

## MODELOS ESTRUCTURALES DE LA MICELA DE CASEÍNA

Structural models for the casein micelle

**E. Ferrandini<sup>1</sup>, M. Castillo<sup>2</sup>, M.B. López<sup>1</sup>, J. Laencina<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Tecnología de Alimentos Nutrición y Bromatología. Universidad de Murcia. Campus Universitario de Espinardo. 30071 Murcia. Spain. <sup>2</sup>Department of Biosystems and Agricultural Engineering. University of Kentucky. 201 C. E. Barnhart Building. KY 40546-0276 Lexington. EEUU.

Autor de referencia: Eduardo Ferrandini. Tlfno: +34 968 398735, Fax: +34 968 364147, Email: eferrand@um.es

### RESUMEN

La micela de caseína constituye un sistema coloidal muy estable en la leche. Este hecho tiene importantes implicaciones prácticas relacionadas con la formación de los geles de caseína, así como con la estabilidad de los productos lácteos durante su tratamiento térmico, concentración y almacenamiento. Por este motivo, la microestructura de la micela de caseína ha sido intensamente estudiada durante las últimas cinco décadas. A pesar de ello, existen todavía muchas lagunas sobre su estructura y estabilidad, como se refleja en los resultados derivados de recientes investigaciones basadas en el empleo de novedosas técnicas analíticas.

**Palabras clave:** Modelo, estructura, micela de caseína, caseínas, propiedades funcionales.

### ABSTRACT

Casein micelle constitutes a very stable milk colloidal system. This has significant practical implications especially regarding to casein gel formation and stability of dairy products during heating, concentration and storage. For that reason, the microstructure of the casein micelle has been intensively investigated during the last five decades. However, specific questions about micelle structure and stability are still arising as new instrumental methodologies become available.

**Key words:** Model, structure, casein micelle, casein, functional properties.

## INTRODUCCIÓN

En el interior del aparato de Golgi de las células del epitelio mamario, durante la lactación, se inicia la agregación y asociación de las distintas caseínas en partículas esféricas coloidales conocidas como micelas de caseína (Ruettimann y Ladisch, 1987), que le confieren la opalescencia característica a la leche (Swaisgood, 1996). Las micelas de caseína (-CN) son estructuras sólidas y esponjosas dispersas en un medio acuoso y que presentan un diámetro medio de 160 nm. Según Farrell et al. (2006), la función principal de la micelas es fluidificar las moléculas de caseína y solubilizar el fosfato cálcico. Dalgleish (1990) define las micelas de caseína nativa como el coloide de asociación de la leche fresca (i.e., el fosfato de calcio coloidal y las caseínas no se unen covalentemente). Por el contrario, Walstra y Jenness (1987) discrepan al considerarlas como una forma intermedia entre los coloides liófilos y los liófilos.

Las micelas de caseína están formadas por un 92% de caseína y un 8% de sales (principalmente fosfato cálcico coloidal, CCP) y contienen el 80% de la proteína total de la leche. Estudios basados en la movilidad molecular (cromatografía, electroforesis, filtración y ultracentrifugación) han puesto de manifiesto que la micela de caseína se compone de cuatro tipos principales de caseínas individuales:  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -CN (Riel, 1991; Ruettimann y Ladisch, 1987; Dalgleish, 1993; Lomholt, 1996) que se encuentran en una proporción molar media de 3:0,8:3:1 respectivamente (Farrell et al., 2006).

A estos cuatro tipos de caseínas se les puede añadir varios grupos de proteínas minoritarias como la  $\gamma$ -CN, que es un fragmento procedente de la proteólisis de la  $\beta$ -CN (Walstra y Jenness, 1987; Fox y Mulvihill, 1990) y la  $\lambda$ -CN derivada de la  $\alpha_{s1}$ -CN (Fox y Mulvihill, 1990). Los distintos tipos de caseína se encuentran en todas las especies mamíferas estudiadas hasta el momento, aunque su proporción varía ampliamente según la especie, como se observa en el Cuadro 1. Sin embargo, a nivel ultraestructural, las micelas de caseína son similares en la mayoría de las especies.

Las micelas exhiben estructura porosa, muy voluminosa (4 mL g<sup>-1</sup> de caseína), fuertemente hidratada (3,7g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> de caseína) (Swaisgood, 1996) y con un potencial eléctrico  $\zeta$  de -14 mV (Dickinson, 1992). La mayoría de los modelos estructurales indican que la  $\kappa$ -CN se halla localizada mayoritariamente en la superficie de la micela, jugando un papel esencial en la regulación del tamaño micelar y en el mantenimiento de la suspensión de las caseínas en la leche. La proporción de  $\kappa$ -CN varía en relación inversa con el tamaño de la micela, mientras que la de  $\beta$ -CN lo hace en forma directa (Riel, 1991). La composición, estructura y funcionalidad de las micelas de caseína ha sido abordada por Bloomfield y Morr (1973), Bloomfield y Mead (1975), Schmidt y Payens (1976), McMahon y Brown (1984), Ruettimann y Ladisch (1987), Rollema (1992), Creamer et al. (1998), Dalgleish (1998), Holt (1998) y Walstra (1999), entre otros.

**Cuadro 1. Porcentaje de caseínas en leche de distintas especies**

Especie	$\alpha_{s1}$ -CN	$\alpha_{s2}$ -CN	$\beta$ -CN	$\kappa$ -CN
Cabra	5 a 17	6 a 20	50	15
Vaca	38	10	40	12
Humana	Trazas	Trazas	70	27

Datos recopilados por Farrell et al. 2006.

## Interacciones y características morfofuncionales de las caseínas

La formación de las micelas de caseína depende de los fenómenos de interacción que se establecen entre ellas, en presencia del ion calcio. De acuerdo con Brule y Lenoir (1989), la composición y estructura primaria de las caseínas les confieren importantes propiedades físico-químicas de interés funcional como: a) marcado carácter aniónico en medio neutro por la presencia de radicales fosfoserina y/o ácido glutámico; b) insolubilidad en agua a pHi (pH = 4'6 para la caseína entera o bruta) por la elevada proporción de radicales apolares y c) agregación en medio cálcico de las caseínas  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  y  $\beta$  por disminución de su carga eléctrica negativa y de su hidrofilia, como consecuencia de la complejación del  $\text{Ca}^{2+}$  por parte de los radicales fosfoserina presentes en la estructura de dichas caseínas. Este comportamiento corresponde a las caseínas consideradas de forma aislada, pero en presencia de  $\kappa$ -CN en proporción suficiente, cercana al 10%, las demás caseínas son solubles en presencia de calcio.

