

ESTUDIO DE MICELAS DE CASEÍNA BOVINA POR LIGHT SCATTERING

M. Bertoluzzo, S. Bertoluzzo, M. Pires, C. Gatti,

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario,
Boulevard 27 de Febrero 210 bis, (2000) Rosario.

C. Videla y B. Riquelme

Grupo de Optica Aplicada, Instituto de Física Rosario (CONICET),
Boulevard 27 de Febrero 210 bis, (2000) Rosario.

I. INTRODUCCIÓN

Las micelas de caseína bovina (MC) son agregados proteicos de caseínas α_{S1} , α_{S2} , β , y κ , que en la leche se hallan formando una suspensión coloidal estable. Estos agregados tienen forma aproximadamente esférica, con diámetros que varían entre 200 y 600 nm en condiciones normales ¹.

La estabilidad de las MC en medio acuoso esta asegurada por la presencia de caseína κ en su superficie configurando una capa hidrofílica que cumple un papel de coloide protector. Cuando esta capa es parcialmente hidrolizada por acción de quimosina (cuajo) a temperaturas cercanas a los 30°C, las MC desarrollan un proceso de agregación espontánea (coagulación), cuyo conocimiento es de relevante interés para la industria láctea.

Tanto para el seguimiento de la cinética de la coagulación, como para la caracterización del estado de las MC en suspensión, las técnicas experimentales basadas en el fenómeno de dispersión (*scattering*) de la luz visible han sido y siguen siendo de gran utilidad. La determinación de la turbidez de la suspensión se usa ampliamente por su sencillez, por no requerir instrumental de alta complejidad, y por adaptarse al seguimiento de los procesos de coagulación sin introducir perturbaciones en los mismos ².

También ofrece amplias posibilidades de aplicación la determinación de la intensidad de la radiación dispersada por la muestra, a distintos ángulos.

En este trabajo se han empleado medidas de turbidez y de intensidad dispersada a 90° (*light scattering*), con el objeto de caracterizar el estado de las MC en medios de una misma fuerza iónica, lograda por disolución de cloruros de cationes monovalentes, que presentan distintos comportamientos respecto de la estructura del agua (caotrópicos, cosmotrópicos). La determinación de turbidez se empleó también para el estudio de la cinética de la coagulación en presencia de los mencionados cationes.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Las suspensiones de MC se obtuvieron a partir de leche en polvo resuspendida en solución reguladora 10 mM de Imidazol, pH= 6.4, que contenía Ca^{2+} 5 mM (medio standard), a concentraciones de proteínas similares a las de la leche. A partir de estas suspensiones, desnatadas y por eliminación de glóbulos de grasa, se obtuvieron suspensiones de MC. Estas suspensiones fueron diluidas en los distintos casos con medio standard conteniendo los cationes estudiados (25 mM) incorporados como cloruros.

Los estudios de coagulación fueron llevados a cabo a 35°C, sobre 3 mL de una dilución 1/100 de la suspensión original de leche en polvo, sin desnatar. El proceso de agregación se inició por incorporación de 100 μl de una dilución 1/10 de cuajo (solución de quimosina) tipo Hansen.

MEDIDAS DE TURBIDEZ

La turbidez τ de una suspensión de partículas se define como:

$$\tau = d \ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = 2.303 A \quad (1)$$

donde d es el recorrido óptico dentro de la suspensión, I_0 e I son las intensidades de los rayos incidente y transmitido respectivamente, y A es la absorbancia o densidad óptica.

La absorbancia de las suspensiones se determinó a longitudes de onda en el rango 400 a 600 nm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-120-02.

MEDIDAS DE INTENSIDAD LUMINOSA DISPERSADA A 90°

Se utilizó como fuente de luz un láser de He-Ne de 5 mW. El haz incidía en la celda contenedora

de la muestra y se midió la intensidad de luz dispersada a un ángulo de 90° con respecto a la dirección del haz incidente ³.

Las muestras consistían en diferentes soluciones de caseína, las que se obtenían disolviendo de 0 a 40 µl de suspensión estandar de MC, en 3 ml de los distintos buffers.

