



## **Estructura y funcionalidad de proteínas lácteas: Efecto de modificaciones inducidas por medios físicos, químicos y enzimáticos**

K. Zimmermann - Stein<sup>\*</sup> y H. Ruiz - Espinoza

*Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla. Sta. Catarina Mártir, Cholula, Puebla. C.P.72820. México.*

---

### **Resumen**

El objetivo de este trabajo fue el de estudiar los métodos más importantes de desnaturalización de las proteínas lácteas. Estos métodos cambian las propiedades de la leche, tales como solubilidad, emulsificación y coagulación, todas éstas pueden ser iniciadas por varias acciones y agentes. Dentro de los métodos estudiados se encuentran las altas presiones (hidrostáticas y de homogenización), cambios en el pH, etanol, renina y otras enzimas proteolíticas, entre otros. Las principales proteínas lácteas que son afectadas, dada su complejidad, son las caseínas. En general, los agentes de naturaleza química y enzimática ocasionan la coagulación y precipitación de éstas, permaneciendo las suero-proteínas en solución acuosa (por ejemplo el queso). Por el contrario, los agentes de naturaleza física, ocasionan la formación de agregados, un decremento en el tamaño de la micela y una re-configuración interna de éstas.

**Palabras clave:** proteínas lácteas, caseína, desnaturalización, agregación.

### **Abstract**

The objective of this document was to study the most important methods of milk protein denaturation. These methods change milk properties, such as solubility, emulsification and coagulation, these all can be initiated by a number of different actions or agents. Within the agents studied are high pressures (hydrostatic and homogenization), changes in pH, ethanol, salts, rennets and other proteolytic enzymes and other non-less important agents. The main affected milk protein, because of its complexity, are caseins. In general, agents of chemical and enzymatic nature cause the coagulation and precipitation of these, remaining the whey protein in aqueous solution (e.g. cheese). Otherwise, agents of physical nature, cause the formation of aggregates, a decrease in micelle size and the internal reconfiguration of these.

**Keywords:** milk proteins, casein, denaturation, aggregation.

---

### **Introducción**

Las proteínas son macromoléculas conformadas por aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. Sus propiedades

nutritivas, características fisicoquímicas y propiedades funcionales dependen directamente del tipo, concentración y secuencia de unión de los monómeros que las constituyen; a esta secuencia se le conoce como estructura primaria. Dependiendo del arreglo espacial que adquieren por interacciones entre aminoácidos adyacentes o

---

<sup>\*</sup>Programa de Maestría en Ciencia de Alimentos  
Tel.: +52 222 229 2126, fax: +52 222 229 2727  
Dirección electrónica: karin.zimmermannsn@udlap.mx

lejanos en su secuencia lineal, las proteínas pueden poseer estructuras secundarias o terciarias, respectivamente. Algunas de las estructuras secundarias más comunes son  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -laminar.

Las proteínas presentan cambios en su estructura al someterse a diferentes estímulos externos tales como tratamiento térmico, cambios en el pH por adición de ácidos o bases, procesamiento a alta presión hidroestática o dinámica, entre otros. Dependiendo de su complejidad, las proteínas pueden sufrir un desdoblamiento al que se le conoce como desnaturalización; las proteínas desnaturalizadas a su vez, pueden formar agregados con otras proteínas reactivas superficialmente (Walstra *et al.*, 2006).

Las proteínas lácteas son quizá el grupo proteico alimenticio más estudiado. La leche está conformada principalmente por tres estructuras biológicas: dos en estado coloidal (proteínas, glóbulos de grasa) y una en solución (lactosa). Entre el grupo de proteínas lácteas se distinguen dos clases: las caseínas, fosfoproteínas organizadas en forma de conglomerados coloidales denominados micelas, estables al calor e insolubles a pH 4.6; y las proteínas séricas, con una estructura globular compleja, que precipitan a pH 4.6 y son inestables al calor.

Las proteínas juegan un papel importante en la formación de estructuras en productos lácteos como el queso y el yogurt, así como en la estabilización de los glóbulos de grasa en los productos homogenizados. Cuando estas proteínas se desnaturalizan, particularmente las séricas, tienen la habilidad de producir geles ácidos con buenas propiedades de textura (Guyumarc' *et al.*, 2007). Considerando esto, se han buscado formas de mejorar las características de las lacto-proteínas; tales modificaciones pueden ser de naturaleza física (Van Hekken y Holsinger, 2000; Kim *et al.*, 2008), química (Adams *et*

*al.*, 2008) y/o enzimática (Smiddy *et al.*, 2006; Czernicka *et al.*, 2009).

El objetivo de este trabajo es presentar un panorama general de las posibles modificaciones inducidas a las proteínas de leche, con énfasis en los estímulos externos relevantes para el procesamiento de productos lácteos.

## Revisión bibliográfica

### 1. Generalidades de las proteínas lácteas

Las caseínas son fosfoproteínas que se presentan como conglomerados coloidales dentro de la leche y confieren a la leche su opalescencia característica (Huppertz, 2009). La principal función de las micelas es la de fluidificar a las caseínas así como la de solubilizar el fosfato cálcico. Se reconocen 4 tipos de caseína:  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseína, todas ellas se encuentran fosforiladas en residuos específicos de serina; así mismo, poseen cantidades importantes de prolina, lo cual limita la cantidad de la estructura terciaria que pueden exhibir. Presentan un marcado carácter aniónico en un medio neutro por la presencia de radicales fosfoserina y/o ácido glutámico. Las primeras tres precipitan en presencia de calcio por disminución de su carga eléctrica negativa y su hidrofilia, sin embargo la  $\kappa$ -caseína no sólo es soluble en calcio, sino que también interactúa y estabiliza a las caseínas insolubles en calcio formando un estado coloidal estable dentro de la leche. A los 4 tipos de caseína principales, se les pueden añadir otros grupos de proteínas minoritarias como la  $\gamma$ -caseína y la  $\lambda$ -caseína. La primera es un fragmento procedente de la proteólisis de la  $\beta$ -caseína y la segunda es derivada de la  $\alpha_{s1}$ -caseína. Todos los tipos de caseína, tanto las mayoritarias como las minoritarias, se encuentran en todos los tipos de leche de mamíferos estudiadas hasta hoy en

día, aunque en diferentes cantidades y proporciones.