El poder estabilizante de la  $\kappa$ -CN se relaciona directamente con la marcada tendencia asociativa típica de todas las caseínas (Darling y Dickson, 1979; Mercier et al., 1972). En soluciones puras, a pH neutro y en ausencia de calcio las caseínas presentan una tendencia a polimerizarse en grados variables según el tipo de caseína de que se trate, mayor en el caso de las caseínas  $\beta$  y  $\kappa$ , en las que la repartición desigual de las cargas les confiere características detergentes (Brule y Lenoir, 1989). En medio acuoso se asocian a través de enlaces hidrofóbicos, lo que se traduce en repulsión de las zonas hidrofílicas hacia el exterior de los polímeros caseínicos. La asociación de las caseínas  $\alpha_s$  parece que se produce principalmente por enlaces electrostáticos, al presentar éstas un reparto más homogéneo de las cargas.

Cuando se mezclan los diferentes tipos de caseína, su carácter anfifílico y su fosforilación

facilita las interacciones entre ellas y con el fosfato cálcico para formar complejos (Varnam y Sutherland, 1995; Swaisgood, 1996). En ausencia de calcio las asociaciones se establecen a partir de las zonas hidrofóbicas y de las cargas eléctricamente, pero en presencia de calcio intervienen enlaces entre los radicales fosfoserina de las caseínas y los iones  $\text{Ca}^{2+}$ , y el grado de asociación aumenta considerablemente. Entre 0 y 4°C sólo las caseínas  $\beta$  y  $\kappa$  son solubles a una concentración 0.03 M de calcio. Sin embargo a esa misma concentración y a temperatura entre 20 y 25°C sólo es soluble la  $\kappa$ -CN. Por su baja solubilidad en presencia de calcio, las caseínas  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  y  $\beta$  se conocen como caseínas "sensibles al calcio".

Swaiswood (1996) ofrece una visión clara y rigurosa de las interacciones tan peculiares que presentan las caseínas entre sí y con los iones de calcio, que contribuyen a la formación de las micelas de caseína y definen sus propiedades funcionales. Las estructuras primaria y terciaria singulares de las caseínas  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  que presentan fosforilación postranslacional en residuos de serina específicos que contienen 8, 9-11, 5, grupos fosfato respectivamente dan lugar a la formación de agregados (clusters) aniónicos en las "caseínas sensibles al calcio", mientras que en la  $\kappa$ -CN, "insensible al calcio" sólo aparece un único residuo fosforilado. La unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a los agregados aniónicos neutraliza la carga en dichas regiones, con la consiguiente deshidratación, que altera el equilibrio de las interacciones hidrofóbicas y de fuerzas de repulsión electrostática, facilitando su interacción.

La estructura primaria de las caseínas revela otra característica singular de estas proteínas, la distribución de residuos hidrofóbicos y polares. La agrupación de los residuos polares y de los hidrofóbicos en regiones separadas de la secuencia primaria sugiere la formación de distintos dominios de naturaleza polar e hidrofóbica, que genera una estructura anfipática. En disoluciones aisladas de caseínas, tanto la  $\beta$ -CN como la  $\kappa$ -CN se asocian para formar grandes

complejos esféricos muy similares a una micela de detergente. Precisamente, los dominios polares de las caseínas sensibles al calcio son los que presentan una alta proporción de residuos fosfoserilo que, al pH de la leche, aportan una gran carga negativa neta. La  $\kappa$ -CN, insensible al calcio, es también muy anfipática por la presencia de distintos dominios individuales hidrofóbicos y polares, pero sin embargo, el dominio polar de esta caseína no contiene ningún agrupamiento aniónico.

La  $\kappa$ -CN —en lugar de las agrupaciones aniónicas de fosfoserilo características de las caseínas sensibles al calcio— en el dominio polar contiene residuos serilo y treonilo que aparecen frecuentemente glucosilados, con tri- y tetrasacáridos que incluyen residuos de ácido N-acetilneuramínico aniónicos y actúan como grupos prostéticos fuertemente hidrófilos. Puesto que la  $\kappa$ -CN no contiene agrupaciones fosfoserilo, no liga  $\text{Ca}^{2+}$  como las caseínas sensibles a éste. Sin embargo, el dominio polar (fragmento -COOH terminal 106-169, ácido e hidrofílico y conocido como caseinomacropéptido o CMP) presenta muchos aminoácidos polares, una elevada carga negativa (restos aminoacídicos ácidos como el ácido glutámico) y ocho residuos prolilo espaciados uniformemente, creándose de esta forma una estructura pilosa abierta y flexible, fuertemente hidratada. Este dominio polar está adherido a un gran dominio altamente hidrofóbico (fragmento  $\text{NH}_2$  terminal 1-105 o para- $\kappa$ -caseína, de carácter básico) con muchos sitios que son potencialmente capaces de interaccionar con otras caseínas. Además, el enlace peptídico Phe-Met en la posición 105-106, que es el límite N-terminal del dominio polar, es muy susceptible a la acción hidrolítica de la quimosina, probablemente porque sus residuos prolilo a ambos lados del enlace sobresalen de la superficie y aumentan la flexibilidad de la cadena. Como consecuencia de sus características estructurales diferenciales, existe una serie de propiedades reservadas a la  $\kappa$ -CN, que condicionan sus interacciones y su funcionalidad:

1. Interacción con las caseínas sensibles al calcio para formar micelas, ya que actúa estabilizándolas frente al  $\text{Ca}^{2+}$ .
2. Presenta estructura anfipática, pero con un dominio polar inerte que no precipita en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .
3. Presencia de una secuencia de reconocimiento específica para la proteólisis limitada por la enzima quimosina, que permite la eliminación selectiva del dominio polar, induciendo la coagulación de las micelas.

Estas tres características morfofuncionales son la base que permite la formación de las micelas de caseína nativa por interacción de las caseínas en presencia de calcio, regulando la estabilidad micelar en función de determinados factores desestabilizantes, que determinan el estado sol/gel de la leche.

### Modelos estructurales de la micela de caseína

La multitud de modelos diferentes que han sido propuestos sobre la estructura de la micela de caseína constituyen una evidencia clara de la ausencia de conocimientos sólidos (Holt, 1998). La mayoría de los modelos propuestos para la micela de caseína se clasifican en tres categorías: de núcleo y corteza, de subunidades y de estructura interna (Ruettimann y Ladisch, 1987; Rollema, 1992).

