatura de transición vítreo ( $T_g=115^{\circ}\text{C}$ ) que otros disacáridos con el mismo peso molecular (84°C para maltosa y 60°C para sacarosa). Esta propiedad favorece la protección de biomateriales ya que el parámetro ( $T-T_g$ ) condiciona la velocidad de reacciones de deterioro (Roos y Karel, 1991a, 1992).

Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con el comportamiento esperado: mayor estabilidad de la enzima en las matrices en estado vítreo donde la movilidad molecular está restringida (( $T-T_g$ ) cercanos a cero) y una inactivación drástica en el estado sobreenfriado donde la movilidad del sistema aumenta marcadamente

y si el contenido de agua es suficiente, la trehalosa puede cristalizar perdiendo su capacidad de interactuar con las proteínas.

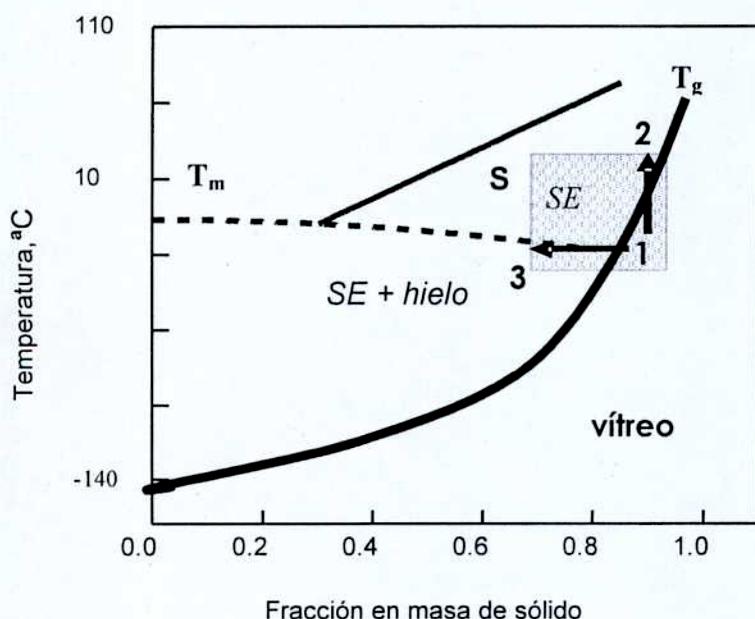
#### IV B.2 EMPLEO DE MATRICES COMBINADAS TREHALOSA/SAL.

El estudio del efecto de la incorporación de electrolitos a la matriz es importante ya que están presentes en todos los sistemas biológicos y son utilizados con diversos fines en la formulación de alimentos, ingredientes o preparados farmacéuticos. Como se observó en la sección anterior el aumento del contenido de agua y la cristalización del azúcar perjudicaron la estabilidad de las enzimas. Algunos autores proponen mantener el estado amorfó de la trehalosa para estabilizar enzimas en sistemas sobreenfriados durante el almacenamiento (Cardona y col., 1997; Suzuki y col., 1997; Sun y Davinson, 1998; Mazzobre y Buera; 1999). El retraso o inhibición de la cristalización en sistemas sobreenfriados por la adición de sales sería una estrategia para mejorar la eficiencia de los azúcares como protectores de biomoléculas (Izutsu y col, 1995; Pikal y col., 1999). Las sales modifican ciertas propiedades físicas de los azúcares (Miller y col., 1998, 1999, 2000), pueden exhibir un efecto sinérgico sobre la estabilización de ciertas proteínas (Carpenter y col., 1987) y pueden afectar la cinética de las reacciones químicas que ocurren en los alimentos (Calligaris y Nicoli, 2006).

En esta sección se analizó el efecto del agregado de las sales sobre la estabilidad enzimática en relación con la temperatura de transición vítrea y cristalización del azúcar en los sistemas conteniendo los electrolitos en ambientes de baja disponibilidad de agua

**IV. B.2.1. Análisis comparativo de la estabilidad de las diferentes enzimas en sistemas liofilizados trehalosa/sal.**

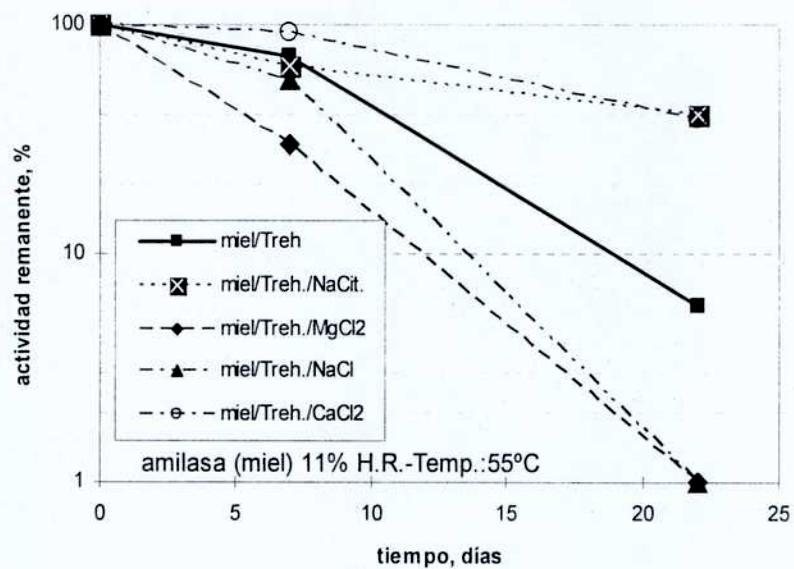
En la Figura IV.B.7 se muestra en el diagrama de estado/fases del sistema trehalosa-agua la región en la cual se investigó el efecto de las sales sobre la cristalización de azúcar o agua (área sombreada). Este diagrama nos indica que un sistema en estado vítreo (punto 1) considerado “estable”, puede ser llevado a un estado de líquido sobreenfriado (SE) aumentando la temperatura (segmento 1-2 de la Figura IV.B.7) y/o aumentando el contenido de agua (segmento 1-3 de la Figura IV.B.7).



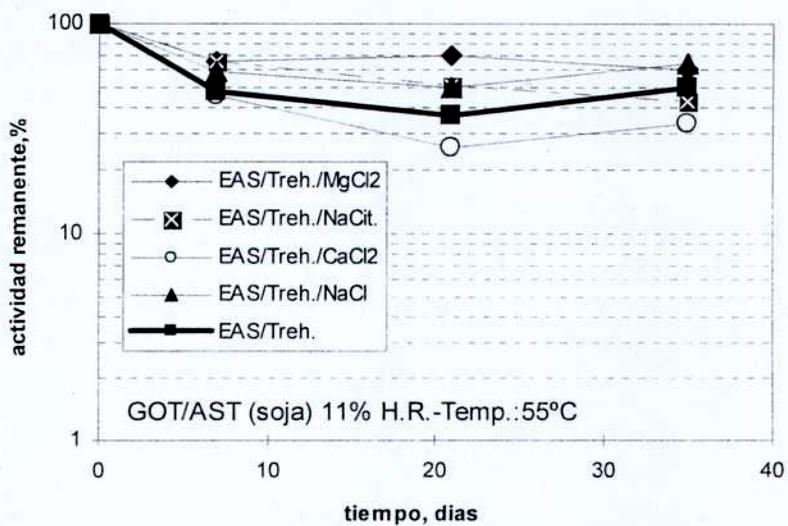
**Figura IV.B.7.** Diagrama de fase complementado del sistema trehalosa-agua, el área sombreada corresponde a la región donde los efectos de las sales sobre la cristalización de agua o azúcar fueron investigados. S, curva de solubilidad; T<sub>m</sub>, curva de fusión; T<sub>g</sub>, curva de transición vítrea; SE, líquido sobreenfriado.

En el presente trabajo la estabilidad térmica de las enzimas de diferentes fuentes (extracto de soja y miel) y el efecto de los electrolitos sobre la cristalización del azúcar se analizó en sistemas sobreenfriados, marcados como SE en la Figura IV.B.7. En estado sobreenfriado, puede ocurrir la cristalización del azúcar, resultando la pérdida del efecto protector de las matrices amorfas y el consecuente deterioro de biomoléculas y estructuras biológicas (Suzuki y col., 1997; Sun y Leopold, 1997; Mazzobre, 2001).

Las sales ( $MgCl_2$ ,  $NaCl$ ,  $Ca_2Cl$ , y  $Na_3C_6H_5O_7$ ) y la concentración empleada (relación molar inicial trehalosa/ sal de 5) fueron las mismas que se ensayaron en los estudios de los sistemas sobresaturados por congelación (sección IV.A). Se sabe que en los sistemas combinados la presencia de sales podría retrasar o inhibir la cristalización del azúcar en ambientes de humedad intermedia (Mazzobre y Buera; 1999) o podrían tener efectos específicos (inactivación o activación) sobre la actividad de la enzima (Fennema, 2000). Para verificar estas posibilidades se evaluó la estabilidad de las enzimas amilasa de miel y GOT/AST de soja en condiciones de baja disponibilidad de agua, para que no se formara el dihidrato de trehalosa y observar las interacciones específicas de los iones con cada enzima. En las Figuras IV.B.8 y 9 se muestran la actividad remanente de la enzima amilasa (miel) y de la GOT/AST (E.A.S.) en sistemas con trehalosa y combinados trehalos/sal humidificados a 11% H.R. en función del tiempo de almacenamiento a 55°C.