Debido a su papel determinante en la estructura y funcionalidad de los productos lácteos, la conformación de las micelas de caseína ha sido abordada por varios autores desde principios del siglo pasado. La mayoría de los modelos propuestos para la micelas de caseína se clasifican en tres categorías: de núcleo y corteza (Mirsky y Pauling, 1936; Farrell, 1988; de Kruif, 2003; Dalgleish *et al.*, 2004), de subunidades (McMahon y Brown, 1983; Dalgleish, 1992; Famelart *et al.*, 1996; Van Hekken y Holsinger, 2000; Panouillé *et al.*, 2004) y de estructura interna (Dalgleish *et al.*, 2004; Farrell *et al.*, 2006; Smiddy *et al.*, 2006; Bouchoux *et al.*, 2009). Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de investigaciones que se han hecho para conocer su estructura a detalle, ésta aún no es conocida ni comprendida con exactitud (Considine *et al.*, 2007). Actualmente, se sabe con certeza que las  $\alpha_s$ -caseína ( $\alpha_{s1}$ - y  $\alpha_{s2}$ - caseína) se encuentran en el núcleo de la micela mientras que la mayoría de los modelos estructurales localizan a la  $\kappa$ -caseína en la superficie de la micela por lo que juega un papel esencial en la regulación del tamaño micelar así como en el mantenimiento de la suspensión de las demás caseínas en la leche (Farrell *et al.*, 2006; Ferrandini *et al.*, 2006). La  $\beta$ -caseína se encuentra en el centro de la micela nativa bajo condiciones nativas (pH 6.6 - 6.7; temperatura ambiente), pero puede migrar a la superficie o hacia la fase sérica cuando la micela se encuentra en un ambiente no nativo, como por ejemplo a 10°C (Considine *et al.*, 2007). Toda la micela se encuentra estabilizada por nanoaglomerados de fosfato de calcio, también denominado fosfato de calcio coloidal (Walstra *et al.*, 2006). Un aspecto en común que presentan los últimos modelos desarrollados, es la característica de presentar una capa de finas vellosidades en la superficie de la micela. Esta capa crea un impedimento estérico contra la agregación. Esta

característica es la llave para las actuales discusiones de las formas de coagulación de la leche (IDF, 2007).

Por su parte las proteínas séricas son un grupo heterogéneo, conformado por  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina, albúmina bovina sérica, diversos tipos de inmunoglobulinas y proteínas minoritarias, algunas con importantes funciones biológicas, como la lactoferrina. La  $\beta$ -lactoglobulina y la  $\alpha$ -lactalbúmina son las mayoritarias (60% y 20% en proporción másica, respectivamente) y poseen concentraciones apreciables de residuos de cisteína. En el caso particular de  $\beta$ -lactoglobulina, los aminoácidos sulfurados quedan expuestos al desnaturizarse la proteína, posibilitando la interacción de grupos sulfhidrilo con caseína, particularmente del tipo kappa (Fox y McSweeney, 1998).

## 2. Modificaciones estructurales en proteínas lácteas

Cuando las proteínas de leche se someten a diferentes estímulos externos, ya sean de naturaleza física, química, biológica o mixta, pueden sufrir modificaciones diversas, frecuentemente relacionadas con la pérdida de estabilidad estérica y/o electrostática de las micelas de caseína, a la desnaturización de las proteínas séricas y a las interacciones entre ambas. Bajo condiciones selectas esto puede conducir a la agregación proteica (IDF, 2007). A continuación se describen los principales cambios inducidos por medios físicos, químicos y enzimáticos, con énfasis en los estímulos externos relevantes para el procesamiento de productos lácteos.

### 2.1. Medios físicos

#### 2.1.1. Altas temperaturas

Singh y Waungana (2001) resumieron los principales cambios que sufre la leche al someterse a un tratamiento térmico y que

pueden afectar o beneficiar a la estabilidad estructural de las proteínas. Dentro de la primera categoría se encuentran: disminución de pH, deposición de fosfato de calcio sobre la superficie micelar, asociación de proteínas de suero con micelas, desfosforilación de caseína, disociación de  $\kappa$ -caseína, reducción del potencial zeta proteico y formación de enlaces covalentes. Por su parte, la estabilidad proteica se puede ver favorecida por la reducción en la actividad del ión calcio, reducción de la sensibilidad micelar a los iones calcio y la formación de algunos productos de degradación térmica de lactosa.

El tratamiento térmico de la leche (85 - 95°C durante varios minutos) es tradicionalmente aplicado en la elaboración de yogurt y otras leches fermentadas, en las cuales la producción de ácido láctico es deseable desde un principio con la finalidad de obtener una textura firme así como una alta retención de suero (Guyomarc' *et al.*, 2007). Los cambios en sus partículas dependen de la temperatura y de la duración del tratamiento térmico, así como cambios pequeños en el pH de la leche durante el calentamiento, entre otros. Un tratamiento térmico medio (< 70°C, 20 min), al pH natural de la leche, causa un decremento pequeño en el tamaño de las micelas de caseína. En cambio, si la leche se calienta a más de 100°C, los cambios en el tamaño son marcadamente dependientes del pH de la leche a la temperatura a la que se calentó (Anema y Li, 2003; Considine *et al.*, 2007; Guyomarc' *et al.*, 2007).

Guyomarc' *et al.* (2007) trataron térmicamente leche descremada con diferentes pH con el fin de disminuir la carga de calor necesaria para formar agregados de proteína/ $\kappa$ -caseína y/o incrementar las propiedades de gelatinización ácida de la leche descremada al desplazar estos agregados a la fase sérica. Los resultados demostraron que la transferencia inducida por el calor de las proteínas del suero a la fase micelar se inhibió a un pH de 7.5 o

mayor, mientras que la transferencia de la  $\kappa$ -caseína de fase micelar a la sérica aumentó con el aumento del pH, aún a temperaturas bajas. Estos resultados sugieren que un pH alcalino de entre 7.5 – 8.0 fue necesario para prevenir la formación de agregados  $\beta$ -lactoglobulina / $\kappa$ -caseína.