### Modelos de núcleo y corteza (coat-core)

La mayoría de los modelos propuestos dentro de la categoría de *núcleo y corteza* se basan en estudios fisicoquímicos y consideran que la micela de caseína es una partícula esférica y liófila constituida por un centro interno e hidrofóbico de proteínas (núcleo) rodeadas por una cobertura anfifílica (corteza), cuyas proteínas son diferentes a las que constituyen el centro. El primero de los modelos de núcleo y corteza fue sugerido por Noble y Waugh en 1965 (Figura

1A) y se basa en estudios sobre la sensibilidad de las caseínas al  $\text{Ca}^{2+}$ . Este modelo describe la formación de complejos de bajo peso molecular de  $\alpha_{s1}$ - y  $\kappa$ -CN. La Figura 1A muestra monómeros de  $\alpha_{s1}$ - o  $\beta$ -CN con la espiral cargada conteniendo fosfato (Figura 1A-1), que comienzan a agregarse (Figura 1A-2) hasta un tamaño límite que da origen al núcleo de caseinato (Figura 1A-3). Este proceso de crecimiento se detiene cuando se forma una monocapa superficial de  $\kappa$ -CN que da lugar a la formación del complejo  $\alpha_{s1}$ - $\kappa$ -CN de bajo peso molecular (Figura 1-inferior). El tamaño final de la micela dependerá de la cantidad de  $\kappa$ -CN disponible. El mode-

lo de Waugh explica la naturaleza liofílica de estos complejos proteicos coloidales así como la accesibilidad de la micela a la acción de la quimosina.

El segundo de los modelos propuestos en esta categoría es el de Payens (1966), basado en el estudio de las propiedades asociativas de las caseína. En la Figura 1B se aprecia en detalle el núcleo de la micela de caseína constituido por una zona densa formada por moléculas de  $\alpha_{s1}$ -CN adheridas a una red laxa de  $\beta$ -CN. Como en el modelo de Noble y Waugh (1965), la superficie micelar esta cubierta por  $\kappa$ -CN, si bien, el modelo de Payens (1966) contempla la

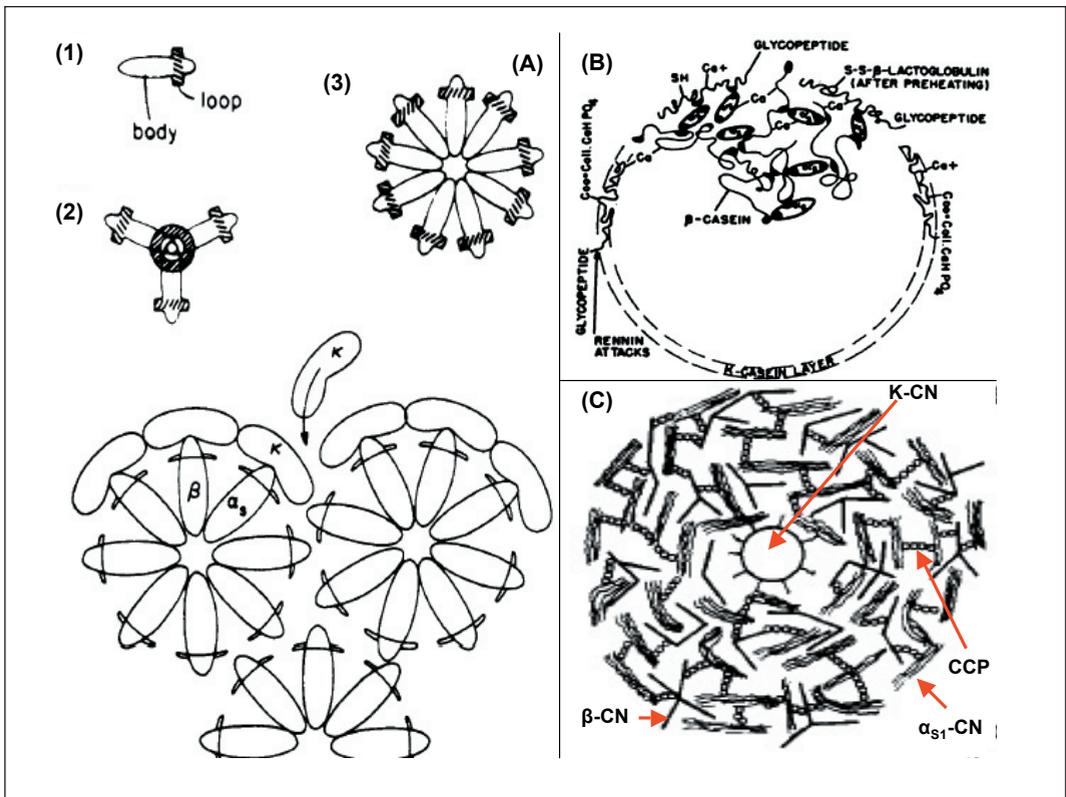


Figura 1: Modelos de núcleo y corteza de la micela de caseína. A) Noble y Waugh (1965); 1) Monómero de  $\alpha_{s1}$ -CN o  $\beta$ -CN con anillo de fosfato cargado; 2) Tetrámero de monómeros de  $\alpha_{s1}$ -CN; 3) Modelo plano de un núcleo polimérico de  $\alpha_{s1}$ -CN y  $\beta$ -CN. B) Payens (1966). C) Parry y Carroll (1969).

presencia de CCP tanto en la superficie como en el interior de la micela.

En 1969, Parry y Carroll emplean anticuerpos específicos para la  $\kappa$ -CN marcados con ferritina y observan, mediante microscopía electrónica, muy bajas concentraciones de dicha caseína en la superficie micelar. Como consecuencia, deducen que la  $\kappa$ -CN se concentra en el interior de la micela tal y como se muestra en la Figura 1C.

En los modelos de *núcleo y corteza*, la corteza jugaría un papel protector frente al proceso de agregación micelar, de acuerdo con el conocido efecto estabilizador de la capa pilosa de  $\kappa$ -CN, excepto en el modelo de Parry y Carroll (1969), que por el contrario sostienen que la

$\kappa$ -CN forma parte del núcleo. Con la excepción de este último modelo, los modelos *núcleo y corteza* explican la demostrada accesibilidad de la quimosina a la  $\kappa$ -CN y la relación existente entre el contenido de  $\kappa$ -CN de la micela y su tamaño.