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

Para una suspensión de partículas monodispersas de masa molar M, concentración en peso c, y con índice de refracción n cercano al del disolvente, τ esta dada por:

$$\tau = HcMQ \quad (2)$$

con:

$$H = \frac{32\pi^2 n^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{3N_A \lambda^4} \quad (3)$$

donde N_A es el número de Avogadro, dn/dc es el incremento específico del índice de refracción y λ es la longitud de onda en el vacío de la luz incidente. Q es una función que resulta de la interferencia interna de la luz dispersada por una partícula de la suspensión a todos los ángulos θ.

A partir de la ecuación (2) se puede obtener la expresión derivada:

$$\frac{d \log \tau}{d \log \lambda} = \beta + \gamma - 4 = \alpha \quad (4)$$

donde:

$$\beta = \frac{d \log Q}{d \log \lambda} \quad (5)$$

y

$$\gamma = 2 \frac{d \log \left[n \left(\frac{dn}{dc} \right) \right]}{d \log \lambda} \quad (6)$$

que en el caso de las MC adopta, en el rango de 400 a 600 nm, un valor aproximadamente constante de 0,2.

Para una muestra polidispersa de esferas homogéneas, puede demostrarse ⁴ que α se comporta como función del radio promedio <r> de las partí-

culas, siempre que dicho radio tenga una relación $\frac{r}{\lambda} \leq 0,25$ condición que se verifica en el rango de los valores de α utilizados.

La comparación de los valores de α para MC en distintas condiciones permite, entonces, estimar si se ha producido alguna variación en el volumen de las micelas.

El proceso de coagulación de las MC lleva a la producción de agregados de gran tamaño, de radio medio muchas veces mayor que λ, que presentan estructura fractal. Puede mostrarse ⁵ que, en este caso, el valor β se tiende asintóticamente, con el aumento del tamaño de los agregados, al valor de la dimensión fractal D_f de los mismos. Esto permite estimar D_f en las etapas finales de la coagulación, cuando se ha alcanzado el máximo tamaño de los coágulos.

Por otra parte, la intensidad luminosa I(θ) dispersada a un ángulo θ por una suspensión diluida de partículas de dimensiones cercanas a la longitud de onda de la radiación incidente, resulta ser proporcional a la concentración de dichas partículas (Rayleigh-Debye-Gans). La constante de proporcionalidad es función de la forma de las partículas en suspensión y de los valores medios del radio y de la masa molar de las mismas. Depende, además, de la intensidad incidente, de la longitud de onda λ y del índice de refracción. Por lo tanto, la pendiente P de la recta obtenida graficando I(θ) en función de c para suspensiones de MC en distintos medios, nos proporciona en forma sencilla, información acerca de las variaciones de tamaño experimentadas por las micelas.

CINÉTICA DE LA COAGULACIÓN

El comportamiento cinético de la coagulación puede ser interpretado, partiendo de la suposición de que las MC que han sufrido la acción hidrolítica de la quimosina, tienen un cierto número de áreas o "parches" superficiales activos para la unión con otras MC (2). Se espera que la interacción de dos "parches" de MC que colisionan, siga una cinética de segundo orden, de tal manera que la velocidad de desaparición de "parches" será:

$$\frac{ds}{dt} = -2k_2 s^2 \quad (7)$$

donde s es el número de "parches" por unidad de volumen y k₂ es una constante cinética.

La expresión (7) permite plantear la velocidad

de desaparición de partículas:

$$\frac{dn}{dt} = -k_2 s^2 \quad (8)$$

puesto que, por cada dos "parches" que interactúan, el número de partículas N disminuye en una unidad. Resolviendo y combinando las ecuaciones (7) y (8) puede obtenerse la expresión:

$$\frac{N}{N_0} = 1 + \frac{1}{2} \left[\left(\frac{N_0}{s_0} + 2k_2 n_0 t \right)^{-1} - \frac{s_0}{N_0} \right] \quad (9)$$

donde N_0 y s_0 son los respectivos valores a tiempo cero.