### 2.1.2. Presión elevada

Los dos procesos a alta presión disponibles para aplicaciones en alimentos en nuestros días son el procesamiento a alta presión hidroestática (PAPH) y la homogenización a alta presión (HAP). La primera se basa en la conservación de alimentos al someterlos a compresión indirecta, empleando agua como fluido presurizante sobre un producto sólido o líquido pre-empacado. Por su parte, la HAP es una tecnología relativamente nueva, que comparte los principios de operación con la homogenización convencional, pero trabajando a presiones de operación hasta 20 veces mayores. Ambos procesos generan cambios importantes sobre las características de proteínas lácteas, pero esta revisión se centrará en el proceso de HAP.

Numerosos estudios se han realizado sobre las aplicaciones de la HAP en el procesamiento de leche y las posibles afectaciones que tiene sobre las estructuras proteicas. La micela de caseína se estabiliza por  $\kappa$ -caseína, fosfato de calcio coloidal e interacciones hidrofóbicas (Roach y Harte, 2008). Dado que la alta presión afecta estos sistemas (Huppertz *et al.*, 2002), un cambio en la agregación o disgregación micelar, producto de la HAP, es esperado. Hayes y Kelly (2003) no observaron cambios en el tamaño micelar con HAP < 150 MPa y sólo reportan una disminución del 5% (180.75nm a 170.65nm) como consecuencia de HAP a 200 MPa a 7°C. Por otra parte, una HAP a 200 MPa con 5 ciclos a través de un homogenizador Emulsiflex, redujo el tamaño micelar 200-300 nm en leche pasteurizada a 150nm en leche

entera presurizada (50%). Los fragmentos de caseína interactuaron con nuevos glóbulos de grasa (producto de la HAP), integrándose a su membrana (Kheadr *et al.*, 2002). Sandra y Dalglish (2005) confirmaron la contribución de los ciclos múltiples en la reducción del tamaño micelar. Roach y Harte (2008) reportaron resultados con leche descremada presurizada a presiones de 100-350 MPa. La HAP afectó en gran medida el tamaño micelar, pues ésta disminuyó aprox. 30%, de 100 a 200 MPa (278 a 171 nm), mientras que a partir de 250 MPa el tamaño de micela comenzó a incrementar (178 nm) hasta alcanzar 180-210 nm a 350 MPa.

Hayes *et al.* (2005) estimaron la desnaturalización de  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactalbúmina por HPLC (cromatografía de líquidos de alta eficacia, por sus siglas en inglés) de fase reversa en leche entera presurizada a 150-250 MPa. La barorresistencia de la  $\alpha$ -lactalbúmina es mucho mayor que la de  $\beta$ -lactoglobulina, ya que 10, 42 y 56% de  $\beta$ -lactoglobulina se desnaturalizó a 150, 200 y 250 MPa, respectivamente. Mientras tanto,  $\alpha$ -lactalbúmina apenas si fue afectada por la HAP; el porcentaje de proteína desnaturalizada (<10%) se mantuvo aproximadamente constante en todas las presiones investigadas, sugiriendo que la desnaturalización fue por el incremento de temperatura inherente a la HAP, más que por el proceso de presurización en sí, además que la desnaturalización térmica de  $\alpha$ -lactalbúmina es reversible en un 80-90%.

Datta *et al.* (2005) determinaron la contribución de la temperatura en la desnaturalización de  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactalbúmina. La  $\alpha$ -lactalbúmina no fue desnaturalizada por combinaciones de presión (200 MPa) y distintas temperaturas de entrada (10-50°C), mientras que para la  $\beta$ -lactoglobulina, el patrón de desnaturalización por la HAP, combinando presión y temperatura, varió en relación al observado

para el tratamiento térmico sólo. Mientras que la  $\beta$ -lactoglobulina se desnaturalizó sólo 10% con calentamiento a 80°C, su desnaturalización con HAP inició desde procesos con  $T_{\text{salida}}$  de 65°C, hasta alcanzar un 40% de desnaturalización a  $T_{\text{salida}}$  de 80°C. Por tanto, se concluyó que la desnaturalización de la  $\beta$ -lactoglobulina, bajo estas condiciones, podría deberse a un efecto sinérgico entre temperatura y las fuerzas asociadas con la HAP.

### 2.1.3. Microfiltración / Ultrafiltración

Durante la ultrafiltración, es probable que el tamaño de la micela de caseína disminuya cambiando así su estructura a una reconfiguración por enlaces hidrofóbicos a una mucho más compacta. Estos rearrreglos pudieran causar algunos cambios fisicoquímicos en las proteínas de la leche durante un tratamiento térmico. Sin embargo, se sabe que estos cambios durante la ultrafiltración son limitados. Erdem (2006) estudió la relación que existe entre la ultrafiltración y el tratamiento térmico que afecta al área hidrofóbica de las proteínas lácteas en leche descremada. En su trabajo concluyó que todos los sistemas lácteos estudiados se vieron afectados durante o después de la ultrafiltración. El sistema proteico de la leche se reorganizó en una estructura mucho más compacta tras la ultrafiltración y esta nueva estructura aumentó su firmeza cuando el factor de concentración se incrementó y la fracción retenida se calentó. Al aumentar la temperatura, la estructura se compactó aún más.

## 2.2. Medios químicos

### 2.2.1. Cambios en el pH

La reducción del pH en la leche provoca cambios en las características fisicoquímicas de las micelas de proteínas, llegando incluso a la formación de geles (si se alcanza un nivel

determinado de pH) debido a una desestabilización del complejo de las caseínas. Este proceso de desnaturalización puede ser alterado por numerosos factores, tales como: el calentamiento previo de la leche, la adición de calcio, alteración de la cinética de acidificación y la alteración de las caseínas en relación a las proteínas de suero. Además, el comportamiento de cada tipo de proteína presente en la leche (caseína y proteínas de suero) es completamente distinto.

