

ESTUDIO DE LABORATORIO DEL EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE CALCIO Y CASEÍNA, EL PH Y LA TEMPERATURA SOBRE LA INCORPORACIÓN DE PROTEÍNAS LÁCTEAS AL COÁGULO OBTENIDO POR ACCIÓN ENZIMÁTICA

Miryam S. Pires

Departamento de Química Analítica - Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - Universidad Nacional de Rosario - Suipacha 531 - 2000 - Rosario - Argentina

Adriana Alessi and Carlos A. Gatti*

Departamento de Química Física - Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - Universidad Nacional de Rosario - Suipacha 531 - 2000 - Rosario - Argentina

Recibido em 10/3/98; aceito em 18/12/98

LABORATORY STUDY OF THE EFFECT OF THE CALCIUM AND CASEIN CONCENTRATION, PH AND TEMPERATURE ON THE INCORPORATION OF DAIRY PROTEINS TO THE COAGULUM OBTAINED BY ENZYMATIC ACTION. The effect of casein concentration, Ca^{2+} concentration, temperature and pH on the amount and size of protein aggregates (fines) in the whey produced by enzymic coagulation of nonfat milk was studied in laboratory conditions. Casein concentrations about 0.3 g/L showed a minimal amount of caseins in the whey, with presence of small aggregates of casein micelles. Ca^{2+} concentrations higher than 5 mM were necessary to reduce the whey protein to a minimum constituted by protein particles smaller than casein micelles. The coagulation temperature, in the 35 - 45°C range, produced almost no variations in the whey proteins. The obtention of a minimum amount of whey proteins was possible only in a narrow pH range around 6.4. These results pointed to casein concentration and pH as important variables to be controlled in connection with the process yield.

Keywords: casein micelles; enzymic coagulation.

INTRODUCCIÓN

La coagulación de la leche es un paso común a la manufactura de cualquier clase de quesos. Se trata de la transformación de la leche fluida en un gel por desestabilización de la suspensión coloidal constituida por la fracción caseínica de las proteínas lácteas. Este gel incluye a las grasas y a la fase líquida de la leche. En más del 70% del total de los diferentes quesos producidos, la coagulación se logra por una proteólisis parcial (catalizada por quimosina) de la κ -caseína, principal responsable de la estabilidad de las micelas de caseína en suspensión, generándose las micelas de paracaseína, que así desestabilizadas se agregan espontáneamente¹. Existen numerosas variables internas y externas que condicionan el desarrollo de este proceso, cuya acción, aún no totalmente esclarecida, es objeto de intenso estudio. Las condiciones en que la coagulación enzimática se verifica tienen efecto directo sobre las características fisicoquímicas del gel resultante, tales como su firmeza, su capacidad de retención de grasas, etc. Una vez constituido, el gel desarrolla un proceso espontáneo de afirmado o contracción, con expulsión de la fase líquida (sinéresis), la que es separada del coágulo caseínico. Dicho suero, llamado suero dulce, contiene las proteínas lácteas solubles, lactosa y los componentes minerales solubles, así como diversos componentes menores. También se encuentran en esta fracción líquida la grasa y las caseínas no retenidas por el coágulo. Resulta de interés, obviamente en relación con el rendimiento del proceso, estudiar el efecto de diferentes condiciones iniciales sobre la retención de caseínas por el coágulo, con el objeto de identificar las variables directamente relacionadas con ella y estimar sus valores óptimos.

En este trabajo se tuvieron en cuenta las variables concentración de caseínas, concentración de calcio, temperatura de la coagulación y pH. Se estudió a nivel de laboratorio la coagulación enzimática de leche descremada a diferentes valores de

las variables mencionadas, analizando la cantidad de proteínas totales y caseínas en los sueros obtenidos, así como información concerniente a la presencia de partículas proteicas en dichos sueros (finos), y al tamaño de las mismas.