**Figura IV.B.8.** Actividad remanente de la enzima amilasa en sistemas liofilizados miel/ trehalosa o miel/trehalosa en presencia de distintas sales ( $R= 5$ ) humidificados a 11% H.R. Temperatura de almacenamiento: 55°C. NaCit.: citrato de sodio

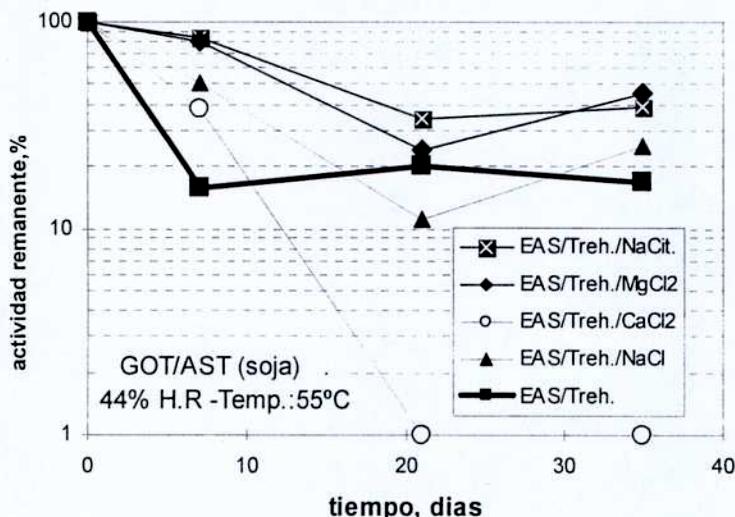


**Figura IV.B.9.** Actividad remanente de la enzima GOT/AST en sistemas liofilizados con trehalosa (E.A.S.) con trehalosa en presencia de distintas sales ( $R= 5$ ) humidificados a 11% H.R. Temperatura de almacenamiento: 55°C. NaCit.: citrato de sodio.

Se observó que en sistemas con bajo contenido de agua (11% H.R) la presencia de los iones modificó la estabilidad de la enzima amilasa de miel, con respecto al comportamiento observado en trehalosa sin sales (Figura IV.B.8). La presencia de  $MgCl_2$  afectó negativamente la actividad de la enzima en forma irreversible, mientras que el  $CaCl_2$  tuvo un efecto positivo. Este efecto del calcio no se observó, en el presente trabajo, cuando los sistemas fueron congelados (sección IV.A.3.1) o con la enzima purificada en solución por otros autores (Babacan y Rand., 2007). Sin embargo, estudios previos informaron que la presencia de  $CaCl_2$  aumentó la estabilidad térmica de amilasa de otras fuentes (Thoma y col., 1971; Khan, 1989; Lecker y Khan., 1998).

En la Figura IV.B.9 se puede ver en cambio, que la presencia de sales afectó sólo ligeramente la estabilidad de la enzima GOT/AST de soja en los sistemas combinados humidificados a 11% H.R con respecto a la estabilidad observada en trehalosa sin sal, lo cual indica que no habría efectos específicos importantes de inactivación o activación de la enzima en presencia de los iones analizados cuando la trehalosa estaba amorfa.

En la sección IV.B.1.1 se observó que la adición de trehalosa no mejoró la estabilidad de la enzima GOT/AST cuando los sistemas fueron expuestos a 44% H.R. (los sistemas con o sin azúcar tienen valores de  $k_i$  similares) (Figura IV.B.4) y esta situación podría ser atribuida a la cristalización de la trehalosa como dihidrato (ver Figura IV.B.7). Por lo tanto se analizó el efecto de adición de las sales en estas condiciones críticas de humidificación. La Figura IV.B.10 muestra la actividad remanente de la enzima GOT/AST de soja en sistemas conteniendo trehalosa o trehalosa/sal humidificados a 44% H.R. en función del tiempo de almacenamiento a 55°C.



**Figura IV.B.10.** Actividad remanente de la enzima GOT/AST en el extracto acuoso de soja (E.A.S.) liofilizado con trehalosa (línea remarcada) o con trehalosa en presencia de las distintas sales ( $R = 5$ ) humidificados a 44% H.R. Temperatura de almacenamiento: 55°C. NaCit.: citrato de sodio.

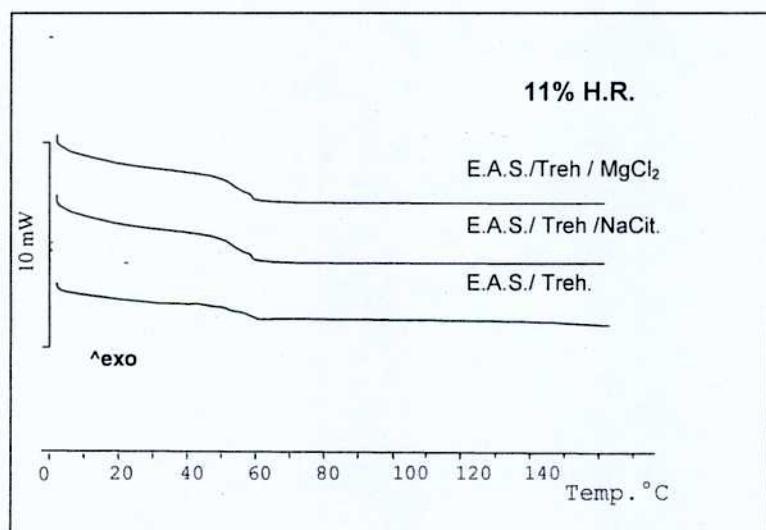
Los resultados indicaron que la adición de citrato de sodio o cloruro de magnesio a la matriz de trehalosa mejoró la estabilidad de la enzima GOT/AST de soja en los sistemas expuestos a 44% H.R en relación con la estabilidad observada en trehalosa. Un efecto negativo fue observado en presencia de cloruro de calcio y no se observaron diferencias en presencia de cloruro de sodio en comparación con trehalosa sin sales. En estas condiciones críticas de humedad, la protección observada en presencia de citrato de sodio y cloruro de magnesio estaría relacionada con el mantenimiento de la estructura amorfía de la matriz de trehalosa ya que no fue observada una acción específica de estas sales sobre la enzima cuando la cristalización de trehalosa estaba impedida (Figura IV.B.9). Otros autores notaron que la combinación trehalosa y ciertas sales tenían un efecto protector mayor que el

azúcar solo. Por ejemplo, Miller y col. (1998) estudiando la estabilidad la enzima lactato dehidrogenasa (LDH) en matrices borato de sodio/trehalosa observaron un efecto sinérgico similar en ambientes de alta humedad. Mazzobre y Buera (1999) observaron que la adición de KCl o MgCl<sub>2</sub> aumentó la resistencia térmica de la enzima  $\beta$ -galactosidasa en sistemas deshidratados con trehalosa. Ambos autores atribuyeron el aumento de la protección a la disminución de la cristalización del azúcar por el agregado de sales y concluyeron que el aumento de la viscosidad de los sistemas trehalosa/sal retrasa el movimiento que conduce a la desnaturalización proteica.

Teniendo en cuenta estos conceptos, se analizaron las posibles modificaciones de propiedades físicas de los sistemas como la temperatura de transición vítrea, propiedades de sorción y cristalización de tehalosa en presencia de las sales estudiadas.

#### IV.B.3. ANÁLISIS DE PROPIEDADES FÍSICAS EN SISTEMAS COMBINADOS AZÚCAR/SAL.

En la sección anterior se observó que las matrices con trehalosa combinadas con citrato de sodio o cloruro de magnesio resultaron más efectivas que las matrices del azúcar sin sal para estabilizar la enzima GOT/AST de soja en los sistemas expuestos a 44% H.R. mientras que en los sistemas expuestos a 11% H.R. la estabilidad de la enzima GOT/AST no fue afectada por la presencia de sales (Figura IV.B.9). En la Figura IV.B.11 se observan los termogramas obtenidos por DSC de los sistemas combinados trehalosa/sal humidificados a 11% H.R luego de 35 días a 55°C.

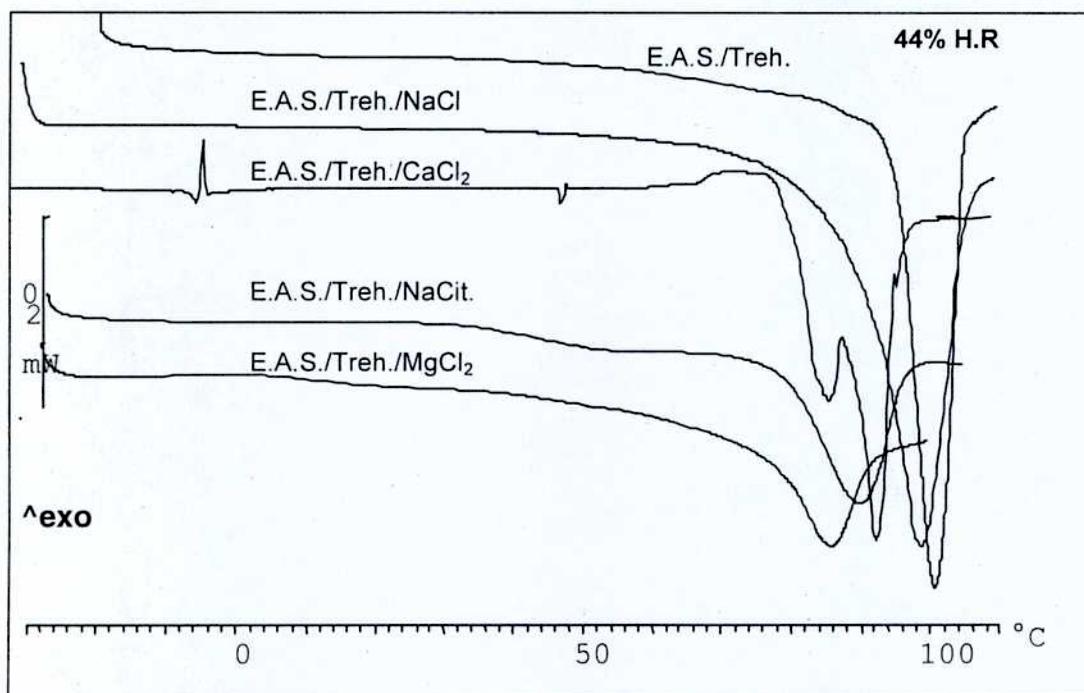


**Figura IV.B.11.** Termogramas obtenidos por DSC para los sistemas liofilizados trehalosa (E.A.S./Treh.) y combinados trehalosa/sal (E.A.S./Treh/sal.) que contenían la enzima de soja humidificados a 11% H.R. luego de 35 días a 55°C.

