

# Modelización fisicomatemática de la interacción entre micelas de caseína y enzimas bacterianas

## Physico-mathematical modelling of interaction between casein micelles and bacterial enzymes

M. Mancilla Canales<sup>a,b</sup>, A. Apesteguía<sup>a</sup>, R. Renata<sup>c</sup>, A. Brandelli<sup>d</sup>, A.P. Folmer Corrêa<sup>d</sup>,  
P. H. Risso<sup>a,b,e</sup>, B.D. Riquelme<sup>a,b,\*</sup>

a Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas – Universidad Nacional de Rosario  
Suipacha 531 – (S2002LRK) Santa Fe – Argentina

b Grupo de Óptica Aplicada a la Biología, Instituto de Física de Rosario (CONICET-UNR)  
Bv 27 de Febrero 210bis – (S2000EZO) Santa Fe – Argentina

c Universidad Federal de Río Grande (FURG)  
Rio Grande Do Sul – Brasil

d Universidad Federal de Río Grande del Sur (UFRGS)  
Av. Paulo Gama, 110 – (90040-060) Rio Grande do Sul – Brasil

e Facultad de Veterinarias – Universidad Nacional de Rosario  
Bv Ovidio Lagos y Ruta 33 – Casilda – Santa Fe – Argentina.

Recibido: 10/11/2014; aceptado: 29/04/2015

En este trabajo se realizó una modelización fisicomatemática del proceso de coagulación enzimática utilizando el sistema constituido por micelas de caseína bovina y un pool enzimático obtenido a partir de *Bacillus* sp. P7 aislado de *Piaractus mesopotamicus*. La modelización consistió en la realización de diseños factoriales completos considerando el efecto de la temperatura, del pH y de la relación enzima/sustrato sobre el tiempo de coagulación, la dimensión fractal y la velocidad inicial del proceso de coagulación.

*Palabras clave:* modelización fisicomatemática, micelas de caseína, proteasa bacteriana.

In this paper it is shown a physicomathematical modeling of enzymatic coagulation process of casein micelles. The enzymatic pool was obtained from *Bacillus* sp. P7 which was isolated from *Piaractus mesopotamicus*. Modelling was achieved by complete design of experiments considering the effect of temperature, pH and ratio enzyme:sustrate on time of coagulation, fractal dimension and initial velocity of the coagulation process.

*Keywords:* physicomathematical modeling, casein micelles, bacterial protease.

## I. INTRODUCCIÓN

Recientemente, en la industria quesera se ha profundizado el estudio de las relaciones entre la microestructura, las características reológicas y las propiedades sensoriales de los productos con el fin de optimizar las prácticas de fabricación y de obtener alimentos funcionales.

En particular, la obtención de modelos fisicomatemáticos de los procesos involucrados en la fabricación de este tipo de alimentos se ha convertido en un objetivo fundamental.

En este trabajo se realizó una modelización fisicomatemática del proceso de coagulación enzimática utilizando el sistema constituido por micelas de caseína bovina y un pool enzimático obtenido a partir de *Bacillus* sp. P7 aislado de *Piaractus mesopotamicus*.

## II. MÉTODOS

### Preparación de las micelas de caseína

La micelas de caseína (MC) se reconstituyeron al 10% P/V a partir de leche en polvo descremada (SVELTY) en una solución acuosa de cloruro de calcio 10mM en buffer Tris-HCl de pH a ensayar (6,5-8,5). La concentración proteica se determinó por espectrofotometría utilizando el método de Kuaye, el cual se basa en la modificación del espectro del aminoácido tirosina a altas longitudes de onda ( $\lambda$ ) de la región UV en un medio fuertemente alcalino (pH~13)<sup>1</sup>.

### Obtención de la proteasa P7

La proteasa fue producida por *Bacillus* sp. P7, microorganismo que creció en un medio de cultivo nutritivo “pluma de gallina” (10 g/L harina de pluma de gallina, 0,3 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,4 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g/L NaCl) durante 48 h a 30 °C y con agitación constante (125 rpm), y se obtuvo a partir de la precipitación del sobrenadante de cultivo con sulfato de amonio (60% de saturación) y posterior cromatografía líquida en Sephadex G-100. La misma se indica como enzima P7.