### Modelos de subunidades

Estos modelos consideran que la micela de caseína está dividida en subunidades individuales denominadas submicelas que pueden tener una composición idéntica o variable entre sí (Figura 2). La existencia de submicelas se ha fundamentado ampliamente en base a métodos físico-químicos (Creamer, 1991, Kumosinski et

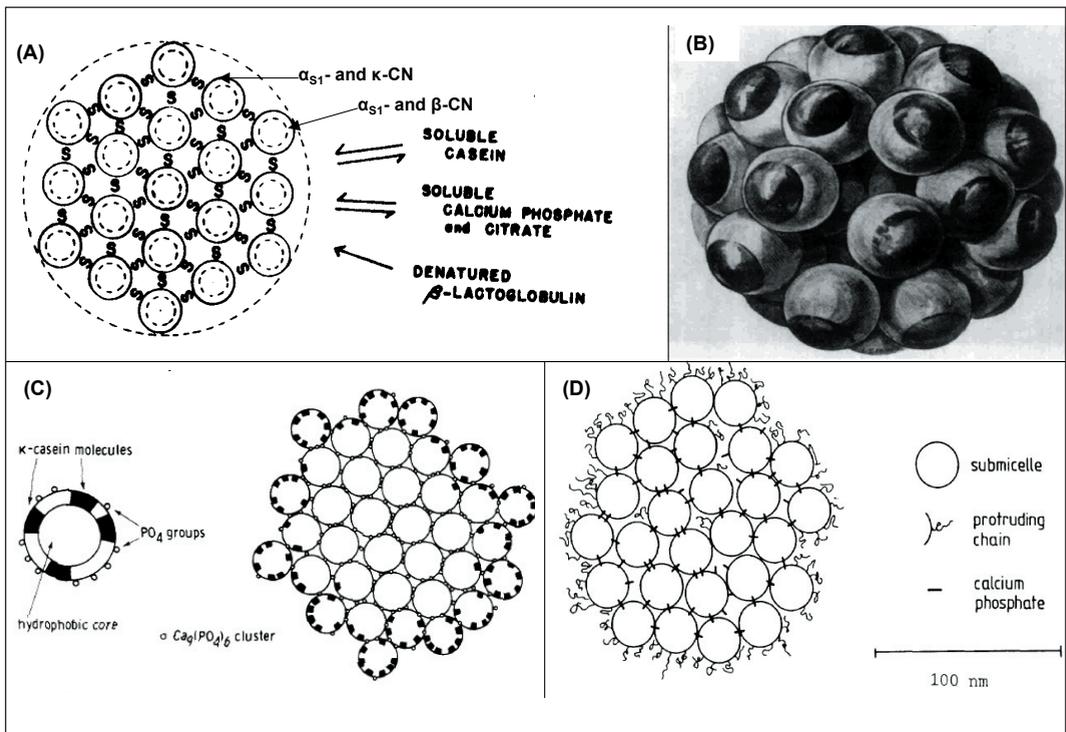


Figura 2: Modelos de subunidades de la micela de caseína. A) Morr (1967); B) Slattery y Evard (1973); las superficies claras representan los polímeros de  $\alpha_{s1}$ - y  $\beta$ -CN (áreas hidrofóbicas) y las superficies oscuras que cubren una quinta parte del área de la superficie representan los polímeros de  $\kappa$ -CN (área hidrofílica). C) Schmidt (1982); D) Walstra y Jenness (1984).

al., 1991, Rollema, 1992 y Farrell et al., 1994) como la disociación de las micelas en submicelas o el análisis de submicelas de caseinato sódico y su sucesivo crecimiento por adición de calcio. La estructura submicelar también ha sido defendida mediante observación con microscopía electrónica (Schmidt y Buchheim, 1970; Kalab et al., 1982 y Carrol et al., 1985) y estudio con dispersión de neutrones (Stohtart y Cebula, 1982; Lomholt, 1996).

El primer modelo, introducido por Morr en 1967 (Figura 2A), fue modificado gracias a las contribuciones de Slattey y Evard en 1973 (Figura 2B), y Schmidt en 1982 (Figura 2C) dando lugar a uno de los modelos más ampliamente aceptado, el modelo de Walstra y Jenness de 1984 (Figura 2D). Este modelo clásico considera que las micelas de caseína son partículas esféricas groseras con una superficie rugosa, constituida por pequeñas submicelas con un diámetro entre 12-15 nm. Las submicelas contendrían aproximadamente 20-25 moléculas de caseína con una composición variable. También, se describe en las submicelas centros hidrofóbicos y superficies hidrofílicas. Podemos diferenciar dos tipos de submicelas, unas que contienen  $\alpha_s$ - y  $\beta$ -CN y otras formadas por  $\alpha_s$ - y  $\kappa$ -CN, estas últimas más hidrofílicas debido a los residuos glucídicos de la  $\kappa$ -CN. Las distintas submicelas se encuentran unidas mediante CCP. Las moléculas de  $\kappa$ -CN se encontrarían orientadas hacia el exterior de la micela con la parte hidrofílica del grupo carboxilo terminal sobresaliendo de la superficie micelar en forma de vellosidad, constituyendo una "capa pilosa" que previene la agregación de la micela mediante un mecanismo de estabilización estérica y electrostática. Estudios realizados mediante dispersión de rayos X sobre micelas de caseína y de caseinato sódico determinan dentro de las mismas una zona interior con una mayor densidad electrónica formada por cadenas hidrofóbicas mientras que hacia el exterior las áreas son hidrofílicas, con una menor densidad electrónica y con protrusiones de  $\kappa$ -CN hacia el exterior.

Recientemente, Povey et al. (1999) emplean una técnica de espectroscopía de ultrasonidos que permite determinar un tamaño submicelar de 20 nm. La eliminación de calcio en la leche conduce a la desintegración de las micelas en partículas de apariencia submicelar (Buchheim y Welsch, 1973).

La estructura interna de la submicela se mantendría principalmente mediante las interacciones hidrofóbicas que se establecen entre las moléculas de caseína individuales (Dickinson, 1992; Swaisgood, 1996) mientras que las submicelas interactuarían por incorporación de los agrupamientos de fosfoserilo aniónicos a la estructura del CCP (Swaisgood, 1996). La estructura propuesta por Schmidt (1982) para el CCP se corresponde con  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ . Estudios de absorción de rayos X y espectroscopía infrarroja demuestran que su estructura podría ser muy similar a la que presenta la brusita en cristales triclinicos (Holt, 1985). No obstante, la naturaleza de las uniones entre unas submicelas y otras es aún mal conocida, habiéndose también apuntado la participación de uniones hidrofóbicas y de otras fuerzas, además de la existencia de los puentes salinos de CCP, (Fox y Mulvihill, 1990).

Gracias a la distribución de los diferentes tipos de caseína en el interior de las submicelas, y a la organización de los diferentes tipos de submicelas entre sí, se forma una estructura micelar en la que según Swaisgood (1996) la  $\kappa$ -CN también se localiza predominantemente en superficie mientras que las caseínas  $\alpha_s$ - y  $\beta$ - se agrupan en el interior. Sin embargo, la distribución no es excluyente porque las proteínas sensibles al calcio también están accesibles en la superficie. Cuando el dominio polar de la  $\kappa$ -CN, que no puede interactuar con el calcio, ocupa una proporción suficiente de la superficie micelar, ésta deja de crecer por lo que cuanto mayor sea el número de submicelas ricas en la  $\kappa$ -CN tanto menor será el tamaño micelar. Esta distribución de caseínas contribuye a explicar porque la cantidad de  $\kappa$ -CN de la micela au-

menta linealmente con la relación superficie/volumen, mientras que la cantidad de  $\beta$ -CN disminuye linealmente. Puesto que los componentes del suero se equilibran lentamente con los de la micela, la adición de  $\kappa$ -CN reduce el tamaño micelar y la adición de  $\beta$ -CN produce el efecto contrario.