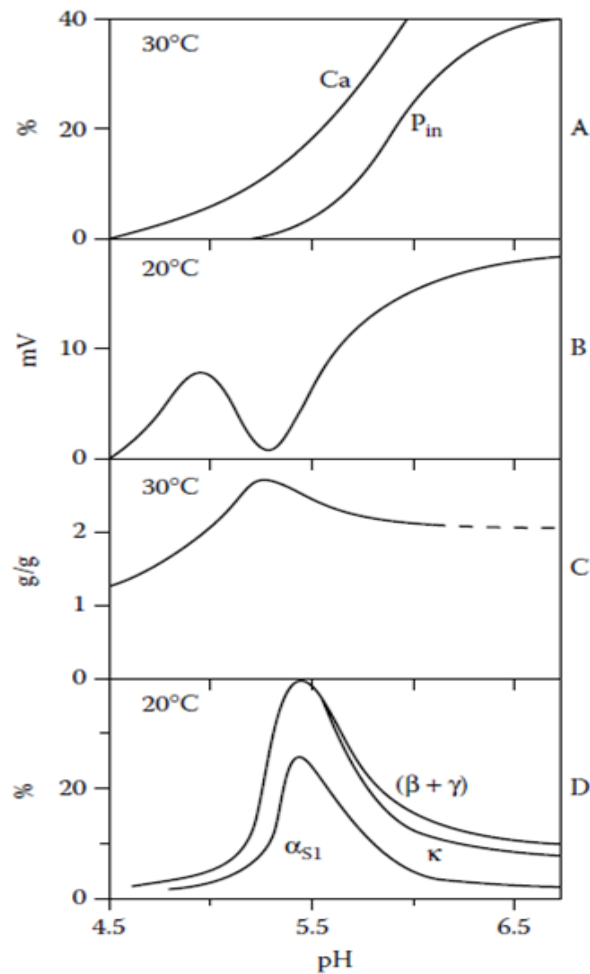
Cuando el pH de la leche disminuye hasta 4.6 se induce una coagulación de las caseínas. Este proceso de agregación ocurre a cualquier temperatura, pero por debajo de 6°C, los agregados son bastante finos permaneciendo en suspensión, aunque pueden ser sedimentados por centrifugación a baja velocidad. A temperaturas más altas, entre 30 y 40°C, los agregados son bastante más grandes y precipitan fácilmente. Cuando la temperatura es aún mayor, por arriba de los 50°C, el precipitado muestra un aspecto fibroso y es difícil de manejar (Walstra *et al.*, 2006).

En la Fig. 1 muestra algunos de los cambios en la micela de caseína, producto del descenso en el pH de la leche. El fosfato coloidal se traslada hacia la solución, llegando a ser completo este traslado a valores de pH de alrededor de 5.25; la completa remoción de todo el calcio requiere que se continúe el descenso del pH, llegando incluso a valores por debajo del punto isoelectrico de las caseínas (Fig. 1A). En esta figura también se observa el descenso del valor absoluto del potencial  $z$  cuando se reduce el pH (Fig. 1B). Esto se debe a un incremento en la asociación de los iones hidrógeno con los grupos ácidos y básicos de las proteínas, además de un incremento en la actividad de los iones calcio y su asociación con grupos ácidos. En otras palabras, el calcio sustituye al fosfato de calcio en una cierta cantidad. Al seguir el descenso del pH, la carga negativa de las caseínas

incrementa, debido a un proceso de disociación de los iones calcio de las micelas, y eventualmente vuelve a descender debido a la asociación con los iones hidrógeno. Si continúa descendiendo el pH, la caseína se vuelve positivamente cargada. Además, la caída del pH conlleva primero a un hinchamiento de las partículas y eventualmente a un encogimiento considerable (Fig. 1C). Cuando el pH llega a valores de alrededor de 5.3, una considerable sección de la micela migra hacia la solución, con un incremento en la hidrofobicidad de esta sección. En la Fig. 1D se observa los efectos antes explicados a una temperatura de 20°C; si la temperatura aumenta, el resultado observado es mucho menor, mostrándose un efecto contrario al reducir la temperatura (Walstra *et al.*, 2006).

Debido a que el pH de la leche se encuentra cercano a la neutralidad (6.6 - 6.8), resulta necesaria la adición de un ácido para disminuir su pH o un crecimiento importante de la flora microbiana nativa (compuesta principalmente por bacterias ácido lácticas). A nivel laboratorio, el ácido más utilizado es el clorhídrico; aunque, el ácido acético y láctico son también utilizados, pero con menor frecuencia. El ácido láctico producido *in situ* por bacterias ácido-lácticas también es ampliamente utilizado (Fox y McSweeney, 1998).

En las micelas de caseína, los cambios producidos por la reducción del pH se encuentran mediados en parte por los cambios en el fosfato de calcio coloidal contenido en la micela. El fosfato de calcio coloidal puede ser disuelto y removido de la micela por acidificación en frío, seguido por un proceso de diálisis. A pH de 4.9 el fosfato de calcio coloidal se encuentra completamente disuelto, siendo un proceso reversible cuando se reajusta el pH hacia 6.7, pero con una alteración de las propiedades de las micelas nativas (Fox y Kelly, 2004).



**Fig. 1.** Propiedades de la micela de caseína en leche en función del pH. (A) Porcentaje de calcio y fósforo inorgánico dentro de las micelas. (B) Potencial electrocinético negativo z. (C) Cantidad de agua por gramo de caseína seca en las micelas separadas por centrifugación. (D) Porcentaje de las diferentes caseínas que no puede ser separado por centrifugación a alta velocidad. (Adaptada de Walstra *et al.*, 2006).

Para el caso de las proteínas de suero, los cambios de pH generan diversos procesos de asociación-disociación. La  $\beta$ -lactoglobulina tiene su punto isoeléctrico alrededor de 5.2, aunque a otros niveles de pH, incluyendo el de la leche (6.7), esta proteína es comúnmente encontrada como un dímero. En un rango de pH de 3.0 a 8.0 permanece como un monómero, pero en el rango 3.1 a 5.1, con la presencia de altas temperaturas y altas concentraciones proteicas, puede asociarse para formar octámeros en un proceso conocido

como gelación en frío, el cual es empleado en elaboración de surimi, mayonesa y algunos postres con formación de geles. Este proceso se lleva a cabo en dos etapas, en la primera se trata térmicamente una solución de proteínas globulares a un pH neutro y a concentraciones iónicas menores a las requeridas para la gelificación. En este paso, el desdoble de las proteínas es seguido por un proceso de agregación por medio de puentes disulfuro. En estas condiciones, se forman agregados solubles debido a que se obtiene una red

cargada y fuerzas repulsivas que evitan la agregación repentina. En un segundo paso, se pueden formar geles turbios por medio del descenso en el pH hasta acercarse al punto isoelectrico de las proteínas o por medio de la adición de sal. Los geles formados por ácidos tienden a ser más fuertes que los formados por sales, a la misma concentración proteica (Cavallieri *et al.*, 2007). Por otra parte, las propiedades emulsificantes de la  $\beta$ -lactoglobulina también son afectadas por el pH. A pH ácido su capacidad emulsificante es menor que a pH 7 aunque su hidrofobicidad es mayor a estos valores de pH. En un estudio sobre adsorción competitiva en emulsiones estabilizadas por proteína aislada de suero a pH de 7 y 6, mostró una mayor cantidad de  $\beta$ -lactoglobulina en la interfaz en comparación con la  $\alpha$ -lactalbúmina, siendo un contenido contrario cuando el pH descendió a 3 (Fang y Dalgleish, 1997).