Se observa claramente que la trehalosa se encontraba en estado amorfo (no cristalino). Solo se detecta un cambio en la línea de base correspondiente a la  $T_g$  del sistema.

#### IV.B.3.1 Cristalización del azúcar en los sistemas liofilizados trehalosa/sal.

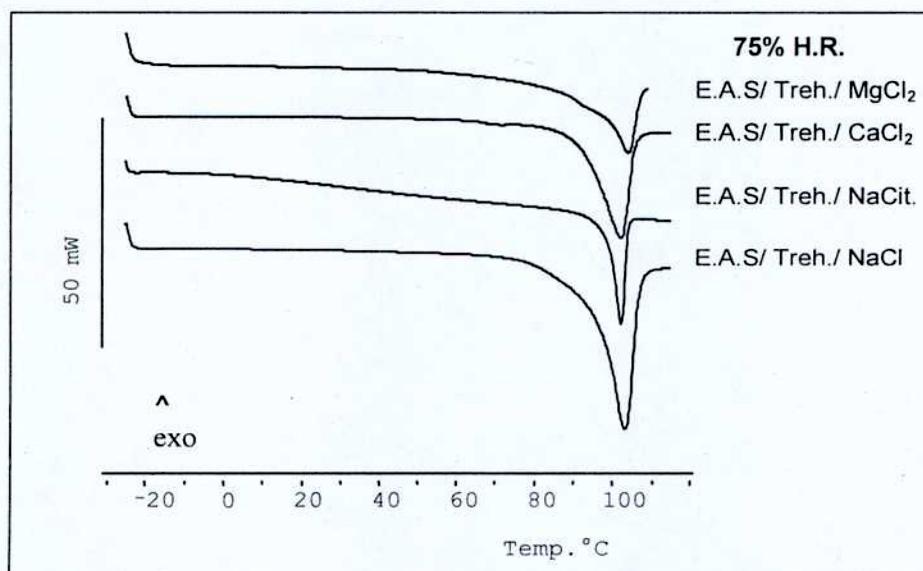
En la Figura IV.B.12 y 13 se comparan los termogramas obtenidos por DSC para los sistemas que contenían la GOT/AST de soja con trehalosa (E.A.S./Treh.) y trehalosa/sal (E.A.S./Treh./sal) humidificados a 44% y 75% H.R. luego de completado el ensayo (35 días a 55°C). En estas condiciones la movilidad del sistema y la cantidad de agua son suficientes para que ocurra la cristalización de trehalosa.



**Figura IV.B.12.** Termogramas obtenidos por DSC para los sistemas (E.A.S.) liofilizados con trehalosa y combinados trehalosa/sal humidificados a 44% H.R. luego de 35 días a 55°C.

Los picos endotérmicos observados para cada sistema (por razones de claridad las curvas son desplazadas ligeramente en el eje vertical en la figura) coinciden con la temperatura correspondiente a la fusión del cristal dihidratado de trehalosa mostrado en la Figura IV.B.7. Las áreas de los mismos fueron cuantitativamente diferentes según la sal analizada y un pico atípico se observó especialmente para las muestras con trehalosa y  $\text{CaCl}_2$ . La formación de varios picos consecutivos de fusión ha sido observado en materiales que cristalizan en fracciones con distinta estabilidad (Srimoanon y col., 2003). La existencia de dos picos en presencia de cloruro de calcio podría indicar que hubo una cristalización inicial de trehalosa y una parcial recristalización posterior.

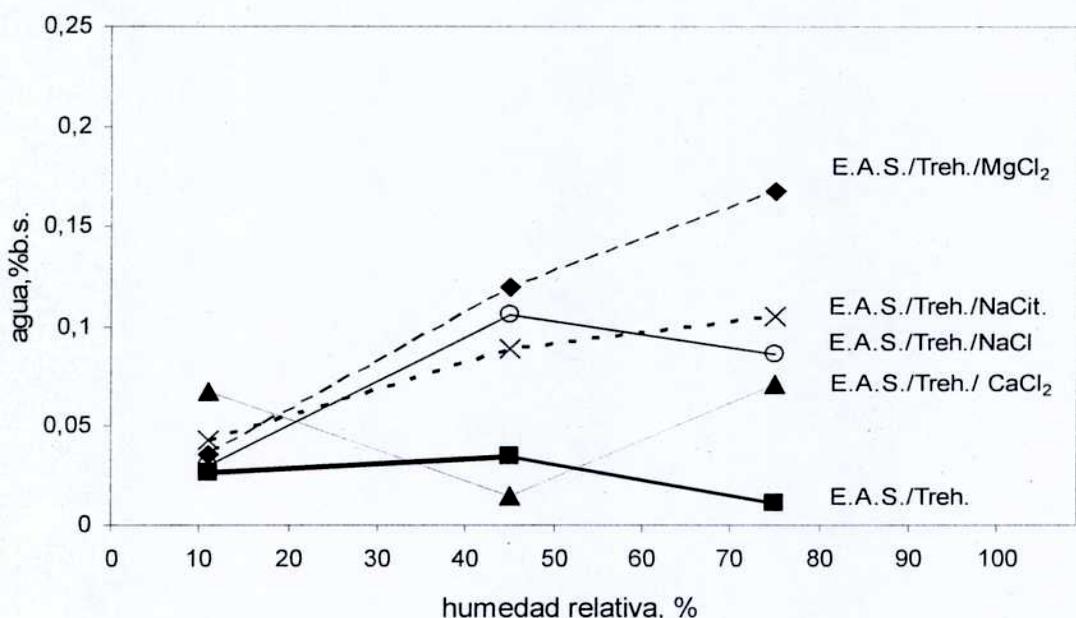
A mayor grado de humidificación de las muestras (75% de H.R.) se observaron también diferentes grados de cristalización de trehalosa en los distintos sistemas combinados (Figura IV.B.13).



**Figura IV.B.13.** Termogramas obtenidos por DSC para los sistemas (E.A.S.) liofilizados con trehalosa y combinados trehalosa/sal humidificados a 75% H.R.. luego de 35 días a 55°C.

#### IV.B.3.2. Adsorción de agua en sistemas liofilizados trehalosa/sal.

Se analizó el efecto de la presencia de las distintas sales sobre el contenido de agua final de los sistemas (III.D). En la Figura IV.B.14 se compara el contenido acuoso (expresado en base seca) del sistema con trehalosa y de los combinados trehalosa/sal expuestos a las humedades relativas ensayadas (11, 44 y 75% H.R.)



**Figura IV.B.14.** Adsorción de agua a 20°C para los sistemas con trehalosa (E.A.S/Treh.) y combinados trehalosa/sal en proporciones molares R=5 (E.A.S/Treh/sal.), que contenían las enzimas de soja humidificados a 11, 44 y 75% H.R.

Se observó que en los sistemas combinados trehalosa/sal la retención de agua fue mayor con respecto al sistema sin sal (excepto para el cloruro de calcio) para todas las humedades relativas estudiadas. En los sistemas contenido trehalosa sola se puede ver una curva chata porque a 45% de H.R. cristaliza como dihidrato y el contenido de agua se

mantiene relativamente constante. Se sabe que las interacciones de los iones con las moléculas de agua y/o con los azúcares modifican los ambientes de baja disponibilidad de agua (Santagapita y Buera, 2006; Elmonsef y Yrjó; 2004). Las curvas de las muestras con trehalosa combinadas con cloruro de magnesio y citrato de sodio mostraron una relación directamente proporcional con la humedad ambiente y no se observa pérdida de contenido de agua por cristalización masiva

Estos resultados coinciden con los eventos térmicos observados por DSC en el presente trabajo (Figuras IV.B.12 y 13). Es interesante destacar que las sales que proporcionaron mayor estabilidad a la enzima GOT/AST son las inhibieron o retrasaron la cristalización del azúcar y determinan la cantidad de agua del sistema.