Recientemente, algunos resultados obtenidos introducen dudas que cuestionan la existencia de las submicelas, así como la localización y papel que juega el CCP dentro de las micelas. Horne (2006) señala que el modelo submicelar genera ciertas dudas al no explicar el mecanismo de segregación de la  $\kappa$ -CN. Varios modelos submicelares, como los propuestos por Slattery y Evard en 1973 y por Walstra y Jenness en 1984, contemplan la segregación de la  $\kappa$ -CN para formar áreas ricas en  $\kappa$ -CN llamadas parches (*patches*) que se observan en aquellas subunidades situadas en la zona superficial de la micela de caseína. Sin embargo, dichos modelos no explican el motivo por el cual a pesar de la fuerte tendencia de la  $\kappa$ -CN a asociarse entre sí, ésta es capaz de asociarse también con otras caseínas para constituir submicelas mixtas que contienen todos los tipos de caseína. Dicho autor considera además que los resultados de McMahon y McManus (1998) y de Dalgleish et al. (2004), obtenidos mediante microscopía electrónica, descartan la existencia de subunidades en las micelas de caseína.

### Modelos de estructura interna

Estos modelos consideran la micela de caseína como una red proteica, tridimensional, porosa y mineralizada. Estas observaciones se sustentan en las propiedades e interacciones que muestran cada uno de los distintos tipos de caseína de forma separada y que conducen a la formación de la estructura interna de la micela. Las evidencias que respaldan este tipo de modelos provienen fundamentalmente de análisis químicos y de microscopía electrónica. El primer modelo de estructura interna fue propuesto

por Rose (1969) (Figura 3A). Este modelo está basado en la polimerización endotérmica de la  $\beta$ -CN, donde los monómeros se asocian entre sí generando polímeros a los que posteriormente se unen moléculas de  $\alpha_{s1}$ -CN, mientras que las moléculas de  $\kappa$ -CN interaccionan con las  $\alpha_1$ -CN formando agregados que limitan el tamaño de la micela. Una vez formada la micela, el CCP actúa como un agente estabilizador formando uniones que dan lugar a una estructura mucho más estable. Un año más tarde, en 1970, Garnier y Ribadeau-Dumas presentan un modelo alternativo de estructura interna (Figura 3B). En dicho modelo se resalta el papel de la  $\kappa$ -CN como elemento clave de la estructura de la micela de caseína considerada como una red porosa tridimensional de proteínas agregadas. Trímeros de  $\kappa$ -CN actuarían como núcleos a

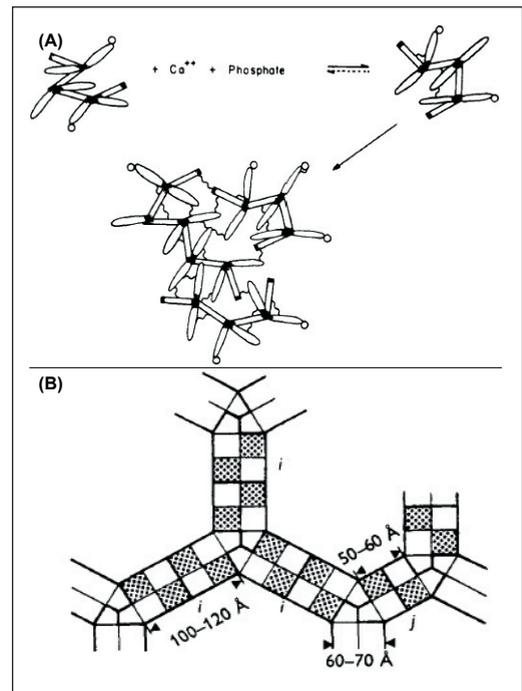


Figura 3: Modelos de la estructura interna de la micela de caseína. A) Rose (1969); B) Garnier y Ribadeau-Dumas (1970).

los que estarían unidos tres ramificaciones de  $\alpha_{s1}$ -CN (cuadrados blancos) y  $\kappa$ -CN (cuadrados punteados). Este modelo no asigna un papel importante al CCP, que estaría implicado simplemente como nexo de unión intermicelar.

Los modelos de estructura interna no tuvieron gran aceptación a partir de los años setenta. Sin embargo, como resultado de recientes controversias generadas en relación con los modelos de subunidades, Holt (1992) y Horne (1998) han reconsiderado los modelos de estructura interna y proponen modelos originales alternativos incluidos en esta categoría.

### Modelo de Holt

Este modelo (Holt, 1992) rechaza el concepto de submicela y describe la micela como un entramado flexible de caseína aproximadamente esférico y fuertemente hidratado y mineralizado (Figura 4, A). En este modelo, las moléculas de caseína formarían una estructura gelatinosa con nanogránulos (nanoclusters) de CCP, donde el extremo C-terminal de la  $\kappa$ -CN se extendería hacia el exterior de la superficie micelar contribuyendo a la formación de la capa pilosa. Los nanogránulos constituirían el centro de crecimiento de la micela. Holt et al. (1998) descubren que la secuencia aminoacídica fosforilada de la  $\beta$ -CN podría unirse a los nanogránulos de CCP, estabilizándolos y regulando su tamaño. Sin estas estructuras fosfopeptídicas los nanogránulos aumentarían de tamaño en exceso y precipitarían. Este descubrimiento llevó a De Kruif y Holt (2003) a afirmar que los nanogránulos serían las piezas centrales de la estructura de la micela de caseína.

Este modelo explica el reducido diámetro (unos pocos nanómetros) de las regiones de CCP observadas por Knoop et al. (1973) en el interior de las micelas. También, justifica el elevado tiempo necesario para el intercambio entre las fracciones de calcio coloidal y soluble. Por el contrario, el modelo de Holt no ofrece una explicación plausible sobre la formación de la

capa pilosa y la reducida presencia de  $\kappa$ -CN en el interior de las micelas. Walstra (1999) ha intentado conciliar su modelo clásico de subunidades con las evidencias en favor de la presencia de nanogránulos homogéneamente distribuidos a lo largo de la micela. Este investigador propone un modelo (Figura 4, B) en el que se sugiere que el CCP en lugar de situarse hacia el exterior de las submicelas y actuar como nexo de unión entre las mismas, más bien se localiza en el interior de las submicelas.

Sin embargo, Dalgleish et al. en 2004, mediante el empleo de microscopía electrónica de barrido de alta resolución, no encuentran evidencias que justifiquen la existencia de las submicelas pero sí determinan resultados convincentes de la organización de las caseínas en el interior de la micela donde aparecen estructuras tubulares de 20 nm de diámetro. Los autores de este último estudio sugieren que la superficie micelar no es lisa y contiene huecos entre las subestructuras tubulares (Figura 4D).