\* [bibiana\\_riquelme@yahoo.com.ar](mailto:bibiana_riquelme@yahoo.com.ar)

A todas las fracciones de enzimas obtenidas se les midió su actividad proteolítica usando azocaseína como sustrato<sup>2</sup>.

### Evaluación de la cinética de la coagulación enzimática mediante un diseño experimental

El ensayo de coagulación de las MC fue iniciado por adición de la enzima P7, evaluando el efecto de relación de volúmenes enzima/sustrato (E/S), temperatura (T) y pH. Se realizaron diseños experimentales factoriales considerando como factores independientes la relación E/S (V/V: 1/240-1/60), la T (40-55 °C) y el pH (6,5-8,5), manteniendo la concentración de caseína (30 g/L) y Ca<sup>2+</sup> (10 mM) constantes. Como variables respuestas se evaluaron el tiempo al cual comienza la coagulación (t<sub>c</sub>), la velocidad inicial de coagulación (v<sub>i</sub>) y la dimensión fractal de los coágulos obtenidos (D<sub>f</sub>).

A través de los parámetros estadísticos obtenidos del t-test ANOVA se determinaron los factores e interacciones que resultaron significativos. Una vez determinados los mismos, se ajustaron las respuestas mediante el modelo correspondiente y se analizaron los residuos comprobándose normalidad e independencia de los mismos.

Para visualizar el comportamiento de las variables respuestas se graficaron superficies y contornos convenientes para cada situación. Se utilizó regresión múltiple con variables codificadas para obtener modelos matemáticos descriptivos y predictivos del comportamiento del sistema.

La cinética de la coagulación enzimática se evaluó mediante los cambios de turbidez (τ) a través del tiempo luego de adicionada la proteasa P7. Los cambios de tamaño y/o grado de compactación de las MC se estudiaron basándose en la dependencia de la τ, medida como absorbancia (A), con la longitud de onda λ en el rango de 450-650 nm, rango en donde no hay absorción de los grupos cromóforos proteicos.

El parámetro β, relacionado con el tamaño y grado de compactación de las partículas y que puede ser utilizado para evaluar el estado de las partículas durante la coagulación, se define como:

$$\beta = 4,2 + \frac{\partial \log A}{\partial \log \lambda} \quad (1)$$

donde  $\partial \log A / \partial \log \lambda$  es la pendiente de un gráfico lineal de log A vs log λ obtenido a partir de espectros de absorción realizados a distintos tiempos (t) antes y durante la coagulación.

La D<sub>f</sub>, medida del grado de compactación de la malla del coágulo, se estimó como el máximo valor de β alcanzado. La v<sub>i</sub> se estimó como la pendiente de la porción lineal inicial de un gráfico de A vs. t. En este caso, el t<sub>c</sub> se determinó como el tiempo al que comienza un aumento brusco de β.

### Ensayos reológicos

Se evaluó la cinética de la coagulación de las MC mediante ensayos reológicos oscilatorios en un reómetro de tensión y deformación controladas (TA Instruments,

modelo AR G2). Se estimó el tiempo de coagulación (t<sub>c</sub>) como el tiempo en que se el módulo de almacenamiento (G') y la pérdida dinámica (G'') y se determinó el máximo valor de G' alcanzado (G' máx). Para cada ensayo se adicionaron 100 μL de proteasa P7 a 2 mL de suspensión de las MC. Luego se tomaron 800 μL de muestra y se testaron en el reómetro, donde se usó una geometría de tipo cono (diámetro: 40 mm; ángulo cono: 2°; truncación: 55 mm). Se colocó un kit de cubierta trampa de solvente para evitar la contracción de la muestra por evaporación de agua. La temperatura fue controlada con un baño con recirculación conectado al plato Peltier del instrumento. El reómetro dispone de un sistema de adquisición de datos y control de operación en el que se configuró un procedimiento de adquisición de datos a intervalos de 30s, fijando los valores de tensión de oscilación en 0,1 Pa y de la frecuencia de oscilación en 0,1 Hz. Una vez alcanzado el equilibrio, se realizó un barrido de frecuencia entre 0,1 y 10 Hz.

