

# ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE GELES ÁCIDOS DE PROTEÍNAS LÁCTEAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA

## STRUCTURAL ANALYSIS OF MILK PROTEIN GELS ACIDS BY OPTICAL MICROSCOPY

Costa J. P.<sup>1</sup>, Riso P.<sup>2</sup>, Riquelme B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Area Física, FCByF (UNR) - Óptica  
Aplicada a la Biología, IFIR (CONICET-UNR)  
<sup>2</sup> Area Fisicoquímica, FCByF (UNR)

e-mail: [riquelme@ifi-conicet.gov.ar](mailto:riquelme@ifi-conicet.gov.ar), [bibiana\\_riquelme@yahoo.com.ar](mailto:bibiana_riquelme@yahoo.com.ar)

En este trabajo se evaluó el efecto en la formación y en la estructuración de geles proteicos inducidos por distintas relaciones de GDL mediante el análisis digital de imágenes obtenidas en un microscopio óptico invertido. Se determinó el diámetro medio de los poros formados durante el proceso de gelificación y se graficó en función de la concentración de GDL, ajustándose con una función asintótica.

Palabras Claves: GDL (glucono-delta-lactona), CN (caseínas bovinas), MC (micelas de caseína)

This study evaluated the effect on the formation and structure of protein gels induced by different relations of GDL through digital analysis of images obtained in an inverted light microscope. We determined the average diameter of the pores formed during the gelation process and is plotted as a function of the concentration of GDL, in line with an asymptotic function

Key Word: GDL (glucono-delta-lactone), CN (bovine caseins), MC (casein micelles)

### I. INTRODUCCIÓN

Las proteínas lácteas de origen bovino tienen gran importancia para la industria de los alimentos dado su elevado valor nutricional y funcional.

Las caseínas bovinas (CN) son fosfoproteínas que se encuentran en la fase acuosa de la leche como agregados coloidales estables llamados micelas de caseína (MC). Las fracciones principales de CN ( $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$  - y  $\kappa$  - CN) pueden ser precipitadas a pH 4.6, y resolubilizadas en soluciones de álcalis, obteniéndose sus sales, los caseinatos (CAS). CN y CAS definen las propiedades reológicas de los derivados lácteos ya que la pérdida de su estabilidad electrostática y/o estérica conduce a la agregación proteica y posterior formación de una estructura de gel <sup>(1)</sup>. Esta desestabilización puede conseguirse mediante acidificación, principal paso en la manufactura de ciertos tipos de quesos y otros productos lácteos fermentados. La reducción del pH puede realizarse rápidamente (acidificación directa) o lentamente (uso de cultivos lácticos)<sup>(2)</sup>. Dependiendo de la concentración y la temperatura, la hidrólisis de la glucono-delta-lactona (GDL) promueve una reducción lenta del pH <sup>(3)</sup>. La diferencia en la velocidad del proceso puede afectar el grado de dureza y elasticidad del gel formado <sup>(4)</sup>.

Los mecanismos de interacción entre ingredientes y el comportamiento de los geles formados pueden ser caracterizados a través de análisis ópticos <sup>(5)(6)</sup>.

En este trabajo se evalúa el efecto en la formación y en la estructuración de geles inducidos por la adición de distintas cantidades de GDL mediante el análisis digital de imágenes obtenidas en un microscopio óptico invertido.

### II. MATERIALES Y MÉTODOS

#### II.1 Preparación de las muestras:

Se preparó una solución acuosa de caseinato bovino (NaCAS) al 3% p/p a partir de la droga comercial (Sigma Co.). El proceso de gelificación ácida se inició por adición de GDL sólida sobre 5 g de la solución de NaCAS, a una temperatura de 35°C. Las distintas cantidades de GDL adicionadas se muestran en la Tabla 1 y se calcularon para obtener las diferentes relaciones de GDL/CN (0.35, 0.5, 0.7 y 1) de acuerdo con la ecuación (1).

$$R = \frac{\% \text{ GDL}}{\% \text{ CN}} \quad (1)$$

TABLA 1: PREPARACIÓN DE LOS DISTINTOS SISTEMAS DE MUESTRA.

Tubos	A	B	C	D
CN 3% p/p	5 g	5 g	5 g	5 g
GDL	0.0525 g	0.075 g	0.105 g	0.15 g
R	0.35	0.5	0.7	1

Para la obtención de las imágenes microscópicas se colocaron 80 µl de cada muestra a las distintas R establecidas en placas LAB-TEK II de ocho compartimientos (por duplicado).