MATERIALES Y MÉTODOS**Preparación de las muestras de leche**

Las suspensiones de leche fueron preparadas a partir de leche descremada en polvo marca comercial MOLICO. Se reconstituyeron al 10% P/V en CaCl_2 10mM y el pH fue ajustado a 6.40 mediante el agregado de HCl 1.5 M. Se conservaron durante una noche a 4°C. La concentración de proteínas (totales y caseínas) fue determinada por el método de Kuaye con los testigos adecuados a cada caso². Las suspensiones fueron diluidas en la solución amortiguadora de pH correspondiente a la variable en estudio, estas fueron concentración de caseínas, temperatura de coagulación, concentración de Ca^{2+} y pH.

Las diluciones de la suspensión para el rango de concentración de caseínas entre 0.14-0.38 g/L fueron preparadas en una solución amortiguadora conteniendo imidazol 10 mM, 5 mM de Ca^{2+} , a pH 6.4, y la temperatura de la coagulación fue de 35°C.

El efecto de la temperatura de coagulación se evaluó en el rango de 18-45°C y las diluciones para el estudio se realizaron en la misma solución amortiguadora que la propuesta para evaluar la concentración de caseínas, excepto que se trabajó a una única concentración de la misma (0.33 g/L).

El rango evaluado en la concentración de Ca^{2+} fue de 2-9 mM, en este caso las diluciones de la suspensión de leche se realizaron en una solución amortiguadora de pH conteniendo imidazol 10mM, concentraciones variables de calcio, pH 6.4, y a una única concentración de caseína (0.32g/L). La temperatura de coagulación fue de 38°C.

El efecto de pH se estudió en el rango de 5.00-6.70. Las diluciones se realizaron en la solución amortiguadora de pH conteniendo imidazol 10mM, Ca²⁺ 5 mM y los distintos valores de pH se ajustaron con HCl 1.5M. La concentración de caseínas y la temperatura de coagulación fueron 0.32 g/L y 35°C respectivamente.

Todas las diluciones fueron equilibradas a la temperatura de trabajo hasta que los valores de turbidez de las mismas permanecieron constantes (~ 2 horas).

El estado de las micelas en cuanto a forma y tamaño, en las distintas diluciones, fue seguido mediante valores de turbidez (τ) a 400nm y $\alpha = -(\partial \log \tau_\lambda / \partial \log \lambda)$, siendo τ_λ la turbidez a una dada longitud de onda y λ la longitud de onda. α fue medido calculando la pendiente de una recta $\log \tau$ vs. $\log \lambda$, en el intervalo de λ de 400 a 600 nm. El valor absoluto de α varía inversamente con el radio de la partícula y acompañado con datos de τ a una dada λ permite obtener información sobre el estado de las micelas³. La τ fue medida como absorbancia. Los valores de τ residuales debido a los glóbulos de grasa fueron medidos luego de la disociación de las micelas de caseína por el agregado de una solución de EDTA 0.11M, Na(OH) 0.15 M y Tween 20 al 0.1 % (v/v) y descontados de los valores de τ de las diluciones.

Una dilución 1/8 (v/v) de cuajo provista por COTAR S.A.(Argentina) con un poder coagulante que equivale a 100 RU se utilizó en las distintas experiencias⁴. Una alícuota de 3 mL de cada dilución (~ 0.3 g/L) fue mantenida a la temperatura de trabajo y la coagulación comenzó con el agregado de 100 μ L de la dilución de cuajo (o el equivalente de manera de mantener la misma relación entre la concentración de enzima y sustrato). Se agitó y a los 3 minutos se introdujo una barra de teflon y se giró en el seno de la solución. Las diluciones luego se centrifugaron a durante 10 minutos a 1500 rpm. En los sobrenadantes (sueros) se determinó nuevamente la concentración de proteínas, α y τ a 400nm.

Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Beckmann DU 640 utilizando cubetas de vidrio y/o cuarzo rectangulares según correspondiera.

