

## DETERMINACION DE AGREGADOS DE BETALACTOGLOBULINA EN LECHE MEDIANTE ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DE INFRARROJO

Corona Motolinia N.<sup>a</sup>, Delgado Macuil R.<sup>a</sup>, Espinosa Ruiz H.<sup>b</sup>, Martinez Valencia B.<sup>a</sup>

a) Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del IPN, Carretera est. Sta. Ines tecuexcomac-Tepetitla Km. 1.5, C.P. 90700, Tepetitla de Lardizabal Tlaxcala, México.

b) Benemerita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ing. Química, Colegio de Ing. en Alimentos. 72570 Puebla Puebla, Mexico. \*[aidinn@hotmail.com](mailto:aidinn@hotmail.com)

### RESUMEN

La pasteurización es el método de conservación de leche más empleado, por su excelente relación efectividad/costo. El objetivo fundamental del calentamiento es la destrucción de los microorganismos patógenos, deteriorativos y la inactivación de las enzimas; sin embargo, se pueden presentar algunos cambios de naturaleza fisicoquímica. Los efectos dependen de la combinación temperatura-tiempo. Al calentar la leche, la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ LG) reacciona con otras proteínas lácteas, generando complejos  $\beta$ LG- $\beta$ LG y  $\kappa$ -caseína- $\beta$ LG principalmente. El objetivo del presente trabajo es evaluar el tipo de agregado proteico generado por efecto del tratamiento térmico, utilizando una metodología alternativa a las que actualmente se utilizan por medio de espectroscopia de IR por transformada de Fourier (FTIR). Inicialmente se trató la leche con tres diferentes condiciones de pasteurización, 63°C/30 minutos, 72 °C y 78 °C/1 minuto, la cinética de pasteurización se siguió por medio de un sistema peltier en el equipo IR en el modo ATR. Los tiempos de medición fueron cada 2 minutos para 63 °C y cada 10 segundos para los otros tratamientos; los resultados espectrales mostraron que en los primeros tiempos de cada tratamiento se generaban en mayor cantidad el complejo  $\kappa$ CN- $\beta$ LG y cuando los tiempos se incrementaban formaba mayor cantidad del complejo  $\beta$ LG- $\beta$ LG.

### ABSTRACT

Three model systems were prepared with  $\geq 90\%$  pure proteins ( $\beta$ LG,  $\alpha$ CN,  $\beta$ CN and  $\kappa$ CN) in the same proportion found in bovine milk:  $\beta$ LG-only,  $\beta$ LG+ $\kappa$ CN and  $\beta$ LG + all CN fractions (AF). Proteins were reconstituted in water and subjected to either pasteurization (63°C/30 min; 72°C, 15 s) and intense heat treatment (83°C, 2 min) to observe IR response of protein interactions under such conditions. Later on, changes in milk proteins in standardized raw milk (3% fat) subjected to heat treatments at the same temperatures as above were followed by FTIR spectroscopy in Attenuated Total Reflectance mode. Measurements were conducted every 2 minutes at 63°C and every 10 s for the remaining treatments. Peaks in amide I region were detected in both heat-treated model systems and milk. Peaks at 1632 and 1640  $\text{cm}^{-1}$  were associated to  $\beta$ LG-  $\beta$ LG polymer formation in  $\beta$ LG -only systems. Peaks appeared at 1652  $\text{cm}^{-1}$  and 1716  $\text{cm}^{-1}$  in  $\beta$ LG + $\kappa$ CN systems whereas all four peaks with similar intensities were detected in all  $\beta$ LG + AF systems, although those pertaining to complex formation appeared first. Similarly, peak behavior in the amide I band of milk spectra changed depending on treatment intensity.

**Palabras clave:**  $\beta$ -lactoglobulina, agregados de proteínas, FTIR.

**Área:** Microbiología y Biotecnología

## **INTRODUCCIÓN**

La leche es una de las materias primas alimenticias más relevantes desde el punto de vista nutricional y comercial; particularmente la de origen bovino, es uno de los productos alimenticios de mayor consumo a nivel mundial. La producción de leche en México representa 1.8% del mercado mundial, con 11,033,000 toneladas.