Una aplicación industrial del proceso de gelificación por acidificación es la elaboración de yogurt; en el cual, la leche es normalmente calentada antes de la fermentación, con la intención de favorecer la formación de los enlaces covalentes entre la  $\kappa$ -caseína y la  $\beta$ -lactoglobulina y la agregación de las suero-proteínas (Lucey, 2002; IDF, 2007). Estos enlaces vuelven, el gel formado, menos permeable y robusto en las primeras 24 horas en comparación con los geles formados por procesos enzimáticos. En este producto, es común la separación de las proteínas de suero del gel formado después de un tiempo de almacenamiento (lo cual es visto como un defecto en el producto), la búsqueda de soluciones a este proceso sigue siendo una de las áreas de investigación más importantes.

### 2.2.2. Adición de etanol

La coagulación de la leche por adición de etanol es un método de análisis empleado para determinar la estabilidad de la leche, en especial si va a ser sometida a altas

temperaturas de procesamiento. Este procedimiento se basa en asumir que toda la leche ha desarrollado una acidez microbiana, y por tanto resulta positiva a esta prueba. Sin embargo, se ha demostrado que no todo resultado positivo se debe a una leche ácida, sino que se puede tratar de una leche con desbalance mineral, principalmente de calcio (Alvarado *et al.*, 2006).

Otra característica altamente estudiada, es la adición de etanol en la leche y su calentamiento con la intención de desasociar la micela de caseína. En condiciones de 60°C y 30% (v/v) de etanol se produce un cambio en la leche que la vuelve de opaca a translúcida. Este cambio en la turbidez de la leche es debido a la disociación de las micelas de caseína en sus componentes proteicos solos, al llevarse a cabo un cambio en la hidrofobicidad de la leche. Con esta intención, Trejo y Harte (2010) llevaron a cabo un estudio sobre el uso de tratamientos térmicos y la adición de etanol, buscando cambiar la hidrofobicidad de la micelas de caseína y su eventual disociación, para obtener las proteínas constituyentes de las micelas separadas. Sus resultados muestran que es posible rastrear, por medio de la fluorescencia, los cambios en la hidrofobicidad de la leche sometida a las condiciones antes mencionadas, aunque en tratamientos con una concentración mayor a 30% de etanol y tratamientos térmicos mayores a 40°C, se reduce la respuesta obtenida. Esto puede ser debido a un proceso de inhibición competitiva, aunque el mecanismo exacto sigue siendo desconocido.

### 2.2.3 Adición de sales

Las sales neutras tienen una influencia muy marcada en la solubilidad de las proteínas globulares. Su efecto no sólo depende de su concentración, sino que también de las cargas eléctricas de sus cationes y aniones. Las proteínas, al ser macromoléculas ionizables, se ven alteradas por las interacciones

electrostáticas que establecen consigo mismas y con el medio que las rodea. Las sales modifican la estructura del agua e influyen también en la conformación de las proteínas mediante interacciones electrostáticas. Es así como, en función de la fuerza iónica, las sales pueden solubilizar o precipitar estos polipéptidos (Badui, 1993).

Con el objetivo de lograr micelas de caseína aisladas en la leche y sin la presencia de proteínas de suero, Hernández y Harte (2009) llevaron a cabo un estudio para obtener micelas de caseína aisladas, empleando un cambio en el balance mineral de la leche y un proceso de microfiltración. Empleando cloruro de calcio, fosfato de sodio o citrato de potasio en concentraciones en un nivel de 0 a 100 mM, con un proceso de microfiltración de flujo tangencial ( $0.22\mu\text{m}$ ). Tratamientos selectos fueron capaces de aislar completamente micelas de caseína (usando

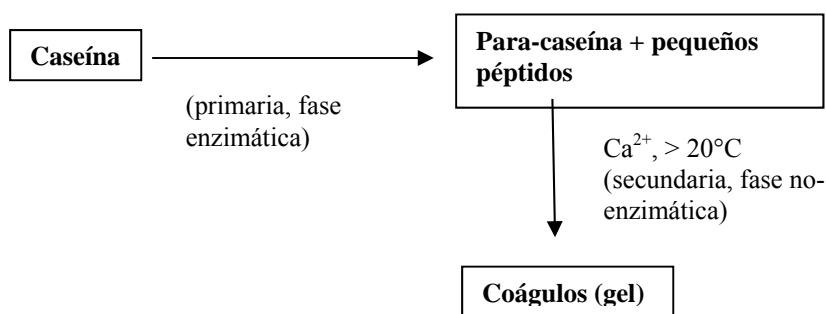
fosfato de sodio en un nivel de concentración de 10-50 mM), llegando inclusive a separar completamente las proteínas de suero.

### 2.3. Medios enzimáticos

#### 2.3.1. Renina o quimosina

El uso de la renina, también conocida como quimosina, para coagular caseína es un proceso tradicional inicial en la elaboración de muchos tipos de queso. Esta coagulación ocurre en 2 fases principales (Fig. 2).