## II.2 Metodología empleada:

Las muestras fueron observadas en un microscopio invertido (Union Optical) al cual se le acopló una cámara fotográfica digital (Canon Powershot A640). Mediante el análisis digital de las imágenes obtenidas se evaluó el efecto en la formación y en la estructuración de geles proteicos inducidos por distintas R. Se determinó el diámetro medio de los poros formados durante el proceso de gelificación y se graficó en función de la concentración de GDL, ajustándose con una función asintótica del tipo:

$$y = a - b \cdot c^x \quad (2)$$

siendo  $y$  el diámetro medio de los poros (en pixels) y  $x$  la cantidad de GDL (en g). Los parámetros obtenidos se correlacionaron con la estructura de los distintos geles.

## III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En la Figura 1 se observan las fotografías de las muestras registradas a distintos tiempos luego de la adición de GDL, pudiéndose apreciar la cinética de gelificación.

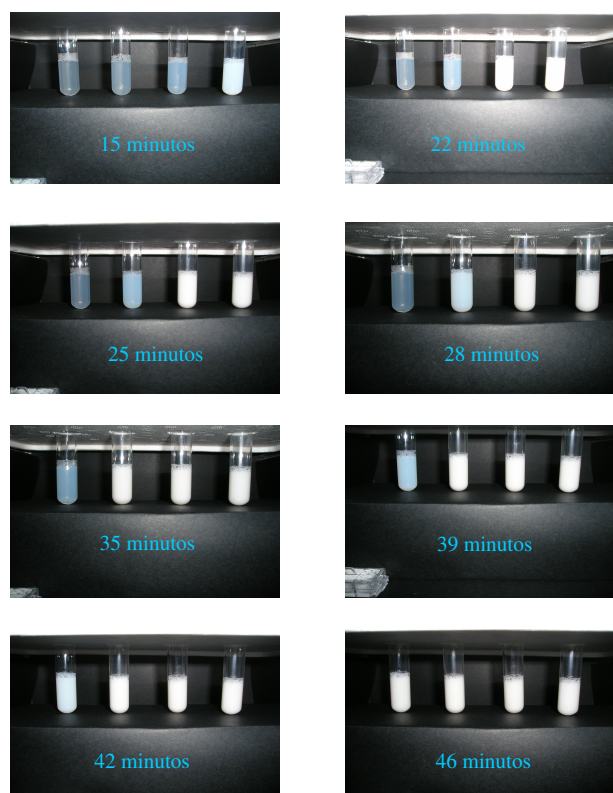
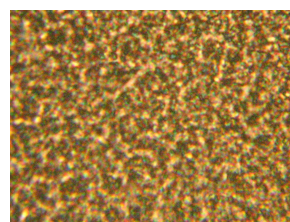


Figura 1. Visualización de la cinética de gelificación en función de la relación GDL/CN (0.35, 0.5, 0.7 y 1).

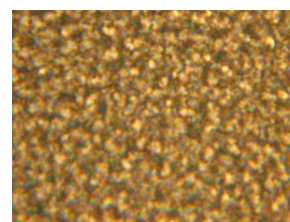
En estas imágenes se puede observar a simple vista el aumento en la velocidad de gelificación (de derecha a izquierda) con el aumento de R (0.35, 0.5, 0.7 y 1).

En la Figura 2 se observa la microestructura de los distintos geles formados para las distintas R. Realizando un análisis cualitativo de estas imágenes, se puede observar los distintos grados de estructuración de los geles: a menor velocidad de gelificación (menor R) los geles tuvieron una mayor estructuración, presentando un aspecto más compacto y con poros de menores dimensiones.

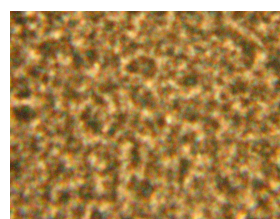
R= 0.35



R= 0.5



R= 0.7



R= 1.0

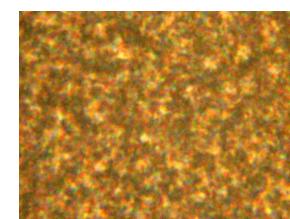


Figura 2. Imágenes de los geles obtenidas con un objetivo 100x y zoom 9.1x para distintas relaciones de GDL. Instrumental utilizado: microscopio invertido Union Optical y cámara fotográfica digital (Canon PowershotA640).