La pasteurización es el tratamiento más común para eliminar microorganismos patógenos y gran parte de microorganismos deteriorativos en leche. Sin embargo, se ha demostrado que este proceso conlleva cambios importantes en las propiedades fisicoquímicas, reológicas, microestructurales y sensoriales de leche fluida y, en consecuencia, de otros productos lácteos. Las altas temperaturas pueden provocar efectos indeseables en la leche, como alteraciones del sabor, pardeamiento no enzimático ó desnaturalización proteica, etc. (Fox y Mc Sweeney, 1998). El seguimiento de posibles modificaciones de proteínas lácteas por procesos de conservación térmica es de vital importancia para establecer criterios de uso para la leche. Para el análisis de las posibles modificaciones en las proteínas lácteas, se han empleado métodos convencionales (cromatografía líquida, difracción de rayos X, electroforesis en gel de poliacrilamida, etc.), pero resultan ser costosos. Además, por el volumen de producción se hace necesaria la implementación de técnicas de análisis que permitan una toma de decisiones rápida y objetiva. Dentro de este contexto, las técnicas ópticas, como la espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) representan una opción de consideración (Muller, et al., 2004).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestra de leche**

La leche bovina empleada en este trabajo fue obtenida de un proveedor local, descremada a 40°C el mismo día de su recolecta empleando una descremadora centrífuga eléctrica (LKL, Bulgaria), trabajando a 10500 rpm. Una vez separada la leche en fracciones de leche descremada y crema se determinó la composición de ambas mediante un analizador de leche ultrasónico (Lactoscan S, Milkotronik LTD, Nova Zagora, Bulgaria). Las fracciones se mezclaron en proporciones conocidas para estandarizar la leche a una composición ajustada al 3% de grasa.

### **Espectros de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)**

Los espectros de IR se obtuvieron en un equipo FTIR Bruker Vertex 70 en la región de 600 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando el modo de ATR con un cristal de diamante de una reflexión. Se tomaron 20  $\mu\text{l}$  de cada muestra de leche y se colocaron en el porta

muestras del equipo, analizándose por triplicado. A cada muestra se le dio un tiempo de adquisición de 120 s, por lo tanto, los espectros finales mostrados en este trabajo, son el resultado del promedio de 360 mediciones. El porta muestras tiene implementado un sistema de calentamiento Peltier con capacidad de control digital de temperatura de hasta 120°C con módulo de control externo digital (PIKE Technologies, Madison, WI) y software de control de temperatura y se realizaron cinéticas bajo temperatura controlada de 63°C, 72°C, y 83°C.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Sistemas modelo

En la Figura 1 se muestra el arreglo de los espectros de cada estándar de proteína láctea en solución acuosa, sin tratamiento utilizando como línea base agua; las líneas negra, roja y azul, pertenecen a las caseínas  $\beta$ ,  $\alpha$  y  $\kappa$  respectivamente y la línea verde es  $\beta$ LG.

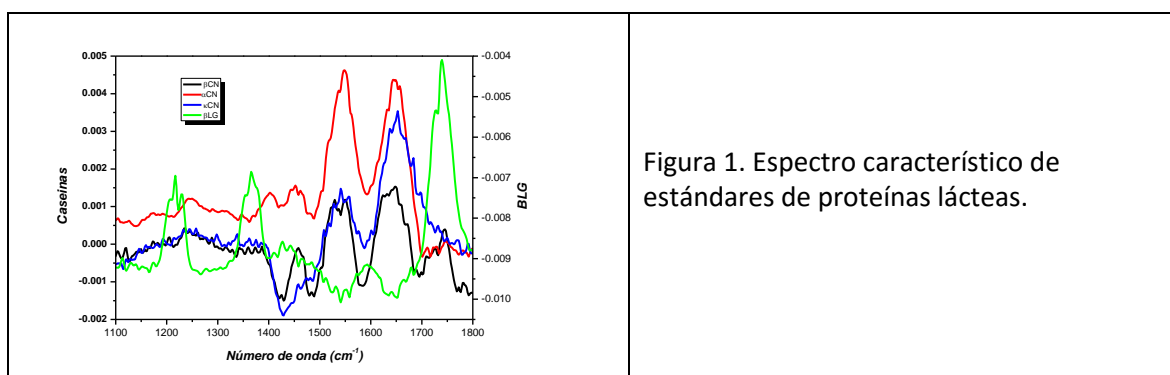


Figura 1. Espectro característico de estándares de proteínas lácteas.