En la primera etapa, las micelas de caseínas se ven modificadas por una pequeña proteólisis de  $\kappa$ -caseína liberándose así la molécula cargada y glicosilada de  $\kappa$ -caseína, así como una disminución en el diámetro de la micela. La pérdida de la  $\kappa$ -caseína resulta en una reducción en el potencial zeta de las micelas, así como una pérdida de la estabilidad



**Fig. 2.** Coagulación de la leche (Adaptada de Fox *et al.*, 2000).

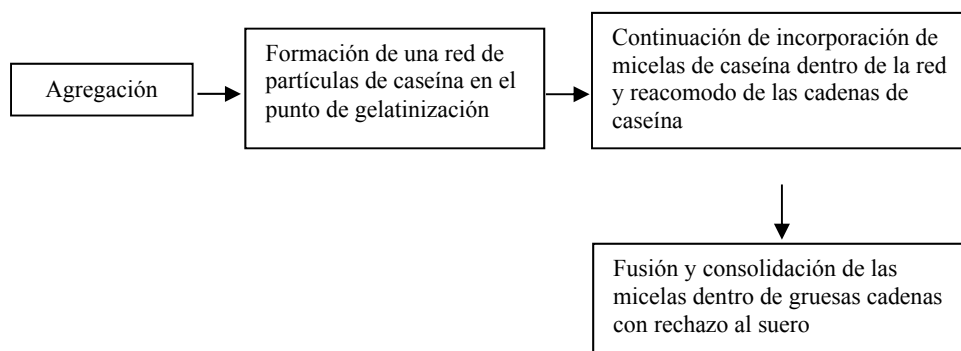
sérica que ésta proveía. La segunda etapa ocurre cuando el 60-85% de la  $\kappa$ -caseína total ya ha sido hidrolizado. Las micelas desestabilizadas se aglomeran por la combinación de interacciones de van der Waals', hidrofóbicas, calcio dependientes y ión-par específicas. En este punto se forma una red proteica que atrapa a la grasa y a la humedad (IDF, 2007). Algunos autores afirman que existe una tercera etapa de coagulación llamada estabilización del gel (McMahon y Brown, 1984), donde ocurren más entrecruzamientos incrementándose así la firmeza del gel. McMahon y Brown (1990) describieron el proceso de coagulación de las proteínas de la leche como se muestra en la Fig. 3.

Los factores que afectan a la coagulación enzimática incluyen: a) concentraciones bajas de  $\text{Ca}^{2+}$ , las cuales pueden inhibir la agregación, por lo que la adición de  $\text{CaCl}_2$  es recomendable; b) pH, muchos productos obtenidos por coagulación por efecto de la renina, también son acidificados por cultivos iniciadores o por acidificación directa. Cuando el pH en la leche es bajo, el proceso de coagulación es más rápido y se forman coágulos más firmes; c) concentración proteica; d) concentración de renina y e) temperatura de coagulación.

### 2.3.2. Reacciones catalizadas por transglutaminasas

Dentro de los métodos bioquímicos, el entrecruzamiento enzimático de las proteínas lácteas es particularmente importante. Dentro de este grupo de enzimas se encuentran la transglutaminasa, la lipoxigenasa, tirosinasa, peroxidasa, lisiloxidasa, bisulfuro isomerasa, lacasa y sulfidril oxidasa; pero únicamente se ha estudiado el efecto de la transglutaminasa sobre el entrecruzamiento enzimático de las proteínas lácteas (Huppertz, 2009).

La transglutaminasa cataliza la reacción de aciltransferencia entre los grupos  $\gamma$ -carboxiamida de residuos glutámicos ligados a proteínas o péptidos y aminas primarias (Ando *et al.*, 1989; Márquez *et al.*, 2006; Barreiro y Seselovsky, 2003). Existen dos tipos de transglutaminasa, las calcio dependientes que se encuentran en el hígado y plasma sanguíneo de mamíferos, en pescados y en ciertos tejidos vegetales; y las calcio independientes obtenidas de la fermentación de algunos microorganismos tales como *Streptoverticillum cinnamomeum* y *Streptoverticillum mobaraense* (Barreiro y Seselovsky, 2003; Færgemand y Murray, 1998; Motoki y Kumazawa, 2000; Chobert,



**Fig. 3.** Proceso de coagulación de las proteínas lácteas (McMahon y Brown, 1990).

2003). Las transglutaminasas se muestran activas en un rango de pH de 4.5 a 9 con un óptimo entre 6 y 7 pueden ser inactivadas por un aumento en la temperatura interna (2 h a 65°C, 15 min a 70°C, 5 min a 75°C ó 1 min a 80°C) (Barreiro y Seselovsky, 2003).

Las propiedades funcionales de las proteínas se ven mejoradas por la acción de cohesión producida por esta enzima; entre estas propiedades se encuentran la textura, capacidad de retención de agua y capacidad de formación de geles (Barreiro y Seselovsky, 2003; Márquez *et al.*, 2006). Las proteínas que presentan estructuras muy variables como es el caso de las caseínas son buenos sustratos para la transglutaminasa, ya que son especialmente susceptibles al entrecruzamiento inducido por esta enzima siempre y cuando se presente una pre-desnaturalización como por ejemplo a causa de un tratamiento térmico (Huppertz, 2009). Se recomienda que se encuentre en solución acuosa, ya que algunos solventes orgánicos, como el etanol por ejemplo, pueden desnaturalizar a la enzima. Específicamente en la leche, aumentan la viscosidad de ésta (Barreiro y Seselovsky, 2003).

La susceptibilidad al entrecruzamiento de cada tipo de caseína está primordialmente relacionada a la accesibilidad de la proteína. En el caso de las micelas de caseína, las que se encuentran en la superficie son más susceptibles que las que se encuentran en el núcleo. Cuando las caseínas se encuentran en agregados pequeños, como por ejemplo en forma de caseinato de sodio, su susceptibilidad al entrecruzamiento aumenta. En el caso de la leche fluida, el entrecruzamiento de las caseínas por transglutaminasa aparece primero dentro de las micelas de caseína (intra-micelar); la formación de un entrecruzamiento entre las micelas de caseína cercanas (entrecruzamiento inter-micelar) no puede ser observado (Huppertz, 2009).