La Tabla IV.B.2 resume los valores de temperatura de transición vítrea, área del pico endotérmico de fusión, fracción de trehalosa cristalizada (calculada a partir de la entalpía de fusión ( $\Delta H_f$ ) para cada sistema) obtenidos a partir de los termogramas de las Figuras IV.B.12 y 13 y fracción de agua asociada a la fase amorfa ( $W_A$ ) calculada empleando la ecuación III.1 para los sistemas liofilizados con trehalosa y trehalosa/sal que contenían las enzimas de soja humidificados a 44 y 75% H.R

**Tabla IV.B.2** . Valores experimentales de los eventos térmicos determinados por DSC para los extractos liofilizados con trehalosa (E.A.S/Treh.) y trehalosa/sal(E.A.S/Treh/sal). que contenían las enzimas de soja humidificados a 44% y 75% H.R. Sales:  $Na_3C_6H_5O_7$ ,  $NaCl$ ,  $CaCl_2$  y  $MgCl_2$ . Treh. = Trehalosa 20%. ( $\Delta H_f$  en J.g.-1). A = ausente.

muestra	H.R. %	Termogramas			Fracción cristalina, %	T-Tg	W <sub>T</sub>	W <sub>A</sub>
		Tg <sub>1</sub> (°C) onset	Fusión $\Delta H_f$					
EAS/Treh.	44	23	115,4	0,83	32	0,03	0	
EAS/Treh/ $MgCl_2$	44	A	63.00	0,45	-	0,10	0,143	
	75	-23	65.29	0,46	78	0,15	0,240	
EAS/Treh./ NaCit.	44	A	88,83	0,64	-	0,10	0,090	
	75	-22	99	0,71	77	0,10	0,089	
EAS/Treh./ $NaCl$ .	44	A	101	0,72	-	0,10	0,115	
	75	A	104	0,75	-	0,08	0,012	
EAS /Treh. / $CaCl_2$	44	A	151,8	1,09	-	0,07	0,015	
	75	A	83.19	0,60	-	0,07	0,052	

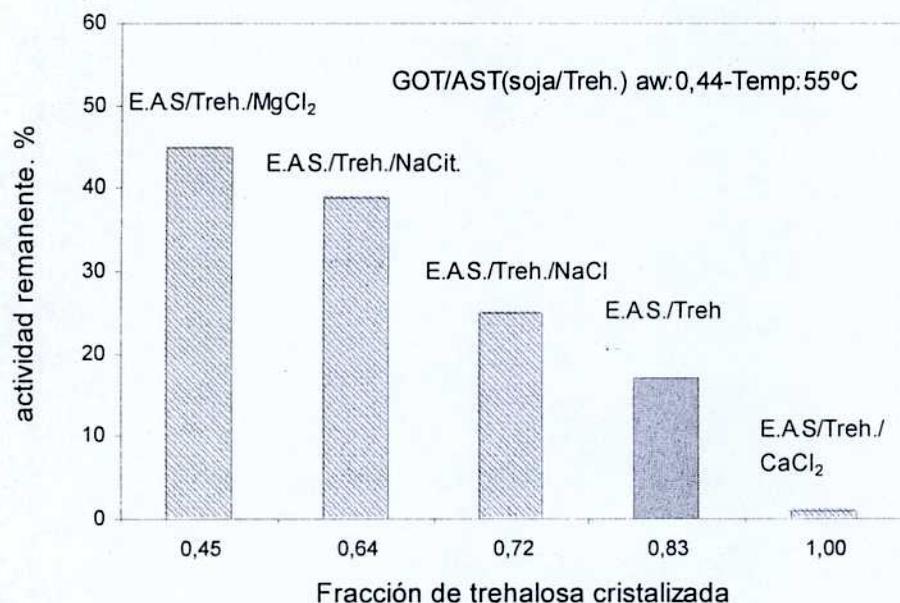
W<sub>T</sub>: fracción en masa de agua total

W<sub>A</sub> fracción en masa de agua de la fase amorf

Como se vio en estudios previos (Mazzobre y col., 2001; Longinotti y col., 2002, Santagapita y Buera, 2006), el grado de cristalización de azúcar varió de acuerdo a la presencia y/o tipo de sal empleada, y algunas sales como NaCit,  $MgCl_2$ ,  $NaCl$  retrasaron o inhibieron la cristalización del azúcar La inhibición de la cristalización de trehalosa fue mayor en presencia de  $MgCl_2$  y se incrementó la retención de agua en la fase amorf (Santagapita y Buera; 2006). La existencia de agua residual para las enzimas liofilizadas

sería importante para hidratar la estructura proteica y estabilizar la actividad a largos tiempos (Kiyoshi y col.; 2004).

Para visualizar claramente los efectos de los cambios de la estabilidad física sobre la estabilidad enzimática, en la Figura IV.B.15 se muestra la relación entre la actividad remanente de la enzima GOT/AST de soja y la fracción de trehalosa cristalizada en el sistema con trehalosa y combinados trehalosa/sal, humidificados a 44 % H.R. luego de 35 días de almacenamiento a 55°C.



**Figura IV.B.15.** Relación entre la fracción de trehalosa cristalizada en los sistemas liofilizados con trehalosa (E.A.S./Treh.) y combinados trehalosa/sales ( $R=5$ ) (E.A.S/Treh./sal) humidificados a 44% H.R. y la actividad remanente de GOT/AST luego de 35 días de almacenamiento a 55°C..

Debe notarse que mientras la cristalización del azúcar se incrementó, la actividad enzimática remanente decreció. Este efecto fue mayor en la matriz adicionada con  $\text{CaCl}_2$

donde la pérdida del efecto protector de la trehalosa (observada en la Figura IV.B.10) puede ser atribuida a la cristalización total del azúcar (Figura IV.B.12). La incorporación de las sales (NaCit y MgCl<sub>2</sub>), que provocaron cambios estructurales en la matriz del sistema (retrasaron o inhibieron la cristalización del azúcar) también afectó la estabilidad de la enzima (retrasó la inactivación), cuando los sistemas fueron humidificados a 44% de H.R.

Por otro lado, la adición las sales en sistemas biológicos y alimentos determinan cambios en la estructura de las moléculas de agua que los rodean y en la esfera de hidratación de las proteínas. Como se ha discutido anteriormente, los iones citrato y Mg<sup>+2</sup> conocidos como agentes de estructura o cosmotrópicos imponen un orden local fortaleciendo las uniones de hidrógeno entre las moléculas de agua, aumenta la viscosidad de las soluciones acuosas, se espera que ocurra una fuerte dispersión de las interacciones con interfaces y estabilizan proteínas (Nickolov y Miller, 2005).

Los resultados muestran que la capacidad protectora no sólo dependió de las propiedades de vitrificación de la matriz sino también de la estabilidad química del azúcar (Murray y Liang, 2000, Allison y col., 1999) y de las interacciones que las sales puedan establecer con el entorno molecular, cuando estas están presentes como ingredientes o aditivos. (Lo Nostro y col., 2005; Calligaris y Nicoli, 2006).

## **V.CONCLUSIONES**

## **V. CONCLUSIONES GENERALES**

El conocimiento de la estabilidad de enzimas y alimentos con matrices amorfas, tiene gran importancia práctica en biotecnología y procesamiento de alimentos. La conservación de las estructuras metaestables en sistemas deshidratados o congelados es un factor crítico para la recuperación de la funcionalidad o actividad de las biomoléculas. En el presente trabajo se analizó la dependencia de la actividad enzimática con la formación de hielo en los sistemas congelados y la cristalización de azúcares en sistemas deshidratados, obteniéndose las siguientes conclusiones:

- Las enzimas amilasa en miel diluida y aspartato amino transferasa en el extracto de la semilla de soja, se desnaturizaron fácilmente cuando fueron almacenadas en estado congelado y deshidratado. Su naturaleza lábil permitió evaluar el efecto del agregado de trehalosa y de soluciones salinas.
- El disacárido trehalosa fue efectivo para preservar la actividad de ambas enzimas. La estabilidad enzimática se vio afectada por la cantidad de hielo formado y por la cristalización del azúcar en los sistemas congelados y liofilizados respectivamente.

- En **sistemas congelados**, la acción crioprotectora se relacionó con el contenido de sólidos del sistema. El agregado del azúcar trehalosa estabilizaría la estructura de las proteínas al disminuir la cantidad de agua congelada, cuya interfase actuaría como vector de estrés. Se podría concluir que en sistemas congelados, se lograría una protección eficaz de la enzima amilasa en miel con un nivel de 40% de sólidos, mientras que para la enzima GOT/AST de la semilla de soja, sería con 20% de trehalosa.

La cantidad de agua congelada no sería el único factor a considerar en la estabilización enzimática cuando las sales están presentes en las matrices con trehalosa. Los mecanismos de estabilización por presencia de sales serían diferentes a los discutidos por el agregado de trehalosa. En presencia de sales, las matrices que contenían sólo los azúcares de la miel y que tenían citrato de sodio mostraron una marcada estabilización de la actividad y se ha demostrado que esto sería independiente del contenido de sólidos. En los sistemas congelados no se encontró una combinación de concentración de miel - trehalosa - sal que produzca sinergismo en la capacidad para proteger las enzimas estudiadas.

En el presente trabajo, la variación de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) no resultó ser un buen parámetro para evaluar la estabilidad enzimática en los sistemas de miel puros o modificados, ya que no correlacionó con los cambios de composición y no representó las interacciones intermoleculares. En cambio, los valores de capacidad calorífica ( $\Delta C_p$ ) mostraron una relación proporcional con los sólidos del sistema, los cuales fueron críticos para la conservación de actividad enzimática.

- En los **sistemas deshidratados** re-humidificados, los resultados obtenidos confirman que la capacidad protectora no depende sólo de las propiedades de vitrificación de la matriz sino también de la estabilidad química del azúcar y de mecanismos de protección dependientes del tipo de proteína y de las interacciones que ésta pueda establecer con el azúcar.

Es interesante destacar que en sistemas deshidratados las sales que proporcionaron mayor estabilidad a la enzima GOT/AST son las que inhibieron o retrasaron la cristalización del azúcar.