En la Figura anterior se observa una región característica a las caseínas que es de 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$  y de 1600-1500  $\text{cm}^{-1}$  propias de las vibraciones asociadas a la amida I y a la amida II respectivamente, dichas regiones se han identificado basados en estudios teóricos y experimentales (Ram, 2000). En contraste para  $\beta$ LG se observa también la presencia de la Amida III que va de 1350-1200  $\text{cm}^{-1}$ , lo que revela que tiene una estructura más compleja debido a que se trata de una proteína globular (Swaigood, 2000). Se procedió a observar el comportamiento espectral en los sistemas modelos planteados en la metodología.

En la Figura 2 se observa la cinética de agregación de  $\beta$ LG en solución acuosa tratada en el sistema peltier a 63°C monitoreada por 60 min. En la figura se señala la cinética de agregación de  $\beta$ LG- $\beta$ LG en el que en los picos asociados al polímero  $\beta$ LG- $\beta$ LG (1632 y 1642  $\text{cm}^{-1}$ ) (Considine *et al.*, 2007) presentan incremento en intensidad conforme al tiempo, se observa en línea color verde como hay un incremento en intensidad considerable al minuto 18, pero en el minuto 42 (línea color verde olivo) se observa el mayor incremento en intensidad, lo cual está

totalmente de acuerdo con la bibliografía, debido a que a ese tiempo y esa temperatura ya la proteína se encuentra desnaturalizada (Walstra, 2001); y la banda asociada al complejo  $\beta$ LG- $\kappa$ CN ( $1715\text{ cm}^{-1}$ ) no presenta cambios, debido a que no hay presencia de  $\kappa$ CN en el sistema modelo.

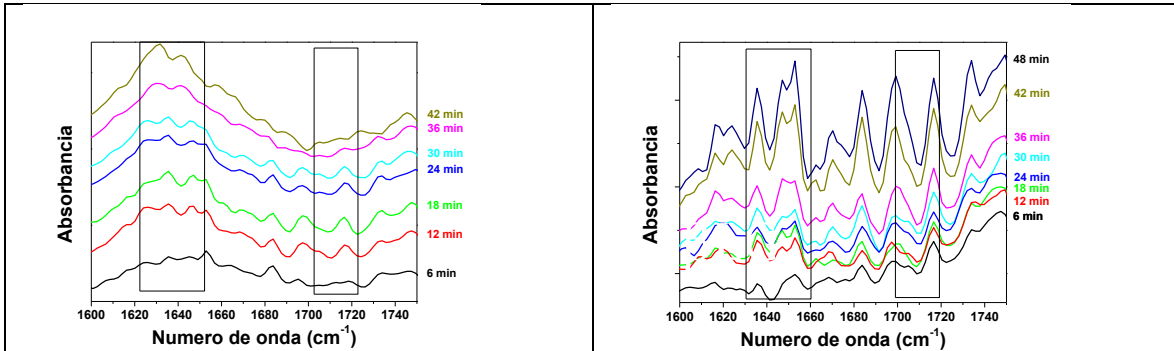


Figura 2. Espectro de absorción de  $\beta$ LG- $\beta$ LG en solución acuosa a  $63^{\circ}\text{C}$  en sistema Peltier.

Figura 3. Cinética de agregación de  $\beta$ LG-  $\kappa$ CN en agua a  $63^{\circ}\text{C}$  en sistema Peltier.

En la Figura 3 se presenta el espectro de la cinética de agregación de las proteínas BLG- $\kappa$ CN en sistema acuoso, tratadas en sistema peltier. En la figura se observa el comportamiento espectral de la cinética de agregación de las proteínas  $\beta$ LG y  $\kappa$ CN tratadas a  $63^{\circ}\text{C}$ , en el cual hay incremento en intensidad en los picos asociados al polímero  $\beta$ LG- $\beta$ LG ( $1631$  y  $1641\text{ cm}^{-1}$ ) principalmente a partir del minuto 36 (línea color rosa), sin embargo el mayor incremento en intensidad se da en los picos asociados al complejo  $\beta$ LG- $\kappa$ CN ( $1652$  y  $1715\text{ cm}^{-1}$ ), a partir del minuto 30 (línea color azul claro).

En la Figura 4 se observa el espectro de absorción de todas las proteínas al ser tratadas a  $63^{\circ}\text{C}$ , en el cual se observa el incremento sistemático o paulatino de los dos picos asociados al complejo  $\beta$ LG- $\kappa$ CN, sin embargo a partir de los 12 minutos del tratamiento se presenta el incremento en intensidad en los picos asociados al polímero  $\beta$ LG- $\beta$ LG, sin que esta intensidad rebase en ningún tiempo a la intensidad presentado por el pico a  $1652\text{ cm}^{-1}$ .