Como consecuencia del entrecruzamiento intra-micelar de las caseínas por transglutaminasa, las propiedades de las micelas de caseínas se ven alteradas considerablemente. Las caseínas que no han sido tratadas se pueden clasificar como una agrupación coloide, cuya estructura es mantenida por interacciones de varios solventes débiles entre las moléculas de proteínas y la interacción de residuos de aminoácidos fosforilados de las caseínas con los nanoclusters del fosfato de calcio, los cuales se encuentran aleatoriamente dispersos por toda la micela de caseína. Tal es el caso de la interrupción de las interacciones entre proteínas o bien entre las proteínas y los nanoclusters de fosfato de calcio que las micelas de caseína se ven fácilmente alteradas. Por medio de mediciones de dispersión de luz se ha demostrado que el entrecruzamiento intra-micelar no altera la estructura de la micela de caseína (Huppertz y de Kruif, 2007). Sin embargo, otros estudios de dispersión luminosa, han demostrado que el entrecruzamiento intra-micelar disminuye considerablemente la susceptibilidad de rompimiento de las micelas de caseínas, finalmente ablandando las partículas de caseína las cuales son completamente estables contra el rompimiento, hinchamiento o encogimiento bajo la influencia de los cambios en la calidad del solvente, por ejemplo partículas de nanogel de caseína (Smiddy *et al.*, 2006; Huppertz y de Kruif, 2007).

La estabilidad del coloide formado por las micelas de caseínas así como el mantenimiento de la estabilidad del sistema durante el tratamiento térmico o bien en un medio con alcohol, se ve fuertemente afectado por el entrecruzamiento de caseína por efecto de la transglutaminasa. La estabilidad del coloide formado por las micelas de caseína se logra por el rompimiento de la  $\kappa$ -caseína proveniente de la superficie de la micela. La estabilidad del coloide puede ser reducida

removiendo o bien colapsando ese fragmento de la proteína (De Kruif, 1999).

Los cambios producidos en las propiedades funcionales de las caseínas, como consecuencia del entrecruzamiento enzimático, ofrecen un amplio rango de aplicaciones en alimentos. Como por ejemplo las propiedades de coagulación ácida en micelas de caseínas tratadas con transglutaminasa permiten el mejoramiento en la textura y estabilidad de yogurt bajo en grasa, así como la opción de disminuir la cantidad de proteína necesaria para lograr una textura agradable en este mismo producto. Su aplicación en la elaboración de quesos obtenidos por coagulación enzimática con renina no es recomendable, ya que limita la coagulación de las caseínas. Sin embargo, su aplicación en la elaboración de leche ultrapasteurizada sí es muy aconsejable, ya que, al incrementar la estabilidad de las caseínas a la coagulación enzimática, se evita así la degradación de ésta por efecto de reacciones de bacterias conteniendo proteasas o con acción proteolítica. Además de esto, existe la posibilidad de evitar la labilidad a gelatinizar causada por la disociación de las caseínas en la elaboración de leche evaporada y concentrada (Huppertz, 2009).

## Conclusión

Las proteínas lácteas son muy susceptibles a sufrir modificaciones en su estructura dando como resultado un proceso de desnaturalización. En muchos casos, este fenómeno es un proceso intencional para la obtención de derivados de la leche, tales como queso y yogurt, entre otros. Sin embargo, la desnaturalización puede ser una señal de mala calidad en la leche fluida, como en el caso de una separación de fases o acidez. Dependiendo del tratamiento aplicado en la leche (altas presiones, temperatura, presencia de sales,

enzimas, cambios de pH, etc.) será el tipo de desnaturalización que sufrirá, con una alteración única en sus propiedades funcionales. El conocimiento, así como la combinación de nuevas tecnologías con los métodos tradicionales, permiten el desarrollo de nuevos productos con propiedades funcionales únicas aprovechando lo mejor de cada tecnología.

## Agradecimientos

A la Universidad de las Américas Puebla y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) por el financiamiento recibido para la realización de este trabajo.

## Referencias

- Adams, A., De Kimpe, N. y Van Boekel, A.J.S. 2008. Modification of casein by the lipid oxidation product malondialdehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56:1713-1719.
- Alvarado, C., Zerpa, G., Meléndez, B., Gimenez, O. y Vivas, I. 2006. Uso de la prueba del alcohol en la estimación de la estabilidad proteica en leche de un rebaño holstein de la zona central de Venezuela. Resumen. *XIII Congreso Venezolano de Producción en Industria Animal*. San Juan de los Morros, Venezuela.
- Ando, H. Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H. y Motoki, M. 1989. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural Biology and Chemistry*. 53(10):2613-2617.
- Anema, S.G. y Li, Y. 2003. The association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted milk and its effect on casein micelle size. *Journal of Dairy Research*. 70:73-83.
- Badui, S. 1993. *Química de los Alimentos*. Pearson Educación, México. pp. 125-209.
- Barreiro, J.F. y Seselovsky, R. 2003. Usos de la transglutaminasa en la industria alimentaria.