### Modelo de doble unión de Horne

El modelo de doble unión propuesto por Horne en 1998 (Figura 4, C) podría considerarse como una extensión del modelo de estructura interna de Holt. El modelo de doble unión, a diferencia del de Holt, sugiere que las interacciones proteína-proteína son esenciales y considera que la naturaleza anfifílica de las caseínas es la responsable de la polimerización y estructuración micelar.

El CCP se puede extraer fácilmente de las micelas de caseína mediante acidificación de la leche a temperaturas por debajo de 20°C sin que se ocasione alteración aparente de la estructura micelar. Además, la adición de urea induce la disociación de la micela de caseína sin que se produzca la disolución del CCP. La mayoría de los modelos anteriormente descritos no proporcionan una explicación adecuada de dichos hallazgos, que sugieren claramente al CCP como modulador de la función del  $\text{Ca}^{2+}$  y

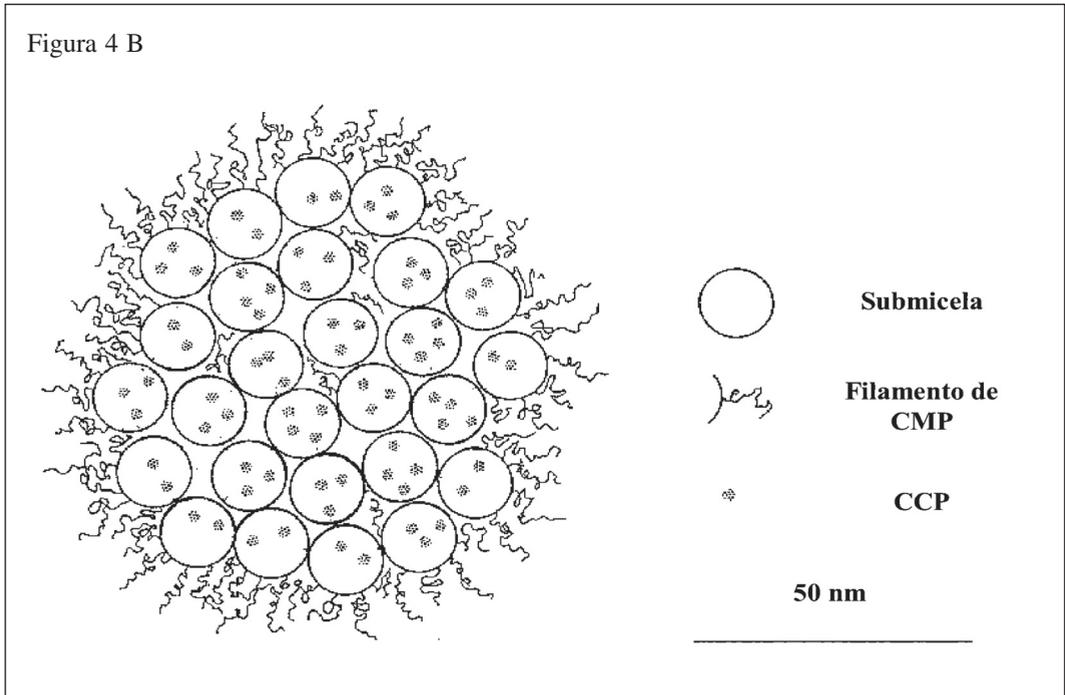
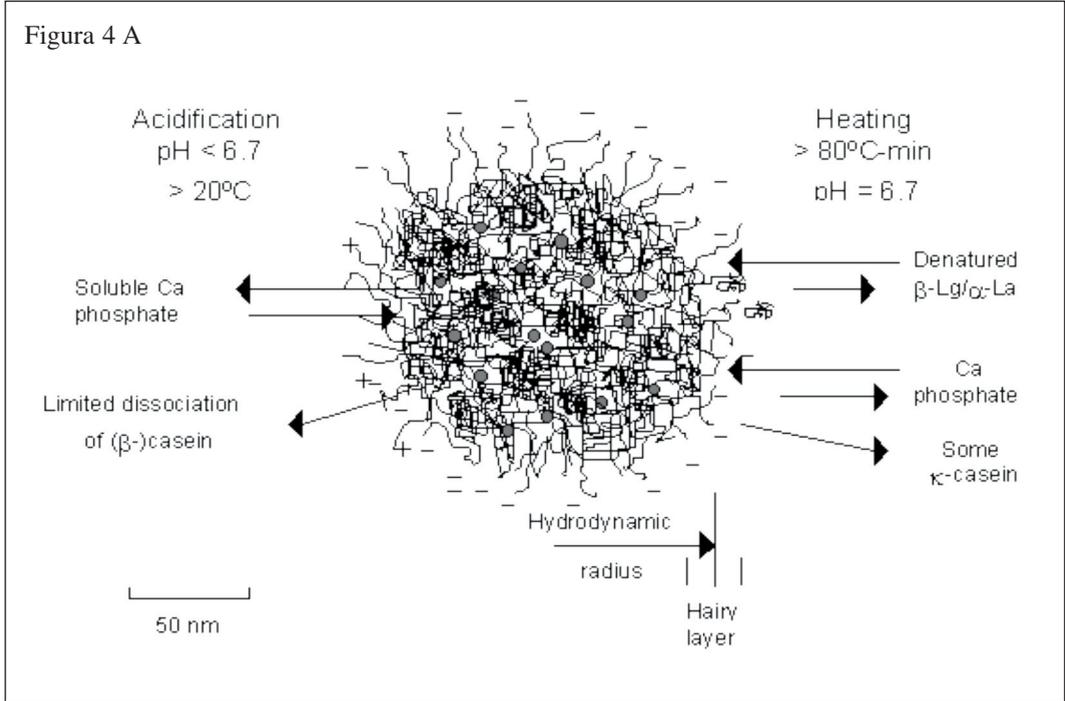