En el caso de la agregación de MC puede aceptarse que la τ de la suspensión es inversamente proporcional al número de partículas por unidad de volumen 2 . Los valores de s_0/N_0 y de $k' = k_2 \cdot N_0$ pueden obtenerse a través de la determinación de τ como función del tiempo, y del ajuste de las curvas resultantes, teniendo en cuenta que:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = \frac{N}{N_0}$$

III. RESULTADOS

La Tabla I muestra los resultados obtenidos para α, τ a 400 nm y P para MC suspendidas en medio estandar (ME) y medio estandar con adición de Na^+ , K^+ y Cs^+ (25 mM) respectivamente.

	ME	ME+Na ⁺	ME+K ⁺	ME+Cs ⁺
α	2,73	2,48	2,58	2,09
τ (400 nm)	0,597	0,460	0,520	0,689
P	0,50	0,39	0,39	0,36

La Tabla II muestra los resultados obtenidos para κ'_2 , s_0/N_0 y β para la coagulación, efectuada como se describió en Materiales y Métodos, en los mismos medios que se utilizaron para obtener los valores de la Tabla I.

	ME	ME+Na ⁺	ME+K ⁺	ME+Cs ⁺
κ'_2 (min ⁻¹)	2,23	0,437	0,974	0,666
s_0/N_0	1,05	1,34	1,10	1,30
β	2,41	2,35	2,39	2,37

IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Tanto los resultados obtenidos para α como para P en los distintos medios indican que la presencia de los cationes monovalentes, a igual fuerza iónica, produce un aumento del volumen medio de las MC en el siguiente orden:



Este aumento de volumen ha sido adjudicado, en el caso del Na^+ , a la proyección de caseína β al exterior de las MC. Dicha proyección se debería a la labilización de parte de las uniones que mantienen a la caseína β en el interior de las MC por desplazamiento del Ca^{2+} , que es parte fundamental de las mismas. Una explicación similar podría adoptarse para los casos de K^+ y Cs^+ , atribuyendo el efecto mayor de este último a sus propiedades de desordenador de la estructura del agua asociada a las proteínas, que debilitarían, además, a las interacciones hidrofóbicas que contribuyen a mantener a la caseína β integrada a la estructura micelar. Por otra parte, mientras el Cs^+ produce un aumento de τ coherente con la variación del tamaño de las MC, el Na^+ produce simultáneamente una disociación parcial de las mismas (disminución de τ), atribuible al desplazamiento del Ca^+ de la estructura micelar por el Na^+ . Desde el punto de vista de la cinética de la coagulación se observa, fundamentalmente, una disminución de κ'_2 por acción de los cationes, comportamiento totalmente opuesto al que mostraría la coagulación de un coloide lióforo. Esto sería explicable por el aumento de espesor de la capa hidrofílica que rodea a las MC, parcialmente hidrolizadas, por contribución de la caseína β , puesto que dicha disminución guarda relación con el aumento observado de volumen. Hay también un efecto sobre el número de sitios activos por MC, lo que sería consecuencia de la modificación de la superficie externa de las mismas. Sin embargo, los valores estimados para la D_f no muestran variaciones importantes, sugiriendo

que no hay cambios en el mecanismo del proceso de agregación.

REFERENCIAS

1. P. Walstra - "On the stability of casein micelles" J. Dairy Sci. 73, 1965-1979, (1990).
2. A. Carlson, C. G. Hill Jr. and N. F. Olson "Kinetics of Milk Coagulation: II Kinetics of the Secondary Phase: Micelle Flocculation" - Biotechnol. Bioeng. 29, 590 - 600, (1987).
3. P. Foresto, R. Rasia, B. Riquelme y J. Valverde - "Equipo computarizado para el control y analisis de inmunoseros aplicando difusion de la luz" - ANALES AFA, Vol. 2, pp. 284-287, (1990).
4. D. S. Horne - "Determination of the fractal dimension using turbidimetric techniques" - Faraday Discuss. Chem. Soc. 83, 259 - 270, (1987).
- 5 D. S. Horne - "Steric effects in the coagulation of casein micelles by ethanol" - Biopolymers 23, 989, (1984).