En las muestras liofilizadas humidificadas a 44%H.R. se observó un efecto sinérgico entre el azúcar y ciertas sales (citrato de sodio y cloruro de magnesio) que afectó positivamente la estabilidad de la enzima GOT/AST (sección IV.B.II). Este efecto no se manifestó en las muestras congeladas a -26°C (sección IV.A.III).

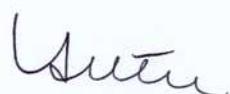
- El **efecto de las sales** sobre la cinética de cristalización de hielo en los sistemas congelados o de azúcar en los sistemas liofilizados en relación con la actividad enzimática, parece depender de la magnitud con que las sales o los azúcares rompen la red tetraédrica de enlaces por puente de hidrógeno del agua.

En ambientes de contenido de agua restringido, tales como los sistemas congelados o deshidratados analizados en el presente trabajo, la cantidad de agua determina la cinética de los cambios de fase y de la inactivación enzimática. De esta forma, el tipo de interacción agua-ión se manifiesta en dichos cambios dinámicos, y la llamada serie de Hofmeister ofrece una amplia posibilidad para ayudar en su descripción.

Las sales afectaron los diagramas de fase de los preparados enzimáticos y modificaron la cinética de cristalización de azúcar y de agua, influyendo además sobre la estabilidad enzimática.

- La localización de los sistemas estudiados en los diagramas de estado suplementados ayuda a interpretar los procesos dinámicos y a relacionar los cambios en el estado físico de los materiales con la pérdida de funcionalidad de las enzimas.

Los resultados obtenidos pueden ser usados para desarrollar matrices protectoras teniendo en cuenta la variabilidad natural de las fuentes de enzimas. Esto tendría significado práctico para la conservación de aditivos, ingredientes o alimentos que contengan enzimas durante el congelamiento o su deshidratación.



## **VI. BIBLIOGRAFÍA**

- Ablett, S.; Drake, A.; Izzard, M. y Lillford, P., 1992. Differential Scanning Calorimetric Study of Frozen Sucrose and Glycerol Solutions. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 88: 789.
- Ablett, S.; Drake, A.; Izzard, M. y Lillford, P., 1993. Studies of the glass transition in malto-oligomers. Cap. 9. En: "The Glassy State in Foods", pp. 189-206, J.M. Blanshard y P.J. Lillford (Ed.), Nottingham University Press, Loughborough.
- Acevedo, N., Schebor, C. y Buera, M. P., 2006, Water-solids interactions, matrix structural properties and the rate of non-enzymatic browning, *J. Food Eng.* in press.
- Allison, S.D.; Chang, B.; Randolph, T.W. y Carpenter, J.F., 1999. Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 365(2): 289-298.
- Amador, E., and Wacker, W., 1962, Serum Glutamic Oxalacetic Transaminase Activity. A New Modification and an Analytical Assessment of Current Assay Technics *Clin Chem* 8:343.
- Analytica-EBC: Analytica European Brewery Convention 5th Edition, 1998. Fachverlang Hans Carl Publishers GmbH&Co KG, Nurnberg, Germany.
- Angell, C.A.; Bressel, R.D.; Green, J.L.; Kanno, H.; Oguni, M. y Sare, E.J., 1994. Liquid fragility and the glass transition in water and aqueous solutions. *Journal of. Food Eng.*, 22: 115-142.
- Angyal, S.J., 1973. Complex formation between sugars and metal ions. *Pure. Appl. Chem.*, 35: 131-146.
- Arakawa, T. y Timasheff, S.N., 1982.a Preferential interactions of proteins structure by sugars. *Biochemistry*, 21: 6536-6544.
- Arakawa, T. y Timasheff, S.N., 1982.b Stabilization of proteins with salts in concentrated solutions. *Biochemistry*, 21: 6536-6544.
- Arakawa, T.:Bhat, R. y Timasheff, S.N., 1990. Why preferential hydration does not always stabilize the native structure of globular proteins. *Biochemistry*, 29: 1924-1931.
- Arakawa, T., Prestrelski, S.J., Kinney, W., and Carpenter, J. F., 1993, Factors affecting short term and long term stabilities of proteins, *Adv. Drug Delivery Rep.* 10:1.
- Babacan, S. y Rand, A., 2005. Purification of amylase from honey. *Journal of Food Science*, 70(6): 413-8.

- Babacan, S. y Rand, A., 2007. Characterization of honey amylase. *Journal of Food Science*, 72(1): 50-55.
- Babacan, S., Pivarnik, L. y Rand, A., 2002. Honey amylase activity and food starch degradation. *Journal of Food Science*, 67: 1625-30.
- Bewley, 1998 - Seeds Physiology of Development and Germination.2º Ed
- Buera, M.P., 2001. Specific properties of amorphous sugars in dehydrated systems. Several strategies to delay crystallization. III Congreso Iberoamericano de Tecnología de Alimentos, Valencia, España, 11-15 de marzo.
- Buera, M.P., Schebor, C. and Elizalde, B.E., 2005, Carbohydrate crystallization phenomena in dehydrated food and ingredient formulations. Involved factors, consequences and prevention, *J. Food Eng.* 67:157
- Burg, M.B., Kwon,E.D. y Peters,E.M., 1996. Glycerophosphocholine and betaine counteract the effect of urea effects on pyruvate kinase. *Kidney Int.Suppl.* 57:S100-S104.
- Burg, M.B., Peters, E.M.,Bohren, K.M. y Gabbay, K.H, 1999. Factors effecting counteraction by methylamines of urea effects on aldolase reductase. *Proc.Natl. Acad.Sci.USA.* 96:6517-6522.
- Burin, L.; Jouppila; K; Roos, J; Kansikas, J., and Buera P., 2004, Retention of  $\beta$ -galactosidase activity as related to Maillard reaction, lactose crystallization, collapse and glass transition in low moisture whey systems, *Int. Dairy Journal* 14:517.
- Burke, M., 1985. En: "Membranes, metabolism and dry organisms", pp. 358-363, A. Leopold, (Ed.), Cornell Univ. Press, Ithaca.
- Calligaris, S. and Nicoli, M.C., 2006, Effect of selected ions from lyotropic series on lipid oxidation rate. *Food Chem.* 94:130.
- Cardona, S.; Schebor, C.; Buera, M.; Karel, M. y Chirife, J., 1997. Thermal Stability of Invertase in reduced-moisture amorphous matrices in relation to glassy state and trehalose crystallization. *Journal of Food Science*, 62 (1): 105-112.
- Carpenter, J. F., Crowe, J. H., and Arakawa, T., 1986, Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in the frozen and dried states, *J. Dairy Sci.* 73:3627.

- Carpenter, J.F.; Crowe, L. y Crowe, J., 1987. Stabilization of phosphofructokinase with sugars during freeze drying: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. *Biochim. Biophys. Acta*, 923: 109-115.
- Carstensen , J.T. y Van Scoik K. 1990 Amorphous to Crystalline Transformation of Sucrose. *Pharm. Res.*, 7, 1278-1281.
- Castell, C.; Smith, B.; Neal, W., 1970. Effects of transition metal ions on extractable protein of fish muscles. *J.Fish. Res. Board Can.* 27: 701-714
- Champion, D.; Hervet, H.; Blond, G. y Simatos, D., 1995. Comparison between two methods to measure translational diffusion of a small molecule at subzero temperature. *J. Agric. Food. Chem.*, 43: 2887-2891.
- Chen, YH; Aull, JL y Bell, LN, 1999. Invertase storage stability and sucrose hydrolysis in solids as affected by water activity and glass transition. *J. Agric. Food. Chem.* 47:504-509
- Cioni, P.; Bramanti, E. y Strambini, G., 2005. Effects of Sucrose on the Internal Dynamics of Azurin. *Biophysical Journal* 88:4213-4222.
- Cocero, A. M. y Kokini, J.L., 1991. The study of the glass transition of glutenin using small amplitude oscillatory rheological measurements and differential scanning calorimetry. *J. Rheol.*, 35: 257-270.
- Cordella,C., Antinelli,J.F., Aurieres,C., Faucon, J.P., Cabrol-Bass, D., Sbirrazzuoli, N., 2002. Use of Differential Scanning Calorimetry (DSC) as a New Technique for Detection of Adulteration in Honeys. Study of Adulteration Effect on Honey Thermal Behavior. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50:203-208.
- Corti, H.R. 2001. Comunicación personal.
- Crowe, J.; Crowe, L. y Chapman, D., 1984a. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science*, 223: 701-703.
- Crowe, J.; Crowe, L. y Jackson, S., 1983. Preservation of structural and functional activity in lyophilized sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.*, 220: 477-484.
- Crowe, J.; Leslie, S. y Crowe, L., 1994. Is vitrification sufficient to preserve liposomes during freeze-drying?. *Cryobiology*, 31:355-366.
- Crowe, L.; Reid, D. y Crowe, J., 1996. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophysical journal*, 71: 2087-2093.