Figura 4 C

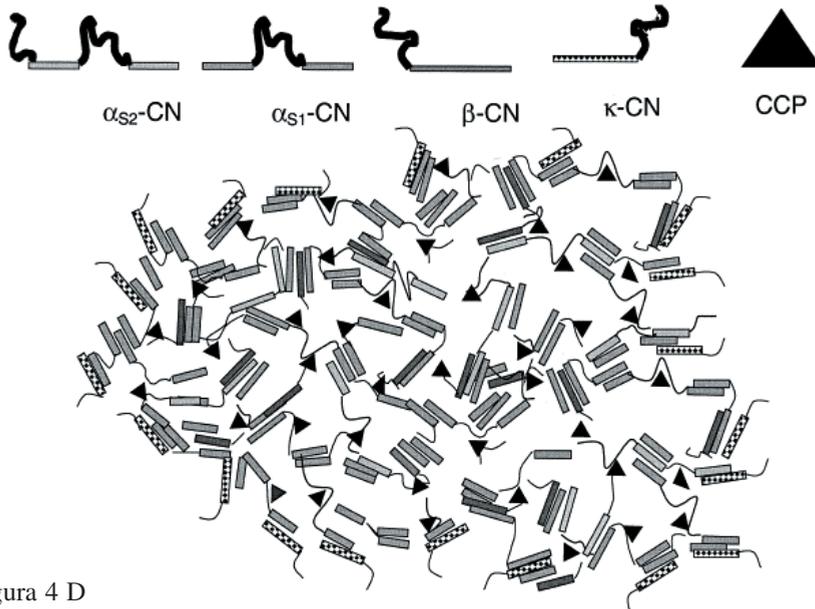


Figura 4 D

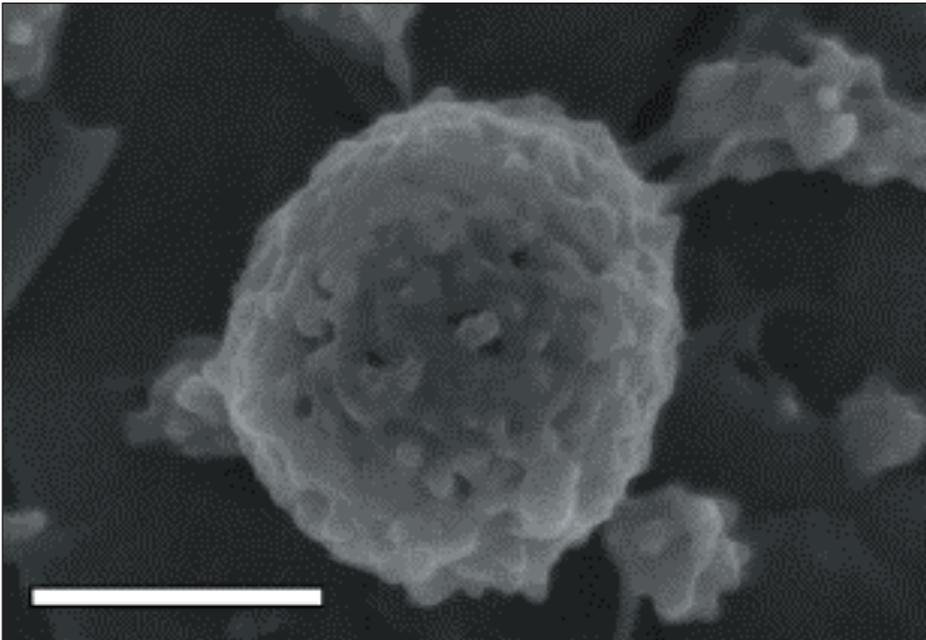


Figura 4: Modelos alternativos al modelo clásico de subunidades de la micela de caseína. A) Holt (1992); B) Walstra (1999); C) Horne (1998); D) Micrografía electrónica de una micela de caseína según Dalgleish et al. (2004).

del fosfato en la micela más que como responsable directo de la unión entre las submicelas. El modelo de doble unión, en un intento de superar esta limitación observada en los modelos anteriores, identifica dos tipos de uniones como principales responsables de la cohesión y estabilidad micelar. En este modelo, las interacciones hidrofóbicas serían las responsables de la fuerza de atracción que contribuyen a la formación y estabilización de la micela, mientras que las repulsiones de tipo electrostático serían las limitadoras del crecimiento ininterrumpido de la misma.

De esta forma, y por el contrario que en los modelos previos, el modelo de estructura interna introducido por Horne proporciona una explicación válida de los mecanismos de ensamblaje, formación y crecimiento micelar. Dicho modelo se corresponde ampliamente con las micrográficas electrónicas de transmisión obtenidas por McMahon y McManus (1998). Horne (2006) comenta que el modelo de Holt también explica lo observado en las micrográficas electrónicas obtenidas por McMahon y McManus (1998) y coincide con el modelo de doble unión en cuanto al tamaño de los nanogránulos. Sin embargo concluye que el modelo de Holt lleva a confusión e improvisa en muchos aspectos.

Finalmente, el modelo propuesto por Horne constituye una buena herramienta para profundizar en el análisis y comprensión de algunos de los fenómenos físicos y reológicos más complejos, y de mayor transcendencia funcional, que caracterizan a los geles lácteos.

## DISCUSIÓN

El estudio y conocimiento de la estructura de la caseína es fundamental para una mejor comprensión, aprovechamiento y control de su funcionalidad en la elaboración de productos lácteos.

A pesar de la gran cantidad de estudios que se han realizado durante los últimos cincuenta años con el objetivo de clarificar la verdadera

estructura de la micela de caseína, ésta no es conocida ni comprendida aún con suficiente detalle, por lo que se requiere un mayor esfuerzo investigador que permita una mejor explotación tecnológica de las propiedades físicas, químicas y estructurales del sistema micelar.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bloomfield V. A., Morr C. V. 1973. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 27: 103-120. Citado por Ruettimann y Ladisch (1987).
- Bloomfield V. A., Mead R. J. 1975. *Journal of Dairy Science* 58: 592-602. Citado por Ruettimann y Ladisch (1987).
- Brule G., Lenoir J. 1989. La coagulación de la leche. En: *El Queso*. Eck, A., pp 3-20. Eds. Omega, S. A., Barcelona.
- Buchheim W., Welsch U. 1973. Evidence for the submicellar composition of casein micelles on the basis of electrón microscopical studies. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 27: 163-180.
- Carroll R. J., Basch J. J., Phillips J. G., Farrell H. M. 1985. Ultrastructural and biochemical investigations of mature human milk. *Food Microstructure* 4: 323-331.
- Creamer L. K. 1991. Some aspects of casein micelle structure. En: *Interactions of Food Proteins* pp 149-163. Eds. N. Parris and R. Barford, American Chemistry Society Symposium 454, Washington DC.
- Creamer L. K., Plowman J. E., Liddell M. J., Smith M. H., Hill J. P. 1998. Micelle stability: kappa-casein structure and function. *Journal of Dairy Science* 81: 3004-3012.
- Dalgleish D. G. 1990. Aspects of stability in milk and milk products. En: *Food Colloids*, Bee, R. D., Richmond, P. y Mingins, J., pp. 295-305, Eds. R. Soc. Chem., Cambridge, United Kingdom.
- Dalgleish D. G. 1993. The enzymatic coagulation of milk. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 1, pp. 69-100. Eds. Fox, P. F., London: Chapman & Hall.