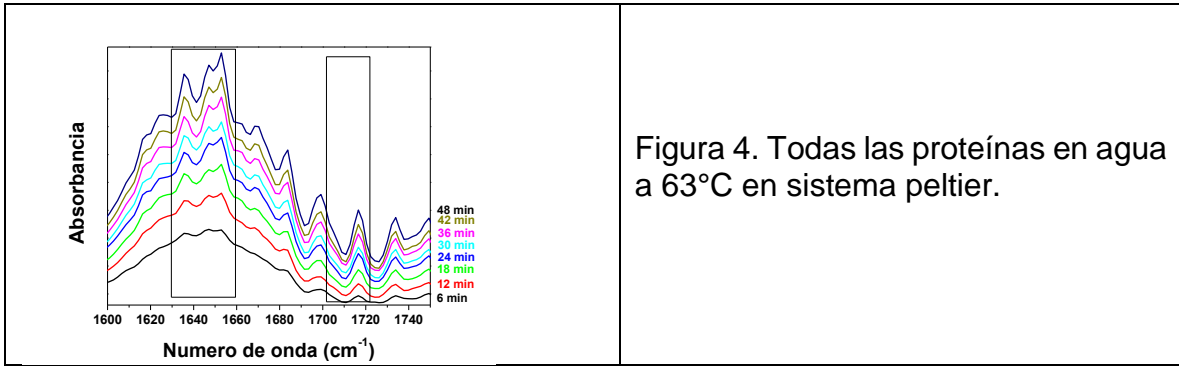


Figura 4. Todas las proteínas en agua a 63°C en sistema peltier.

En la Figura 5 se observa como desde el principio del tratamiento no se presentó la formación del complejo  $\beta$ LG- $\kappa$ CN debido a que no hay presencia de  $\kappa$ CN y durante la cinética se aprecia el incremento en intensidad de los picos asociados al polímero  $\beta$ LG- $\beta$ LG. En la figura 6 se observa como para el incremento a 72°C, en los primeros 10 segundos (línea negra) del tratamiento se definen los cuatro picos asociados tanto al polímero como al complejo; cuando se continua con el tratamiento térmico, se presentan mayores cambios en intensidad en los picos asociados al polímero  $\beta$ LG- $\beta$ LG, mostrando dicho comportamiento desde los 40 seg (línea roja), mientras que el pico a 1715 no presentan más cambios en intensidad después de los 70 segundos (línea verde), lo cual concuerda con bibliografía, debido a que a este tiempo ya excede la pasteurización (PMO, 2007) y se reporta que hay mayor presencia de polímero.

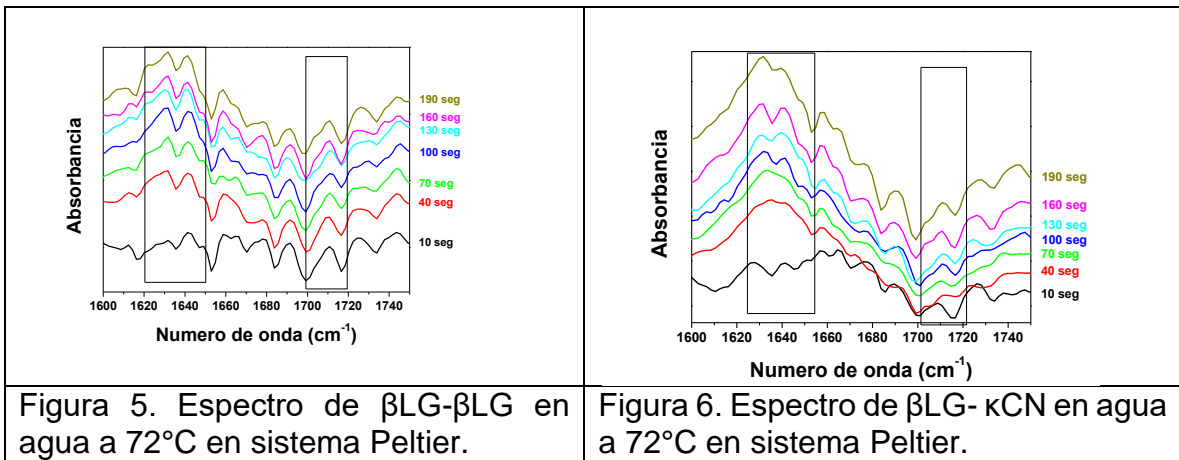


Figura 5. Espectro de  $\beta$ LG- $\beta$ LG en agua a 72°C en sistema Peltier.