### Microscopía óptica convencional

Se evaluó la microestructura de los coágulos obtenidos por adición de la proteasa P7 a la suspensión de MC. Luego, 90 μL de cada muestra fueron colocados en placas LAB-TEK II de 8 compartimientos. Las placas se colocaron en estufa para mantener la temperatura constante, manteniendo la humedad controlada. Los coágulos fueron observados con un objetivo de inmersión en aceite de 100x en un microscopio invertido (Unión Optical) al cual se le acopló una cámara digital (Canon Powershot A640) con un adaptador de 52 mm y zoom de 7.1x. Las imágenes adquiridas fueron almacenadas en formato JPG para su análisis<sup>3</sup>.

### Determinación del tamaño medio de los poros

Se determinó el diámetro medio de los intersticios o poros por medio del programa ImageJ, obteniéndose los valores en píxeles. Se trazaron líneas rectas sobre las imágenes obtenidas y se midieron los valores en píxeles de los poros. Estos valores fueron promediados, obteniéndose el valor del tamaño medio de los intersticios<sup>4</sup>. Mediante una regla micrométrica se determinó que 1 píxel = (0,0645 ± 0,0005) μm y, en consecuencia, la resolución de las imágenes en nuestro sistema óptico resultó ser de 15,5 píxel/μm.

## III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron modelos físicomatemáticos descriptivos y predictivos que permiten analizar cuales son las combinaciones de factores e interacciones que conducen a un determinado valor esperado.

$$\beta_i = 1,51 - 0,071 \text{ pH} + 0,111 \text{ T} - 0,091 \text{ pH} \cdot \text{T} \quad (2)$$

$$D_f = 2,465 - 0,207 \text{ pH} + 0,089 \text{ T} - 0,043 \text{ pH} \cdot \text{T} \quad (3)$$

$$t_c = 3,88 + 2,40 \text{ pH} - 2,37 T - 2,48 \text{ E/S} - 0,90 \text{ pH} \cdot T - 1,74 \text{ pH} \cdot \text{E/S} + 1,45 T \cdot \text{E/S} \quad (4)$$

$$v_i = 0,1631 - 0,0353 \text{ pH} + 0,0496 T + 0,0772 \text{ E/S} - 0,0147 \text{ pH} \cdot \text{E/S} + 0,0197 T \cdot \text{E/S} \quad (5)$$

Dado que  $D_f$  está asociado con geles más compactos y  $t_c$  con una menor utilización de enzima, se maximizaron conjuntamente ambos parámetros estableciéndose los siguientes valores óptimos:  $\text{pH} = 7,4$  y  $T = 44 \text{ }^\circ\text{C}$ . En estas condiciones se realizaron ensayos de reología y microscopía.

Durante la coagulación se evidenció una primera etapa en la cual el módulo  $G'' > G'$ , comportamiento típico de los sistemas predominantemente viscosos. A medida que transcurrió el tiempo ambos parámetros cambiaron hasta que  $G' = G''$ , siendo este tiempo considerado el  $t_c$ . Luego ambos parámetros aumentaron pero siempre  $G' > G''$ , hasta alcanzar el máximo valor del componente elástico del sistema.

Los valores promedio de  $t_c$  y  $G'_{\text{máx}}$  obtenidos fueron  $(8,32 \pm 0,01) \text{ min}$  y  $(13,0 \pm 0,2) \text{ Pa}$  respectivamente.

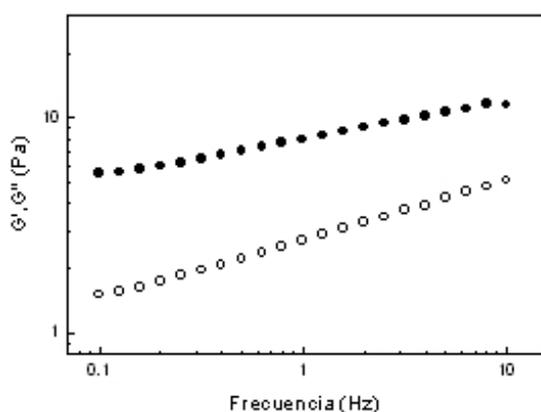


Figura 1. Variación de los parámetros reológicos  $G'$  y  $G''$  con la frecuencia de oscilación luego de la coagulación enzimática de MC (30 g/L) por acción de la proteasa P7 (E/S 3/50 V/V),  $T 44^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} 7,4$ .