- Dalgleish D. G. 1998. Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities. *Journal of Dairy Science* 81: 3013-3018.
- Dalgleish D. G., Spagnuolo P. A., Goff H. D. 2004. *International Dairy Journal*, 14: 1025-1031.
- Darling D. F., Dickson J. 1979. Electrophoretic mobility of casein micelles. *Journal of Dairy Research* 46: 441-451.
- De Kruif C.G., Holt C. 2003. Casein micelle structure, functions and interactions. En: *Advanced Dairy Chemistry 1, Proteins 3<sup>rd</sup> edition, Part A*. pp. 233-276. Eds. Fox P.F. and Sweeney P.L.H. Kluwer Academic, New York.
- Dickinson E. 1992. *An Introduction to Food Colloids*. Eds. Oxford University Press, Oxford.
- Farrell H. M., Kumosinski T. F., King G. 1994. Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: energy-minimized submicelle structure compared with small-angle X-ray scattering data. En: *American Chemistry Society Symposium 576* pp. 392-419. Eds. F. Kumosinski and M. N. Liebman, Washington DC.
- Farrell Jr. H. M., Malin E. L., Brown E. M., Qi P.X. 2006. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 11: 135-147.
- Fox P. F., Mulvihill D. M. 1990. En: *Food Gels*. Elsevier Applied Science pp. 121-173. Eds. P. Harris, London y New York.
- Garnier J., Ribadeau-Dumas B. 1970. En: *Lactología técnica* pp.17-18. Acribia. Zaragoza, España.
- Holt C. 1985. The size distribution of bovine casein micelles: A review. *Food Microstructure*. 4: 1-10.
- Holt C. 1992. Structure and stability of bovine casein micelles. En: *Advances Protein Chemistry* 43 pp. 63-151. Eds. J. T. Edall, C. B. Anfinsen, F. M. Richards, D. S. Eisenberg, Academic Press, San Diego.
- Holt C. 1998. Casein micelle substructure and calcium phosphate interactions studied by sephacryl column chromatography. *Journal of Dairy Science* 81 (11): 2994-3003.
- Holt C., Timmins P.A., Errington N., Leaver J. 1998. A core-shell model of calcium phosphate nanoclusters stabilized by  $\beta$ -casein phosphopeptides, derived from sedimentation equilibrium and small-angle X-ray and neutron scattering measurements. *European Journal of Biochemistry* 252: 73-78.
- Horne D. S. 1998. Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal* 8: 171-177.
- Horne D. S. 2006. Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 11: 148-153.
- Kalab M., Phibbs-Todd B. E., Allan-Wojtas P. 1982. Milk gel structure XIII. Rotary shadowing of casein micelles for electron microscopy. *Milchwissenschaft* 37: 513-518.
- Knoop A. M., Knoop E., Wiechen A. 1973. Electron microscopical investigations on the structure of the casein micelles. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 27: 121-127.
- Kumosinski T. F., Pessen H., Brown E. M., Kakalis L. T., Farrell H. M. 1991. Quaternary structural changes of bovine casein by small-angle X-ray scattering. En: *Interactions of Food Proteins*. American Chemistry Society Symposium 454 pp. 182-194. Eds. N. Parris and R. Barford, Washington DC.
- Lomholt S. B. 1996. The kinetics of the aggregation of casein micelles by rennet. Ph.D. Thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.
- McMahon D. J., Brown R. J. 1984. Enzymic coagulation of casein micelles: a review. *Journal of Dairy Science* 67 (5): 919-929.
- McMahon D. J., McManus W. R. 1998. Rethinking casein micelle structure using electron microscopy. *Journal of Dairy Science* 81: 2985-2993.

- Mercier J. C., Uro J., Ribadeau-Dumas B., Grosclaude F. 1972. Primary structure of a kappa B I bovine casein macropeptide. *European Journal Biochemistry* 27: 535-547.
- Morr C. V. 1967. Effect of oxalate and urea on the ultra-centrifugation properties of raw and heated skim milk casein micelles. *Journal of Dairy Science* 50: 1744-1751.
- Noble R. W., Waugh D. F. 1965. Casein micelles. Formation and structure. *Journal of the American Chemical Society* 87: 2236-2245.
- Parry R. M., Jr., Carroll R. J. 1969. Lactation of K-casein in milk micelles. *Biochemical Biophysics Acta* 194: 138-150.
- Payens T. A. J. 1966. Association of caseins and their possible relation to structure of casein micelle. *Journal of Dairy Science* 49: 1317-1324.
- Povey M. J. W., Golding M., Higgs D., Wang Y. 1999. Ultrasonic spectroscopy studies of casein in water. *International Dairy Journal* 9: 299-303.
- Riel R. 1991. Composición y estructura físico-química de la leche. En: *Ciencia y Tecnología de la Leche*, Amiot, J., pp. 1-53. Eds. Acribia S.A., Zaragoza.
- Rollema H. S. 1992. Casein association and micelle formation. En: *Advanced Dairy Chemistry vol 1* pp. 111-140. Eds. P. F. Fox. Elsevier Science Publisher, Ltd., Essex.
- Rose D. 1969. A proposed model of micelle structure in bovine milk. *Dairy Science Abstract* 31: 171-175.
- Ruettimann K. W., Ladisch M. R. 1987. Casein micelles: Structure, properties and enzymatic coagulation. *Enzyme Microbiology Technology* 9: 578-598.
- Schmidt D. G. 1982. Association of caseins and casein micelle structure. En: *Developments of Dairy Chemistry vol 1* pp. 61-68. Eds. P. F. Fox, Applied Science Publications. London, England.
- Schmidt D. G., Buchheim W. 1970. Elektronenmikroskopische untersuchung der feinstuktur von casein-micellen in kuhmilch. *Milchwissenschaft* 25: 596-600.
- Schmidt D. G., Payens T. A. J. 1976. Surface and Colloids Science vol. 9. Eds. Matijevic, E., Wiley, New York.
- Slattery C. W., Evard R. 1973. A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition. *Biochemical and Biophysics Acta* 317: 529-538.
- Stohtart P. H., Cebula D. J. 1982. Small angle scattering study of bovine casein micelles and sub-micelles. *Journal of Molecular Biology* 160: 391-395.
- Swaisgood H. E. 1996. Characteristics of milk. En: *Food Chemistry* pp. 841-878, Eds. Fennema, O. R., Marcel Dekker, Inc., New York.
- Varnam A. H., Sutherland J. P. 1995. *Leche y Productos Lácteos. Tecnología, Química y Microbiología*, Ed. Acribia, S. A., Zaragoza.
- Walstra P., Jenness R. 1984. *Dairy Chemistry and Physics*, Ed. John Wiley and Sons, New York.
- Walstra P., Jenness R. 1987. *Química y Física Lactológica*, Ed. Acribia, S. A., Zaragoza.
- Walstra P. 1999. Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal* 9: 189-192.