RESULTADOS

Efecto de la concentración de Ca²⁺

La Fig 1 (A y B) muestra los valores de α y τ en las suspensiones iniciales de leche a diferentes concentraciones de Ca²⁺ y en los sobrenadantes de los coagulados obtenidos de cada una de ellas. La Fig 1 C muestra la concentración de proteínas (totales y caseínicas) en los sobrenadantes. Está expresada como % de la concentración de las mismas en las diluciones iniciales. Se observa que los valores de α en los sobrenadantes se mantienen prácticamente constantes en el rango de 2 a 7 mM Ca²⁺, adoptando valores dentro del rango de los observados para micelas de caseína en suspensión. Por consiguiente, a estas concentraciones del catión las partículas proteicas en el suero no tienen un tamaño promedio mayor que el valor observado para dichas micelas, es decir no se observan pequeños coágulos o agregados no integrados a la masa caseínica coagulada. A concentraciones de Ca²⁺ superiores se observa un aumento de los valores de α , lo que indicaría la presencia en el suero de partículas aún menores: submicelas, pequeños agregados de caseínas o proteínas aisladas. Los valores de τ a 400 nm en los sobrenadantes, por su parte, descienden en el rango de concentraciones de Ca²⁺ de 2 a 5 mM, permaneciendo luego prácticamente constantes para concentraciones superiores del catión. Este comportamiento es similar al observado para la concentración de proteínas totales y caseínicas en los sobrenadantes. Teniendo en cuenta lo previamente descrito para los valores de α , podemos señalar que la cantidad de proteínas en el suero, parte de ellas al menos en forma de partículas de tamaño no mayor al de las

micelas de caseína, decrece al aumentar la concentración de calcio, alcanzando un valor mínimo prácticamente constante a partir de 5 mM. A valores superiores a 8 mM, por otra parte, el tamaño de las partículas liberadas se reduce a valores propios de las proteínas no agregadas.

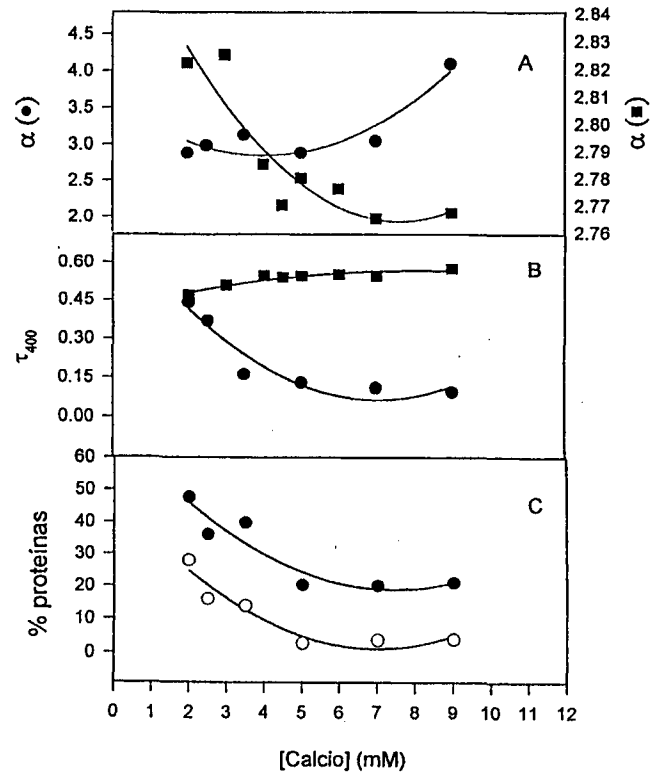


Figura 1. Efecto de la concentración de calcio.

■ Dilución inicial de leche. Concentración de caseína: 0.32 g/L, solución amortiguadora de pH: imidazol 10mM, pH=6.4, concentración de calcio: variable.

Temperatura de coagulación: 38°C.

●, ○ Sobrenadante de la coagulación.