Figura 6. Espectro de  $\beta$ LG-  $\kappa$ CN en agua a 72°C en sistema Peltier.

En la Figura 7 se presenta el espectro FTIR de todas la proteínas en sistema acuoso tratadas en sistema peltier a 72°C, se monitorean cada 30 seg. En la figura se observa el comportamiento de todas las proteínas al estar juntas, se señala el incremento de intensidad en los picos asociados al complejo  $\beta$ LG- $\kappa$ CN y al polímero  $\beta$ LG- $\beta$ LG, siendo este último el que presenta los mayores cambios en intensidad.

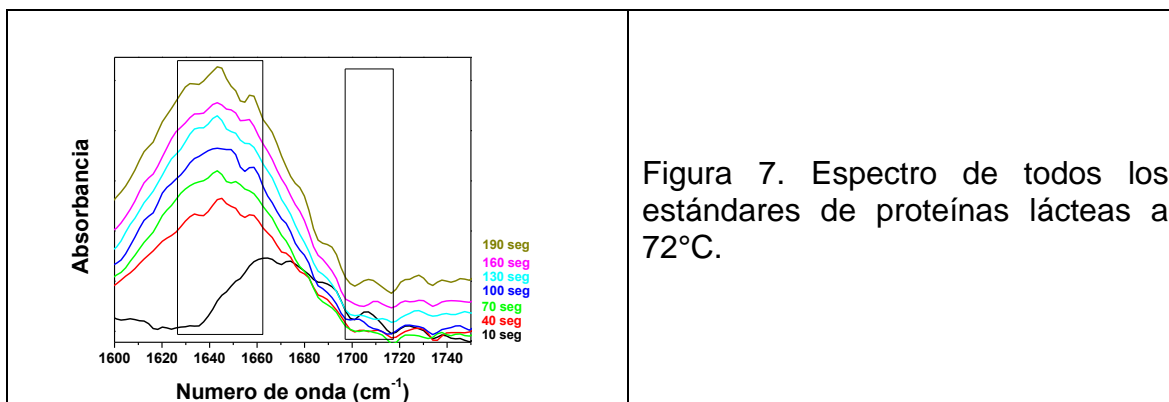


Figura 7. Espectro de todos los estándares de proteínas lácteas a 72°C.

Se observó el mismo comportamiento en leche tratada en sistema peltier y en los estándares de proteínas diluidos en SMUF en el que con tratamiento a 63°C se tiene una mayor presencia de complejo  $\beta$ LG-  $\kappa$ CN, mientras que a 72°C se tiene mayor en los primeros tiempos más complejo  $\beta$ LG-  $\kappa$ CN que polímero  $\beta$ LG- $\beta$ LG, pero conforme se incrementa el tiempo de tratamiento se obtiene más polímero  $\beta$ LG- $\beta$ LG y finalmente para 83°C se tiene más polímero  $\beta$ LG- $\beta$ LG que complejo  $\beta$ LG-  $\kappa$ CN. Mediante la espectroscopia de infrarrojo fue posible determinar la presencia de agregados de  $\beta$ -lactoglobulina por efectos de tratamientos térmicos en sistemas modelo

## BIBLIOGRAFIA

Fox, P.F. y P.L.H. Mc. Sweeney. 1998. Dairy Chemistry and Biochemistry. Blackie Academic and Professional. London, U.K.

Muller-Renaud, S., Dupont, D., y Dulieu, P. (2004). Quantification of  $\kappa$ -casein in Milk by an Optical Immunosensor. Food and Agricultural Immunology, 15: 265 - 277.

Ortiz Ramírez, 2009, Determinación de los componentes y adulteración de la leche por espectroscopia de FTIR, Tesis de Maestría CIBA-Tlaxcala.

Considine T., Patel H.A., Anema S.G., Singh H., Creamer L.K.; Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments — A Review, Innovative Food Science and Emerging Technologies 8 (2007) 1–23.

Walstra, T.J. Geurts, A.Noomen, A. Jellema, M. A. J. S. Van Boekel (2001). Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos (1era. ed.). España: Acribia.