- De Cordt, S.; Vanhoof, K.; Hu, J.; Maesmans, G.; Hendrickx, M.; Tobbac, P., 1992. Thermo stability of soluble and immobilized  $\alpha$ -amylase from *B. licheniformis*. *Biotech. Bioeenger* 40:396-402.
- De Graaf, E.; Madeka, H.; Cocero, A. y Kokini, J., 1993. Determination of the effect of moisture on gliadin glass transition using mechanical spectrometry and differential scanning calorimetry. *Biotechnol. Prog.*, 9: 210-213.
- Devi, N.A. y Appu Rao, A.G., 1998. Effect of additives on kinetic thermal stability of polygalacturonase II from *Aspergillus carbonarius*: mechanism of stabilization by sucrose. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 3540-3545.
- Ding, S.P.; Fan, J.; Green, J.L.; Lu, Q.; Sanchez, E. y Angell, C.A., 1996. Vitrification of trehalose by water loss from its crystalline dihydrate. *Journal of thermal Analysis*, 47: 1391-1405.
- Duckworth, R., 1981. Solute mobility in relation to water content and water activity. En: "Water Activity: Influences on Food Quality", pp. 295-318, R. Rockland y G. Stewart (Eds.), Academic Press, New York.
- Duisberg H. y Hardorn H., 1966. Welche Anforderungen sind an Handelshonige zu stellen? Vorschläge auf Grund der Statistischen Auswertung von ca 1600 Honig-Analysen. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.* 57(5), 386-407.
- Espín, N. e Islam, M.N., 1998. Stabilization of papain from papaya peels. *Food Science and Technology International* 4:179-187.
- Faulkner, W.R. and King, J.W., 1970. In *Fundamentals of Clinical Chemistry*. Tietz , NW (ed.) W. B. Saunders Co. Philadelphia Chap 12: 718.
- Fennema, O., 2000. Water and Ice. En: "Food Chemistry", 3rd edition, Fennema, O. (Ed.), Marcel Dekker, New York.
- Fiels, P., Wahlstrand, B. y Somero, G., 2001. The interaction of solutes and temperature on A4-lactate dehydrogenase orthologs from warm-adapted and cold-adapted marine fishes. *Eur.J. Biochem.* 268:4497-4505.
- Fox, T. y Flory, P., 1950. Second-order transition temperatures and related properties of polystyrene. I. Influence of molecular weight. *J. Appl. Phys.* 21: 5581-591.
- Francois, M., 2004. *Biophysics and Biochemistry at Low Temperature*. Cambridge University Press, London.

- Franks, F., 1985. Biophysics and Biochemistry at Low Temperature. Cambridge University Press, London.
- Franks, F., 1993. Solid aqueous solutions. *Pure and Applied Chemistry*, 65: 2527-2537.
- Franks, F., 1994. Long term stabilization of biologicals. *Biotechnology*, 12: 253-256.
- Gabellieri, Edi and Strambini, Giovanni B., 2006. ANS Fluorescence Detects Widespread Perturbations of Protein Tertiary Structure in Ice. *Biophysical Journal* 90:3239-3245
- Gianfreda, L. y Scarfi, M.R., 1991. Enzyme stabilization: State of the art. *Molecular and cellular Biochemistry*, 100: 97-128.
- Goff, H. D., 1995. The use of thermal analysis in the development of a better understanding of frozen food stability. *Pure Appl. Chem.*, 67: 1801-1808.
- Green, J. y Angell, C., 1989. Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. *J. Phys. Chem.*, 93: 2880-2882.
- Greenspan, L., 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *J. of Res.*, 81(A): 89-96.
- Gregory, R.B., 1998. Protein hydration and glass transition. En: "The Properties of Water in Foods", ISOPOW 6. Reid, D.S. (Ed). University of California, Davis, USA.
- Hartel, R., 2001. Crystal growth. En: "Crystallization in Foods", G.V. Barbosa-Cánovas (Ed.), pp. 192-232, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.
- Hazen, K.; Bourgeois, L.; Carpenter, J., 1988. Cryoprotection of antibody by organic solutes and organic solute/divalent cation mixtures. *Arch. Biochem. Bophys.* 267, 363-371.
- Herr, L.M.; Deras, M. y Nail, S.L., 1995. Electrolyte-induced changes in glass transition temperatures of freeze-concentrated solutes. *Pharm. Res.*, 12(5): 768-772.
- Izutsu, K.; Yoshioka, S. y Kogima, S., 1995. Increased stabilizing effects of amphiphilic excipients on freeze-drying of lactate dehydrogenase (LDH) by dispersion into sugar matrices. *Pharmaceutical Research.*, 12(6): 838-843.
- Jouppila, K., 1999. Crystallization of amorphous carbohydrates: studies on lactose and starch. Tesis de Doctorado, Helsinki, Finlandia.
- Kajiwara, K. y Imai, T., 2004, Examination of sugars as excipients resistant of humidity. IX International Symposium on the Properties of Water. Argentina. Mar del Plata. Sep.:25-30

- Kalichevsky, M.; Blanshard, J.y Marsh, R. D. L., 1993. Applications of mechanical spectroscopy to the study of glass biopolymers and related systems. En: "The Glassy State of Foods", pp. 133-156, J. Blanshard; P., Lillford, (Eds.), Nottingham University Press, England.
- Kalichevsky, M.T.; Jaroskiewicz, E.M.; Ablett, S.; Blanshard, J.M. y Lillford, P.J., 1992. The glass transition of amylopectin measured by DSC and NMR. *Carbohydr. Polymers*, 18: 77-88.
- Kantor, Z.; Pitsi, G. y Thoen, J. J., 1999. Glass Transition Temperature Of Honey As A Function Of Water Activity As Determined By Differential Scanning Calorimetry, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47:2327-2330.
- Karel, M. y Saguy, I., 1991. Effects of water in food systems. En: "Water Relationships in Foods", pp 157-174, Levine, H., Slade, L. (Eds.), Plenum Press, New York,.
- Karmas, R., 1994. The effect of glass transition on non-enzymatic browning in dehydrated food systems. Doctor Philosophy Thesis, Rutgers University of New Jersey, New Brunswick, New Jersey, U.S.A..
- Kaushik, K. y Bhat, R., 2003. Why Is Trehalose an Exceptional Protein Stabilizer? *Journal of Biological Chemistry* .Vol 278 (29), 26458- 26465.
- Kerr, W.L, Lim, M.H., and Reid, D.S., 1993, Chemical kinetics in relation to glass transition temperature in frozen food polymers solutions, *Journal of Food Science and Agriculture* 61:512.
- Kerr, W.L. and Reid, D.S., 1994, Temperature dependence of the viscosity of sugar and maltodextrin solutions in coexistence with ice, *Lebensm. Wiss. U-Technol.* 27:225.
- Khan, A., 1989. The role of calcium ions and heat on the activity of amylase solutions. American Chemical Society National Meetting. Miami. Florida. Sep.:10-15.
- Kiyoshi, K.; Tomoaki,H.; Riko, T. y Toru,S., 2004. The role of residual water for the stability of protein freeze-dried with trehalose. IX International Symposium on the Properties of Water. Argentina. Mar del Plata. Sep.:25-3
- Kodama, S. y Susuki, T., 1995. Highly Sensitive Method for Urea Detection in Wine. *Journal of Food Science*.60:1097-1109.
- Kristjánsson, M. y Kinsella, J., 1991. Protein and enzyme stability: Structural, thermodynamic, and experimental aspects. *Adv. Food Nutr Res.*, 35: 237-316.

- Le Meste, M., 1995. Mobility of small molecules in low and intermediate moisture foods. En: "Food Preservation by Moisture Control", pp. 209-225, G.V. Barbosa-Canovas y J. Welti-Chanes, (Eds.), Technomic, Lancaster, PA.
- Le Meste, M.; Voilley, A. y Colas, B., 1991. Influence of water on the mobility of small molecules dispersed in a polymeric system. En: "Water Relationships in Foods", pp. 123-138, Levine, H. y Slade, L. (Eds.), Plenum Press, New York.
- Lecker, D.N. and Khan, A., 1998. Model for inactivation of  $\alpha$ -amylase in the presence of salts: theoretical and experimental studies, *Biotechnol. Prog.* 14:621.
- Lee, C. y Timasheff, S.N., 1981. The stabilization of proteins by sucrose. *J. Biol. Chem.* 256: 7193-7201.
- Lehninger, A., 1973. Bioquímica. Cap.6. Omega, Barcelona. ISBN 84282-0211-7
- Leontidis, 2006. Hofmeister anion effects on surfactant self assembly and the formation of mesoporous solids. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7:8.
- Leslie, S.; Israeli, B.; Lighthart, J.; Crowe, J. y Crowe, L., 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 3592-3597.
- Levine, H. y Slade, L., 1986. Polymer physico-chemical approach to the study of commercial starch hydrolysis products. *Carbohydr. Polym.*, 6: 213-244.
- Levine, H. y Slade, L., 1988. "Collapse" phenomena a unifying concept for interpreting the behaviour of low moisture foods. Cap 9. En: "Food Structure – Its Creation and Evaluation", pp. 149-180, J. M. Blanshard y J. R. Mitchell (Ed.), Butterworths, London.
- Levine, H. y Slade, L., 1989. Response to the letter by Simatos, Blond and Le Meste on the relation between glass transition and stability of a frozen product. *Cryo-Letters*, 10: 347-370.
- Levine, H. y Slade, L., 1990. Influences of the glassy and rubbery states on the thermal, mechanical; and structural properties of doughs and baked products. Cap. 5. En: "Dough Rheology and Baked Products Texture", pp. 157-330, H. Faridi y J.M. Faubion, (Ed.), AVI, New York.
- Levine, H. y Slade, L., 1991. A food polymer science approach to structure property relationship in aqueous food systems: non-equilibrium behavior of carbohydrate-