A: valores de α , B: valores de τ a 400 nm, C: % de proteínas totales (●), % de caseínas (○). Cada punto es la media de al menos cinco determinaciones

Efecto de la temperatura de coagulación

La Fig. 2C muestra que en los sueros obtenidos a temperaturas comprendidas entre 35 y 45°C la cantidad de proteínas totales y caseínicas permanece prácticamente constante. Esto se acompaña con valores de α numéricamente menores que los correspondientes a las diluciones iniciales y constantes en ese rango de temperatura (Fig. 2 A). Esto estaría indicando que en los sueros obtenidos dichas fracciones proteicas están presentes como partículas ligeramente mayores que el tamaño promedio de micelas aisladas, tal vez pequeños coágulos. La τ de estos sueros (Fig. 2 B), en cambio, muestra un aumento con las temperaturas crecientes, efecto característico de la temperatura sobre este parámetro⁵. A temperaturas inferiores a 35° hay un progresivo aumento del contenido de proteínas totales y caseínicas (Fig. 2 C), con partículas que, según los valores de α correspondientes son de menor tamaño (Fig. 2 A), posiblemente micelas pequeñas, submicelas, pequeños agregados de caseínas y proteínas no agregadas.

Efecto de la concentración de caseína

El examen de los resultados presentados en la Fig. 3 muestra que la cantidad de proteínas (totales y caseínicas) presentes en el suero presentan un mínimo para concentraciones de caseína

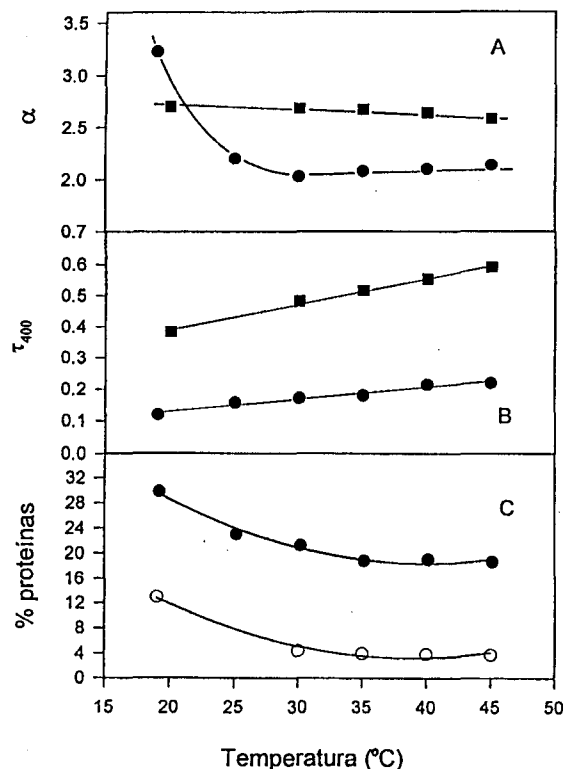


Figura 2. Efecto de la temperatura de coagulación.
 ■ Dilución inicial de leche. Concentración de caseína: 0.33 g/L, solución amortiguadora de pH: imidazol 10mM, Ca^{2+} 5 mM, pH = 6.4. Temperatura de coagulación: variable
 ●, ○ Sobrenadante de la coagulación
 A: valores de α , B: valores de t a 400 nm, C: % de proteínas totales (●), % de caseínas (○). Cada punto es la media de al menos cinco determinaciones

cercanas a 0,3 g/L (Fig. 3 C). Este efecto es más marcado para el contenido caseínico de los sueros. Los valores de α y τ (Fig. 3 A y B) indican que a concentraciones inferiores a 0,3 g/L la fracción proteica en el suero está constituida por partículas de tamaño inferior al promedio de las micelas de caseína, tal como las que se observan a bajas temperaturas y a bajas concentraciones de Ca^{2+} . Por el contrario, para concentraciones iniciales de caseína superiores a 0,3 g/L las fracciones proteicas en suero muestran valores de α y τ que indican la presencia de agregados de tamaño mayor que el de las micelas de caseína, probablemente pequeños coágulos que no son retenidos por la malla de la masa coagulada principal.