En la figura 1 se muestran los valores de  $G'$  y  $G''$  durante el barrido de frecuencia. Se observó que el valor de  $G'$  se encuentra por encima del valor de  $G''$  en todo el rango de frecuencias, es decir, que predomina el componente elástico y las muestras se comportan como un sólido. El aumento de  $G'$  podría ser el resultado de la fusión de las partículas de caseína por reordenamientos de las interacciones inter e intra moleculares de los coágulos formados. También, el parámetro  $\tan\delta$  ( $G''/G'$ ) se vio incrementado con la frecuencia, esto indicaría un aumento de la fluidez de la muestra al incrementarse la frecuencia.

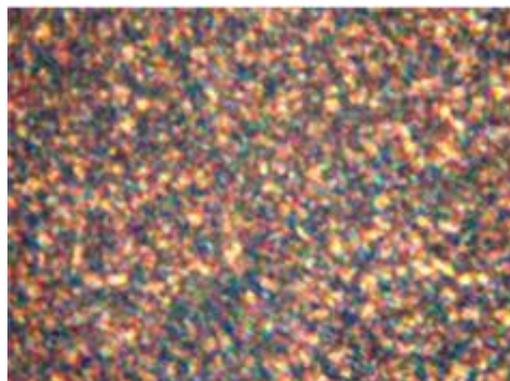


Figura 2. Imagen digital obtenida por microscopía óptica de los coágulos de MC obtenidos por acción enzimática de la proteasa P7,  $T 44^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} 7,4$ .

En la figura 2 se observa una de las imágenes digitales obtenidas a partir de las cuales se estimó un tamaño medio de los poros de  $(1,54 \pm 0,04) \mu\text{m}$ . Este valor es menor al tamaño medio obtenido,  $(5,50 \pm 0,03) \mu\text{m}$ , utilizando cuajo bovino (quimosina) como enzima coagulante, que es la tradicionalmente usada en la manufactura de los quesos.

#### IV. CONCLUSIONES

Se determinó, utilizando un diseño de experimentos, que los valores óptimos de  $\text{pH}$  y  $T$  para la acción coagulante de la proteasa P7 sobre las MC fueron  $7,4$  y  $44^\circ\text{C}$ , para una concentración de caseína de  $30 \text{ g/L}$  y de ion calcio  $10 \text{ mM}$ . Además, se observó que el grado de compactación de los coágulos resultó independiente de la cantidad de enzima adicionada.

Para este sistema, se obtuvo que la combinación de factores que conduce a un valor esperado máximo para  $t_c$ , conlleva a un valor mínimo de  $v_i$ , y viceversa. De esta forma los procesos que aceleran la coagulación minimizan  $t_c$  y maximizan  $v_i$ , encontrándose que la distribución inicial de las micelas en solución está relacionada con el grado de compactación final alcanzado.

Además, se puede concluir, que en el sistema analizado, la consideración conjunta de  $D_f$  y  $t_c$  (maximización de ambas respuestas) conduce a geles más compactos, lo cual fue corroborado por el análisis microestructural.

#### V. REFERENCIAS

- 1 - Kuaye, A. Y., Food Chemistry **49**, 207-211 (1994).
- 2 - Hummel, B.C.W., et al., Analytical Biochemistry **11**(3): p. 532-547 (1965).
- 3- Costa J.P., Castellini H., Risso PH. and Riquelme B. In "Proceedings of the International Conference on Bioinformatics Models, Methods and Algorithms" 322-325 (2011).
- 4- Ingrassia R, Costa JP, Hidalgo ME, Mancilla Canales M, Castellini H, Riquelme B and Risso PH. Food Science and Technology 1-8 (2013).