- water systems. En: "Water relationships of foods", pp. 29-101, H. Levine y L. Slade (Eds.), Plenum Press, N.Y.
- Levine, H. y Slade, L., 1992a. Another view of trehalose for drying and stabilizing biological materials. *Biopharm.*, 5: 36-40.
- Levine, H., y Slade, L., 1988. Thermomechanical properties of small carbohydrate-water glasses and "rubbers", *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 84:2619.
- Levitzky A. y Ssteer, M.L. 1971. *J. Biochemistry* 41,171
- Lim, M.H. y Reid, D.S., 1991. Studies of reaction kinetics in relation to the Tg of polymers in frozen model systems. En: "Water Relationships in Foods", pp. 103-122, Levine, H. y Slade, L. (Eds.), Plenum Press, New York.,
- Lo Nstro, P., Ningham, B.W., Lo Nstro, A., Pesavento, G., Fratoni, L y Baglioni, P., 2004. Specifics ion effect on the growth rates of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Phys. Biol.* 2:1-7.
- Longinotti, M.P., Mazzobre, M.F., Buera, M.P., and Corti, H.R., 2002. Effect of salts on the properties of aqueous sugar systems, in relation to biomaterial stabilization. 2. Sugar crystallization rate and electrical conductivity behaviour, *Phys. Chem.* 4:533.
- Lupano, C.E., 1997. DSC study of Money granulation stored at various emperatures. *Food Research Internacional*, Vol.30, Nº 9:683-688.
- Luyet, B. y Rasmussen, D., 1968. Study by differential thermal analysis of the temperatures of instability of rapidly cooled solutions of glicerol, ethylene glycol, sucrose, and glucose. *Biodynamica*, 10: 167-91.
- MacDonald, G. y Lanier, T., 1991. Carbohydrates as Cryoprotectats for Meats and Surimi. *Food Technology* . 150- 159.
- Manning, M.C.; Patel, K. y Borchardt, R.T., 1989. Stability of protein pharmaceuticals. *Pharm. Res.*, 6: 903-918.
- Mazzobre, MF. 2001. Propiedades de no equilibrio en sistemas vítreos y sobreenfriados en relación con la estabilidad enzimática. Tesis de Doctorado, UBA, Bs.As.
- Mazzobre, M.F. y Buera, M.P., 1999, Combined effects of trehalose and cations on the thermal resistance of -galactosidase in freeze-dried systems, *Bioch. et Bioph. Acta* 1473:337.

- Mazzobre, MF; Hough, G y Buera, MP., 2003. Phase transitions and functionality of enzymes and yeasts in dehydrated matrices. *Food Science and Technology International*9: 163-172
- Mazzobre, M.F., Longinotti, M.P; Buera, M.P. and Corti, H.R., 2001, Effect of salts on the properties of aqueous sugar systems, in relation to biomaterial stabilization. 1. Water sorption behaviour and ice crystallization/melting, *Cryobiology* 43:199.
- Mazzobre, María Florencia; Santagapita, Patricio R.; Gutiérrez, Nora y Buera, María del Pilar. Consequences of matrix structural changes on chemical and functional stability of enzymes as affected by electrolytes". *Journal of Food Engineering* (2006).
- Miller, D.P., Anderson, R.E., and de Pablo, J.J. 1998. Stabilization of lactate dehydrogenase following freeze-thawing and vacuum-drying in the presence of trehalose and borate. *Pharm. Res.*, 15(8): 1215-1221.
- Miller, D.P., de Pablo, J.J. y Corti, H.R. 1997. Thermophysical properties of trehalose and its concentrated aqueous solutions. *Pharm. Res.*, 14(5): 578-590.
- Miller, D.P.; Conrad, P.B.; Fucito, S.; Corti, H.R. y de Pablo, J.J., 2000. Electrical conductivity of supercooled aqueous mixtures of trehalose with sodium chloride. *J.Phys.Chem.B*, 104: 10419-10425.
- Miller, P., de Pablo, J., and Corti, H. R., 1999, Viscosity and glass transition temperature of aqueous mixtures of trehalose with borax and sodium chloride, *Journal of Physical Chemistry B* 103:344.
- Montiel, P.O. 1998. Profiles of soluble carbohydrates and their adaptative role in maritime Antarctic terrestrial arthropods. *Polar Biol.* 19: 250-256.
- Morel-Desrosier, N., Lhermet, C. y Morel, J.P., 1991. Interactions between cations and sugars. Part 6. Calorimetric method for simultaneous determination of the stability constant and enthalpy change for weak complexation. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 87(14): 2173-2177.
- Mouradian, R.; Womersley, C.; Crowe, L. y Crowe, J., 1984. Preservation of functional activity during long-term storage of a biological membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 778: 615-617.

- Mozhaev, VV; Martinek, KK. ,1982. Inactivation and reactivation of proteins (enzymes). *Enzyme and Microbial Technology*. 4:299-309
- Mozhaev, V.V., 1993. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. *Tibtech.*, 11: 88-95.
- Mozhaev, V.V.; Melik-Nubarov, N.S.; Segreeva, M.V.; Siksnis, V. y Martinek, K., 1990. Strategy for stabilizing enzymes. Part one: Increasing stability of enzymes via their multi-point interaction with a support. *Biocatalysis*, 3: 179-187.
- Murray, B.S. y Liang, H.J., 2000. Evidence for conformational stabilization of  $\beta$ -lactoglobulin when dried with trehalose. *Langmuir*, 16: 6061-6063.
- Natelson S, Scott ML, Beffa C., 1951, A rapid method for the estimation of urea in biologic fluids, *Am. J. Clin. Pathol.* 21:275.
- Nickolov, Z.S. y Miller, J.D, 2005. Water structure in aqueous solutions of alkali halide salts: FTIR spectroscopy of the OD stretching band. *Journal of Colloid and Interface Science* 287: 572-580.
- Noguchi, S.,1974. The control of denaturation of fish muscle proteins during frozen storage. D.Sc. Tesis, Sophia University, Tokio.
- Noguchi, S.; Matsumoto, J., 1970. Studies on the control of the denaturation of the fish muscle proteins during frozen storage-I. Preventive effect of Na-glutamate. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 36:1078-1087.
- Okada, M., 1963. Elastic property of kamaboko (fish meat jelly). *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.* 122-126.
- Parker, R. y Ring, S.G., 1995. A theoretical analysis of diffusion-controlled reactions in frozen solutions. *Cryoletters*, 16: 197-208.
- Patist, A. and Zoerb, H., 2005. Preservation mechanisms of trehalose in foods and biosystems, *Colloids and surfaces. B. Biointerfaces*. 40:107.
- Pikal, M.J., 1999, Mechanisms of protein stabilization during freeze-drying and storage: the relative importance of thermodynamic stabilization and glassy state relaxation dynamics. In *Freeze drying /lyophilization of Pharmaceutical and biological products*, L. Rey and J.C. May (eds.), Mrcel Dekker, Inc., New York, pp. 161-198.

- Prestrelski, S.J.; Pikal, K.A. y Arakawa, T., 1995. Optimization of lyophilization conditions for recombinant human interleukin-2 by dried-state conformational analysis using fourier-transform infrared spectroscopy. *Pharm. Res.*, 12: 1250-1259.
- Prestrelski, S.J.; Tedeschi, N.; Arakawa, T. y Carpenter, J., 1993. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys. J.*, 65: 661-671.
- Privalov, P.L., 1990, Cold denaturation of proteins, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25:281.
- Rahman,M.S., 2006. State diagram of foods: Its potential use in food processing and product stability. *Trends in Food Science & Technology* 17:129-141.
- Redfern, J. P., 1991. Polymer studies by simultaneous thermal analysis techniques. *Polym. Int.* 26(1), 51-58.
- Rinaudo, M.,: Ponzetto, C.; Vidano, C.; Marletto, F., 1973. The origin of honey amylase. *Comp. Biochem. Physiol.* 46B:253-6
- Romero,M.V. y Barret, D.M., 1997. Rapad Method for Lipoxygenase Assay in Sweeet Corn. *Journal of Food Science* 62-4:696-700.
- Roos, Y. y Karel, M., 1990. Differential scanning calorimetry study of phase transitions affecting the quality of dehydrated materials. *Biotechnology Progress*, 6: 59-163.
- Roos, Y. y Karel, M., 1991a. Plasticizing effect of water on thermal behavior and crystallization of amorphous food models. *J. Food Sci.*, 34: 324-329.
- Roos, Y. y Karel, M., 1991b. Phase transitions of mixtures of amorphous polysaccharides and sugars. *Biotechnol. Prog.*, 7: 49-53.
- Roos, Y. y Karel, M., 1991c. Water and molecular weight effects on glass transitions in amorphous carbohydrates and carbohydrate solutions. *J. Food Sci.*, 55(6): 1676-1681.
- Roos, Y. y Karel, M.. 1991d. Nonequilibrium ice formation in carbohydrate solutions. *Cryo-letters*, 12: 367-376.
- Roos, Y. y Karel, M.. 1991e. Amorphous state and delayed ice formation in sucrose solutions. *International Journal of Food Science and Technology*. 26: 553-566.
- Roos, Y. y Karel, M.. 1991f. Applying state diagrams to food processing and development. *Food Technology*, 45: 66-71.