Efecto del pH

La Fig. 4 C muestra que a valores de pH inferiores a 6,4 se observan cantidades importantes de proteínas (totales y caseínicas) en los sueros. Esto se acompaña con valores del parámetro α (Fig. 4 A) comparables a los de las micelas de caseína o agregados ligeramente mayores, aunque los correspondientes valores de τ (Fig. 4 B) son inferiores. Debe tenerse en cuenta que la acidificación del medio trae aparejada la desmineralización de las micelas, lo que estaría relacionado con la disminución de su turbidez⁶. Hay una estrecha zona de valores de pH alrededor de 6,4 donde se observa un valor mínimo en el contenido de proteínas totales y caseínicas, posiblemente con presencia de pequeños coágulos según los valores de α y τ , con un mínimo en τ correspondiente a la menor concentración de proteínas. Superados estos valores de pH, la cantidad de proteínas y el tamaño de las partículas que la constituyen vuelven a valores similares a los anteriores.

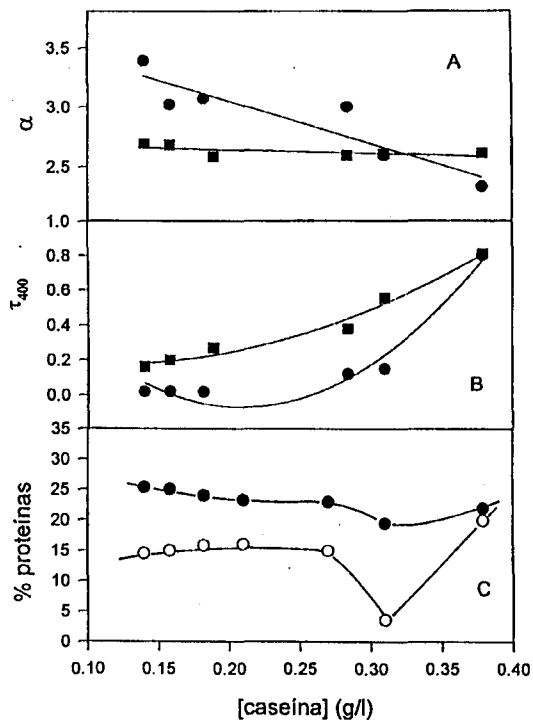


Figura 3. Efecto de la concentración de caseína.
 ■ Dilución inicial de leche. Concentración de caseína: variable, solución amortiguadora de pH: imidazol 10mM, Ca^{2+} 5 mM, pH=6.4. Temperatura de coagulación: 38°C
 ●, ○ Sobrenadante de la coagulación
 A: valores de α , B: valores de t a 400 nm, C: % de proteínas totales (●), % de caseínas (○). Cada punto es la media de al menos cinco determinaciones