- Elaboración de carne reconstruida. *Invenio*. 6(010):157-164.
- Bouchoux, A., Cayemite, P-E., Jardin, J., Gésan-Guizieu, G. y Cabane, B. 2009. Casein micelle dispersions under osmotic stress. *Biophysical Journal*. 96:693-706.
- Cavallieri, F.A.L., Costa-Netto, A.P., Menossi, M. y Da Cunha, L.R. 2007. Whey protein interactions in acid cold-sets gels at different pH values. *Lait*. 87:535-554.
- Chobert, J-M. 2003. Milk protein modification to improve functional and biological properties.
- Considine, T., Patel, H.A., Anema, S.G., Singh, H. y Creamer, L.K. 2007. Interaction of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments - A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 8:1-23.
- Czernicka, M., Domagala, J., Sady, M. y Wieteska, I. 2009. Functional properties of milk proteins modified by transglutaminase depending on incubation conditions with the enzyme. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 25:737-743.
- Dalgleish, D.G. 1992. Bovine milk protein properties and the manufacturing quality of milk. *Livestock Production Science*. 35:75-93.
- Dalgleish, D.G., Spagnuolo, P.A., Goff, H.D. 2004. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*. 14:1025-1031.
- Datta, N., Hayes, M.G., Deeth, H., y Kelly, A.L. 2005. Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenisation on milk. *Journal of Dairy Research*. 72:1-7.
- de Kruif, C.G. 1999. Casein micelle interactions. *International Dairy Journal*. 9:183-188.
- de Kruif, C.G. 2003. Caseins. *Progress in Biotechnology*. 23: 219-269.
- Erdem, Y.K. 2006. Modification of casein micelle structure caused by ultrafiltration and heat treatment: A spectrofluorimetric and kinetic approach. *Journal of Food Engineering*. 74:536-541.
- Færgemand, M. y Murray, B.S. 1998. Interfacial dilatational properties of milk proteins cross-linked by transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:884-890.
- Famelart, M.H., Lepesant, F., Gaucheron, F., Graet, Y.L. y Scuck, P. 1996. pH-Induced physicochemical modifications of native phosphocaseinate suspensions: influence of aqueous phase. *Lait*. 76:445-460.
- Fang, Y. y Dalgleish, D.G. 1997. Conformation of  $\beta$ -lactoglobulin studied by FTIR: Effect of pH, temperature, and adsorption to the oil-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*. 196:292-298.
- Farrell, H.M. 1988. Physical equilibria: proteins. En: N.B Wong (Ed). *Fundamentals of Dairy Chemistry*. Tercera edición. Reinhold, Nueva York. pp. 461-510.
- Farrell, H.M., Malin, E.L., Brown, E.M. y Qi, P.X. 2006. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology?. *Current Opinion in Colloid & Interfacial Science*. 11:135-147.
- Ferrandini, E., Castillo, M., López, M.B. y Laencina, J. 2006. Modelos estructurales de la micela de caseína. *Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia*. 22:5-18.
- Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. 1998. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Blackie Academic & Professional. Cork. Irlanda. p. 461.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. y McSweeney, P.L.H. 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publishers. Gaithersburg, Maryland. p.99.
- Fox, P.F. y Kelly, A.L. 2004. The caseins. En: R.Y. Yada (Ed.). *Proteins in food processing*. CRC Press. Boca Ratón EUA. pp 52-53.
- Guyomarc'H, F., Mahieux, O., Renan, M., Chatriot, M., Gamorre, V., Famelart, M-H. 2007. Changes in the acid gelation of skim milk as affected by heat-treatment and alkaline pH conditions. *Lait*. 87:119-137.
- Hayes, M.G, Fox, P.F. y Kelly, A.L. 2005. Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research*. 72:25-33.
- Hayes, M.G. y Kelly, A.L. 2003. High pressure homogenization of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity. *Journal of Dairy Research*. 70:307-313.
- Hernández, A. y Harte, F.M. 2009. Isolation of caseins from whey proteins by microfiltration modifying

- the mineral balance in skim milk. *Journal of Dairy Science*. 92(11):5357-5362.
- Huppertz, T., Kelly, A.L. y Fox, P. 2002. Effects of high pressure on constituents and properties of milk. *Journal of Dairy Science*. 12:561–572.
- Huppertz, T. y de Kruif, C.G. 2007. Rennet-induced coagulation of enzymatically cross-linked casein micelles. *International Dairy Journal*. 2007:442-447.
- Huppertz, T. 2009. Enzymatic cross-linking of milk proteins: effects on structure, stability and functionality. *SciTopics*. Disponible: [http://www.scitopics.com/Enzymatic\\_cross\\_linking\\_of\\_milk\\_proteins\\_effects\\_on\\_structure\\_stability\\_and\\_functionality.html](http://www.scitopics.com/Enzymatic_cross_linking_of_milk_proteins_effects_on_structure_stability_and_functionality.html). Adquirido: 20/08/10.
- IDF. 2007. Coagulation of milk processes and characteristics. *Bulletin of the International Dairy Federation*. 420:1-28.
- Kheadr, E., Vachon, J.F., Paquin, P. y Fliss, I. 2002. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*. 12:435–446.
- Kim, H.Y., Kim, S.H., Choi, M.J., Min, S.G. y Kwak, H.S. 2008. The effect of high pressure-low temperature treatment on physicochemical properties in milk. *Journal of Dairy Science*. 91:4174-4182.
- Lucey, J.A. 2002. Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science*. 85:281-294.
- Márquez, E., Arévalo, E., Barboza, Y., Benítez, Rangel, L. y Archile, A. 2006. Efecto de la concentración de transglutaminasa y tiempo de reacción en la estructura en la estabilidad de productos reestructurados. *Revista Científica*. 16(6):662-667.
- McMahon, D.J. y Brown, R.J. 1983. Composition, structure, and integrity of casein micelles: a review. *Journal of Dairy Science*. 67(3):499-512.
- McMahon, D.J. y Brown, R.J. 1984. Enzymatic coagulation of casein micelles: a review. *Journal of Dairy Science*. 67(5):919-929.
- McMahon, D.J. y Brown, R.J. 1990. Development of surface functionality of casein as the controlling parameter of enzymatic milk coagulation. *Colloids and Surfaces*. 44:263-279.
- Mirsky, A.E. y Pauling, L. 1936. On the structure of native, denatured, and coagulated proteins. *California Institute of Technology*. 22:439-447.
- Motoki, M. y Kumazawa, Y. 2000. Recent research trends in transglutaminase technology for food processing. *Food Science and Technology Research*. 6(3):151-160.
- Panouillé, M., Nicolai, T. y Durand, D. 2004. Heat induced aggregation and gelation of casein submicelles. *International Dairy Journal*. 14:297-303.
- Roach, A. y Harte, F. 2008. Disruption and sedimentation of casein micelles and casein micelles isolates under high-pressure homogenization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 9:1-8.
- Sandra, S. y Dalgleish, D.G. 2005. Effects of ultra-high-pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. *Journal of Dairy Science*. 15:1095–1104.
- Singh, H. y Waungana, A. 2001. Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. *International Dairy Journal*. 11:543-551.
- Smiddy, M.A., Martin, J.-E. G. H., Kelly, A.L., de Kruif, C.G. y Huppertz, T. 2006. Stability of casein micelles cross-linked by transglutaminase. *Journal of Dairy Science*. 89:1906-1914.
- Trejo R. y Harte, F. 2010. The effect of ethanol and heat on the functional hydrophobicity of casein micelles. *Journal of Dairy Science*. 93 :2338–2343.
- Van Hekken, D.L. y Holsinger, V.H. 2000. Use of cold microfiltration to produce unique  $\beta$ -casein enriched milk gels. *Lait*. 80:69-76.
- Walstra, P., Wouters, J.T. y Geurts, T.J. 2006. *Dairy Science and Technology*. Segunda edición. CRC. EE.UU. 763 p.