- Roos, Y. y Karel, M.. 1992. Crystallization of amorphous lactose. *Journal of Food Science*, 57: 775-777.
- Roos, Y., 1987. Effect of moisture on the thermal behavior of strawberries studied using differential scanning calorimetry. *J. Food Sci.*, 52: 146-149.
- Roos, Y., 1992. Reaction kinetics and thermodynamics in food systems; Part II, Phase transitions and transformations. En: "Handbook of Food Engineering", Lund, D. y Heldman, D. (Eds.), Marcel Dekker, New York.
- Roos, Y., 1993. Melting and glass transitions of low-molecular weight carbohydrates. *Carbohydrate Res.*, 238: 39-48.
- Roos, Y., 1995. Phase Transitions in Foods. Cap. 2, 5 y 7. S., Taylor (Ed.), Academic Press, Inc., New York.
- Roos, Y.; Jouppila, K. y Zielasko, B., 1996a. Nonenzymatic browning-induced water plasticization: Glass transition temperature depression and reaction kinetics determination using differential scanning calorimetry. *J. Thermal Anal.*, 47: 1437-1450.
- Roser, B., 1991. Trehalose drying: a novel replacement for freeze-drying. *BioPharm*, 4: 47-53.
- Rubin, C.E., Wasylky, J.M., and Baust, J.G., 1990. Investigation of vitrification by nuclear magnetic resonance and differential magnetic resonance and differential scanning calorimetry in honey and model carbohydrate systems, *J. Ag. Food Chem.* 38:1824.
- Sallinen, J.y Roos Y., 1988. Freeze concentration and glass transition effects on enzyme kinetics in frozen food models. En: "The Properties of Water in Foods", ISOPOW 7.
- Santagapita, P.R., and Buera, M.P., 2006, Trehalose -Water- Salt Interactions related to the stability of  $\beta$ -galactosidase in supercooled media, *Enzyme and Microbial Technology*, submitted.
- Schebor, C.; Buera, M.P. y Chirife, J., 1996. Glassy state in relation to the thermal inactivation of the enzyme invertase in amorphous dried matrices of trehalose, maltodextrin and PVP. *J. Food Engn.*, 30: 269-282.
- Shafizadeh, F. y Susott, R.A. 1973. Crystalline transitions of carbohydrates. *J. Org. Chem.* 28, 3710-3715.

- Shalaev, E.; Franks, F., 1995. Structural Glass Transitions and Thermophysical Processes in Amorphous Carbohydrates and Their Supersaturated Solutions. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 91: 1511.
- Simatos, D. y Blond, G., 1991. DSC studies and the stability of frozen foods. En: "Water Relationships in Foods", pp. 139-155, H. Levine and L. Slade (Eds.), Plenum Press, New York.
- Simatos, D., 1993. In "The Glassy State in Foods". Blanshard, J. ; Killford, P. (Eds.), Nottingham University Press, p. 395.
- Slade, L. y Levine, H., 1987. Structural stability of intermediate moisture foods - a new understanding. En: "Food Structure – Its Creation and Evaluation", pp. 115-147, J.R. Mitchell & J.M.V. Blanshard (Eds.), Butterworths, London.
- Slade, L. y Levine, H., 1991. Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 30: 115-360.
- Slade, L. y Levine, H., 1993. Water and the glass transition-Dependence of the glass transition on composition and chemical structure: special implication for flour functionality in cookie baking. En: "Water in Foods: Fundamental Aspects and their Significance in the Processing of Foods". Proceedings of ISOPOW-V. Simatos, D. (Ed.) Elsevier Applied Science, London.
- Slade, L., Levine, H y Finley, J., 1989. Protein-water interactions: water as a plasticizer of gluten and other protein polymers. En: "Protein Quality and the Effects of Processing", pp. 9-124, Dixon Phillips, R. y Finley, J. (Eds.), Marcel Dekker, New York.
- Sperling, L.H., 1986. En: "Introduction to Physical Polymer Science", pp, 224-295, John Wiley & Sons, New York.
- Sperling, L.H., 1992. En: "Introduction to Physical Polymer Science", 2nd edition, John Wiley & Sons, New York.
- Srimoaon, P., Dangseeyun, N. y Supaphol, P. 2004. Multiple melting behavior in isothermally crystallized poly(trimethylene terephthalate). *European Polymer Journal* .40:599-608.

- Strambini, G.B. y Gabellieri, E., 1996. Proteins in frozen solution evidence of ice-induced partial unfolding. *Biophysical Journal* 70:971-976.
- Sun, W. y Leopold, A., 1994a. Glassy state and seed storage stability: a viability equation analysis. *Annals of Botany*, 74: 601-604.
- Sun, W. y Leopold, A., 1994b. The role of sugar vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. *Physiol. Plant*, 90: 621-628.
- Sun, W. y Leopold, A., 1997. Cytoplasmic vitrification and survival of anhydrobiotic organisms. *Comp. Biochem. Physiol.* 117A: 327-333.
- Sun, W.Q. y Davidson, P., 1998. Protein inactivation in amorphous sucrose and trehalose matrices: Effects of phase separation and crystallization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1425: 235-244.
- Sussich, F., Urbani, R., Princivalle, F. y Cesaro, A., 1998. *J. Am. Chem. Soc.*, 120: 7893-7899.
- Suzuki, T.; Imamura, K.; Yamamoto, K.; Satoh, T. y Okazaki, M., 1997. Thermal stabilization of freeze-dried enzymes by sugars. *J. Chem. Eng. of Japan.*, 30: 609-613.
- Tamiya T, Okahashi N, Sakuma R, Aoyama T, Akahane T, Matsumoto JJ.,1985. Freeze denaturation of enzymes and its prevention with additives. *Cryobiology*. Oct;22(5):446-56.
- Tanaka, K., Tadaka, T. y Miyajima, K., 1991. Cryoprotective effect of saccharides on denaturation of catalase by freeze-drying. *Chem. Phar. Bull.*, 39: 1091-1094.
- Taylor, L.S. y York, P., 1998. Characterization of the phase transitions of trehalose dihydrate on heating and subsequent dehydration. *J. Pharm. Sci.* 87, 347-355.
- Terebiznik, M.R.; Buera, M.P. y Pilosof, A.M.R., 1998. Thermostability and browning development of fungal  $\alpha$ -amylase freeze-dried in carbohydrate and PVP matrices. *Lebensm. –Wiss. U. –Technol.*, 31: 143-149.
- Thoma, J.A ; Spradlin, J.E. ; Dygret S., 1971. The Enzimes Boyer P.D. Eds : ; Vol 5, 115
- Thornton, C. y Ballow, H., 1993. Safety of intravenous immunoglobulin. *Arch Neurol.* 1993 Feb;50(2):135-6.
- Tietz, N., 1999, Tietz textbook of Clinical Chemistry, 3rd Ed, Burtis and Ashwood (eds.), Saunders Co., Philadelphia

- To, E. y Flink, J., 1978a. "Collapse", a structural transition in freeze dried carbohydrates I. Evaluation of analytical methods. *J. Food Technol.*, 13: 551-565.
- To, E.C. y Flink, J.M., 1978b. "Collapse", a structural transition in freeze-dried carbohydrates. II. Effect of solute composition. *J. Food Technol.*, 13: 567-581.
- To, E.C. y Flink, J.M., 1978c. "Collapse", a structural transition in freeze dried carbohydrates III. Prerequisite of recrystallization. *J. Food Technol.*, 13: 583-594
- Uritani, M.; Takai, M. y Yoshinaga, J., 1995. Protective effect of disaccharides on restriction endonucleases during drying under vacuum. *J. Biochem.*, 117: 774-779.
- Walstra, P. (2003) Bonds and interaction forces. In P.Walstra(Ed.) Physical chemistry of Foods (pp.46-58)
- Walters C., 1998. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Science Research*.8:223-244.
- Wang, D.I.C.; Cooney, C.L.; Demain, A.L.; Dunnill, P.; Humphrey, A.E. y Lilly, M.D., 1979. Enzyme kinetics and immobilization. En:"Fermentation and enzyme technology", pp. 311-338, John Wiley & sons, New York, USA.
- Wang, G.M. y Haymet, A.D.J. 1998. Trehalose and Other Sugar Solutions at Low Temperature: Modulated Differential Scanning Calorimetry (MDSC) *J. Phys. Chem. B* :102, 5341-5347.
- Wang y Pearlman, 1993
- Wasyluk , J.M., Tice, A. y Beust, J., 1988. Partial Glass formation: A novel mechanism of insect Cryoprotection.. 150- 159.
- Weast, R.C.; Astle, M.J.; Beyer, W.H. 1986- (Eds.). *Handbook of Chemistry and Physics*, 67th edn., CRC Press, Boca Raton, FL, 1987.
- Wettlaufer, S. y Leeopold, A., 1991. Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration. *Plant Physiology*. 1:165-169.
- White, J.; Kushnir, J.; Subers, M., 1964. Effect of storage and processing temperatures on honey quality. *J. Food Technol.*, 18: 555-8.
- White, G. y Cakebread, S., 1966. The glassy state in certain sugar-containing food products. *J. Food Technol.*, 1: 73.

- Williams, M., Landel, R. and Ferry, J., 1955. The temperature dependence of relaxation mechanisms in amorphous polymers and other glass-forming liquids. *Journal of The Americal Chemical Society*, 77: 3701-3707.
- Xie, G.F. y Timasheff, S.N., 1997. The thermodynamic mechanism of proteins of protein stabilization by trehalose. *Biophys. Chem.* 64: 25-43.
- Zang, S.; Marchio, J. y Yen, J. 1994. A dynamic light scattering study of  $\beta$ -galactosidase: environmental effects on protein conformation and enzyme activity. *Biotechnol. Prog.*, 10: 525-531.
- Zhang, M., Maeda, Y., Furihata, Y. y Nakamaru, Y., 1994. Evolution of volatile compounds by seeds during storage periods. *Seed Science and Technology*. 21:359-33.
- Zhao, H., Olubajo, O., Song, Z; Sims, A.L.; Person, T.E.; Lawal, R.A.; Holley, L.A., 2006. Effect Of Kosmotropicity Of Ionic Liquids On The Enzyme Stability In Aqueous Solutions. *Biorganic Chem.*, 34:15.