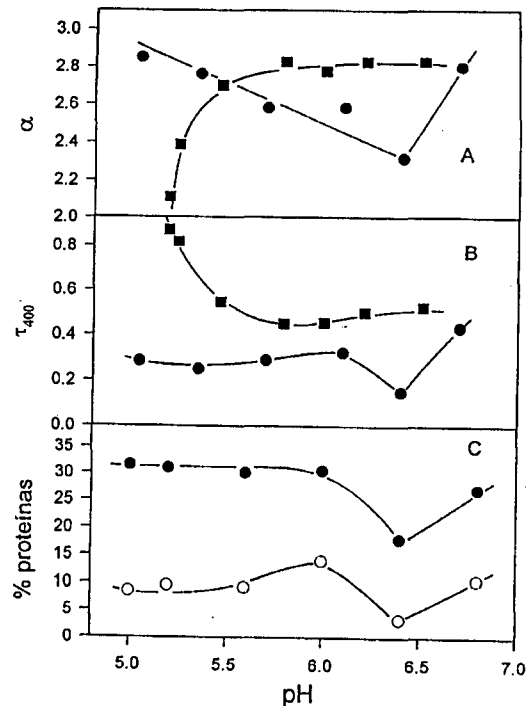


Figura 4. Efecto del pH.
 ■ Dilución inicial de leche. Concentración de caseína: 0.32 g/L, solución amortiguadora de pH: imidazol 10mM, Ca^{2+} 5 mM, pH: variable. Temperatura de coagulación: 38°C
 ●, ○ Sobrenadante de la coagulación
 A: valores de α , B: valores de t a 400 nm, C: % de proteínas totales (●), % de caseínas (○). Cada punto es la media de al menos cinco determinaciones.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Este estudio ha sido realizado para un caso particular (leche descremada reconstituida a partir de polvo) y en escala de laboratorio. Sin embargo, su examen a la luz de la abundante información bibliográfica relacionada con el comportamiento de las micelas de caseína en distintas condiciones, permite llegar a conclusiones de cierta generalidad. Debe tenerse en cuenta que los parámetros estudiados influyen de distintas maneras sobre la compleja estructura de las micelas de caseína, actuando a través de ese efecto sobre el proceso de coagulación enzimática, y también directamente sobre este último.

El denominado fosfato de calcio coloidal juega un rol fundamental en la unión de caseínas y submicelas para constituir la estructura micelar¹, y siendo el Ca^{2+} parte de ese complejo resulta de gran importancia la concentración del mismo para el mantenimiento de dicha estructura. Así se observa que a concentraciones de Ca^{2+} menores a 2 mM se produce la desintegración de las micelas de caseína^{1,7}. La disociación del fosfato de calcio coloidal trae aparejada la liberación parcial de caseínas, especialmente caseína κ , que es la que está menos fosforilada. Los cambios introducidos de esta manera en la estructura superficial de las micelas afectarían no solo a la velocidad de coagulación, sino también el proceso de entrecruzamiento y afirmado del coágulo. Además, la concentración de Ca^{2+} en el medio está íntimamente ligada a la velocidad del proceso de agregación de las micelas de caseína parcialmente proteolizadas por quimosina, es decir la segunda etapa de la coagulación enzimática^{8,9}. Esta acción sobre la velocidad de agregación estaría relacionada no sólo a las posibles modificaciones estructurales introducidas por disociación del fosfato de calcio coloidal, sino también a modificaciones de carga con neutralización, por el Ca^{2+} , de residuos negativos de las micelas. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio mostraron que dicha velocidad alcanza un valor máximo para el sistema que nos ocupa a concentraciones de Ca^{2+} mayores que 7 mM. De acuerdo a lo observado en el presente trabajo, 5 mM aparece como una concentración de Ca^{2+} mínima para reducir la presencia de proteínas (totales y caseínicas) en los sueros, con posibilidad de utilizar concentraciones mayores de acuerdo a la velocidad de coagulación deseada.

El rango de temperaturas de coagulación que se evaluó no introdujo mayores variaciones en la incorporación de material caseínico a la fracción coagulada. Temperaturas bajas, del orden de 20°C, aumentaron ligeramente la pérdida de caseína al suero, a la vez que reducen considerablemente la velocidad de coagulación, especialmente por lentificación de la segunda etapa. Se trata de un efecto generalmente atribuido a un aumento de la estabilidad estérica de las micelas de paracaseína, debido a proyección de β -caseína al exterior de las mismas^{1,10,11}.

Los resultados obtenidos con la concentración de caseína variable indican que existe una concentración a la cual la pérdida proteica sería mínima, correspondiendo en nuestro sistema a una concentración de 0,30g/L. Tanto la primera como la segunda etapa de la coagulación verán aumentada su velocidad por el aumento de concentración proteica^{9,11,12}. Las pérdidas podrían relacionarse con la constitución de la malla del coágulo que necesitaría una concentración mínima de proteínas para su óptima formación. A valores menores de caseínas la constitución de esta malla podría ser defectuosa y parte de los coágulos se perderían. Y a concentraciones de caseínas mayores algunos coágulos menores podrían no integrarse a la malla general. El empleo de leches concentradas como punto de partida para la

elaboración de quesos se ha mencionado como una posibilidad para conseguir un aumento de rendimiento¹³. Sin embargo, los resultados obtenidos estarían señalando que la retención de caseínas presenta valores óptimos en un cierto rango de concentraciones iniciales, es decir que el simple aumento de la concentración inicial de caseínas en la leche no se traduce linealmente en un aumento de la proteína incorporada al producto final.