Para obtener valores cuantitativos que permitan corroborar esto, se determinó el diámetro medio de los poros con el programa Image-Pro Plus 3.0. Para ello se trazaron líneas rectas sobre las imágenes (Figura 2) y se midieron los poros formados para las distintas R. Estos valores fueron promediados y se obtuvieron los diámetros medios, los cuales fueron graficados en función de la cantidad de GDL (Figura 3). Las medidas de las distancias comprendidas entre cada banda se corresponden al diámetro de los poros formados durante el proceso de gelificación.

En la Figura 3 se observa un aumento en el diámetro medio de los poros con el aumento de la concentración de GDL. Al realizar el ajuste con la Ecuación 2, se obtuvieron los parámetros de ajuste exponencial que figuran en la Tabla 2.

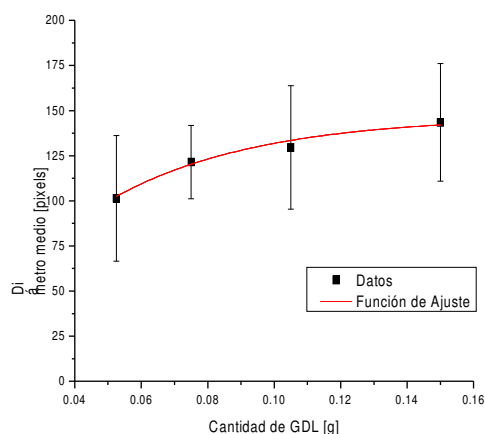


Figura 3. Diámetro medio de los poros en función de la cantidad de GDL.

TABLA 2: PARÁMETROS DEL AJUSTE EXPONENCIAL CON LA ECUACIÓN  $y = a - b \cdot c^x$

Parámetro	Valor	Desvío Estándar
Asíntota: a	146.9	9.2
Rango: b	147	69
Velocidad: c	$1.29 \cdot 10^{-10}$	$1.4 \cdot 10^{-11}$

Coefficiente de correlación  $R^2 = 0.93007$

De los valores de la tabla 2, se puede observar que el valor asintótico al que tiende la curva de la figura 3 es de  $147 \pm 9$  pixels como diámetro medio de los poros para la solución acuosa de caseinato bovino (NaCAS) al 3% p/p a una temperatura de gelificación de 35°C. Este parámetro sería dependiente de la temperatura de gelificación y de la concentración inicial de caseinato, y sería independiente de la concentración de GDL adicionada.

#### IV. CONCLUSIONES

Los resultados corroboran que el grado de compactación y el tamaño de los poros del gel dependen de la velocidad de gelificación, la cual está relacionada en forma directa a la cantidad de GDL adicionada.

Cuanto más lento sea el proceso de gelificación, hay más posibilidad de reordenamiento de las interacciones en la malla del gel, y por lo tanto, éste se torna más compacto y con poros de menor tamaño.

La presente técnica de análisis digital de las imágenes obtenidas por microscopía convencional es adecuada para realizar un análisis estructural de los geles ácidos proteicos formados por distintas relaciones de GDL/NaCAS.

#### Referencias

1. Walstra, P. & Jenness, R. (1984). *Dairy Chemistry and Physics*. Editorial Acribia S. A., Zaragoza
2. Risso P., Borraccetti M., Araujo C., Hidalgo M., Gatti C. (2008). Effect of temperature and pH on the aggregation and the surface hydrophobicity of bovine  $\kappa$ -casein, *Colloid Polymer Sci.* 286, (12), 1369-1378
3. de Kruif, G. (1997). Skim Milk Acidification. *J. Colloid Interface Sci.* 185,19-25
4. Fazani Cavallieri, A.; Lopes da Cunha, R. (2007). The effects of acidification rate, pH and ageing time on the acidic cold set gelation of whey proteins, *Food Hydrocolloids* 22, 439-448
5. Yan, L.; Yue, W.; Jiye, C. (2008). Atomic force microscopic investigations on pectin gelling made under optimum conditions. *Chemical Journal on Internet* 10, (9), P. 45
6. Lucey, J. (2002). Formation and Physical Properties of milk protein gels, *J. Dairy Sci.* 85, 281-294