El pH inicial de la leche es una variable que requiere control cuidadoso, ya que pequeñas variaciones de la misma pueden afectar en forma importante los resultados de la coagulación¹⁴. Los cambios de pH influyen marcadamente en las características estructurales de las micelas de caseína^{7,8}. A valores de pH inferiores a 6,5 existe un proceso de desmineralización de las micelas por disolución del fosfato de calcio coloidal. La estructura proteica, sin embargo, se mantiene hasta valores del orden de 5,5⁶. En este rango de pH se observa un aumento de la velocidad de la etapa de agregación de las micelas de paracaseína, atribuida generalmente a la protonación de residuos proteicos negativos, con la consiguiente disminución del potencial ζ ^{15,16}. A valores inferiores de pH las micelas de caseína sufren un aumento de tamaño por reordenamiento de sus componentes y solvatación¹⁵. Estas modificaciones indudablemente influyen de manera compleja no sólo en la cinética del proceso de coagulación enzimática, sino también en las características estructurales del gel resultante. La obtención de mínimas cantidades de proteínas (totales y caseínicas) en suero en un estrecho rango de valores de pH alrededor de 6,4, en nuestras condiciones de trabajo, pueden ser el resultado de una combinación de los efectos mencionados. En general, los resultados obtenidos muestran que la optimización de la incorporación de material proteico al gel resultante de la coagulación enzimática de la leche requeriría un estrecho control de las variables aquí estudiadas, especialmente en lo que se refiere a concentración de caseína y pH.

REFERENCIAS

1. Walstra, P.; *J. Dairy Sci.* **1990**, *73*, 1965.
2. Kuaye, A. Y.; *Food Chem.* **1994**, *49*, 207.
3. Horne, D. S.; *J. Colloid Interface Sci.* **1986**, *111*, 250.
4. Gatti, C. A. and Pires, M. S.; *J. Dairy Res.* **1995**, *62*, 667.
5. Journick, Th. J. M.; *Neth. Milk Dairy J.* **1992**, *46*, 183.
6. Law, A. J. R.; *J. Dairy Res.* **1996**, *63*, 35.
7. Walstra, P. and Jenness, R.; *Dairy Chemistry and Physics*. John Wiley & Sons, New York, 1984.
8. McMahon, D. J. and Brown, R. J.; *J. Dairy Sci.* **1984**, *67*, 919.
9. Carlson, A.; Hill, C. and Olson, N.; *Biotechnol. Bioeng.* **1987b**, *29*, 590.
10. Dalgleish, D. G.; *J. Dairy Res.* **1983**, *50*, 331.
11. Gatti, C. A.; Pires, M. S.; Orellana, G. A. and Pereyra, J. F.; *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1996**, *92*, 2575.
12. Carlson, A.; Hill, C. and Olson, N.; *Biotechnol. Bioeng.* **1987a**, *29*, 590.
13. Guinee, T.; Pudja, P. D. and Mulholland E. O.; *J. Dairy Res.* **1994**, *61*, 117.
14. Leaver, J.; Law, A. J. R.; Horne, D. S. and Banks, J. M.; *Int. Dairy J.* **1995**, *5*, 129.
15. Gastaldi, E.; Lagaude, A. and Tarodo de la Fuente, B.; *Journal of Food Science* **1996**, *61*, 59.
16. Van Hooydonk, A. C. M.; Hagedoorn, H. G. and Boeritger, Y. J.; *Neth. Milk Dairy J.* **1986**, *40*, 281.