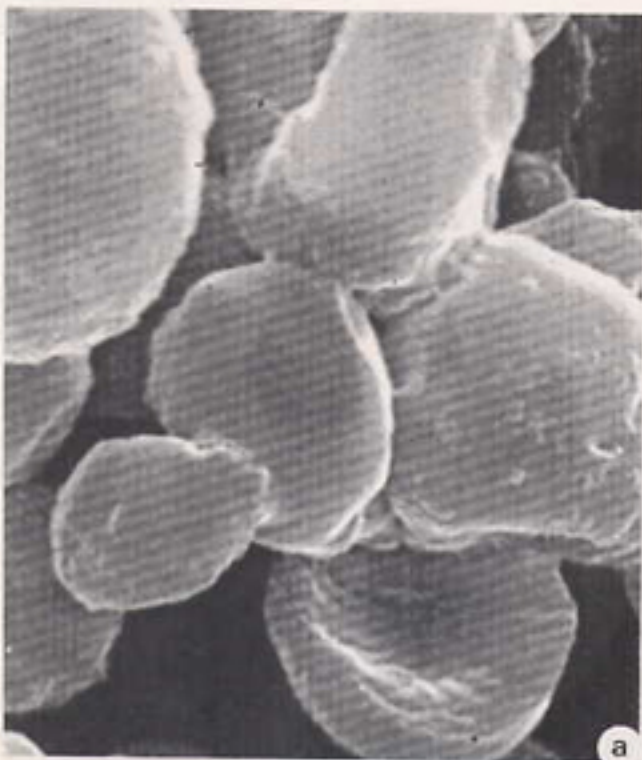


REVITECA

Revista en
Tecnología
y Ciencia
Alimentaria

Publicación Semestral del Centro de Investigaciones en Tecnología de Alimentos * Vol. 3 No. 1-2, 1994 *

Análisis Cinético Ultraestructural de la Lipólisis de los Glóbulos Grasos Lácteos



Micrografía electrónica de barrido de glóbulos grasos lácteos

Se analizó cinética y estructuralmente la acción de la lipasa pancreática sobre la grasa de leches naturales (de vaca y humana) y homogeneizadas, mediante el estudio de los glóbulos grasos lácteos y sus membranas. Se encontró que la reacción *in vitro* de la enzima con las leches homogeneizadas fue más rápida que con las leches naturales.

Además, se observó una proporción mayor de glóbulos grasos lácteos... (ver pág. 28)

Cinéticas de deshidratación con aire caliente de zanahoria (*Daucus caroto*) en rodajas

Se realizó el estudio de las cinéticas de secado con aire caliente de rodajas de zanahoria escaldadas. Se evaluaron diferentes temperaturas (60, 70, y 80 °C), humedades absolutas del aire (12 y 55 g agua/kg aire seco) y velocidades del aire (0,5, 1,5 y 2,1 m/s). Se encontró un... (ver pág. 1)

La preservación de pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) por métodos combinados

Se estudió la tecnología de factores combinados en la preservación de pulpa de guayaba. Se emplearon cuatro factores de conservación en tres niveles de aplicación cada uno, mediante un diseño factorial fraccionario 3⁴: adición de... (ver pág. 11)

El análisis de superficies de respuesta en la preservación de pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) por métodos combinados en el nivel industrial

Se estudió el uso de factores combinados para preservar la pulpa de guayaba a temperatura ambiente en el nivel industrial. Con los datos de un estudio anterior en el nivel piloto, y... (ver pág. 19)

Supervivencia del *Vibrio cholerae* y *V. parahaemolyticus* en el ceviche

Se estudió la supervivencia de *Vibrio cholerae* y *V. parahaemolyticus*, en ceviche preparado con una formulación estandarizada en Costa Rica. Se inoculó el pescado troceado para... (ver pág. 38)

Revista Semestral publicada por el
Centro de Investigación en
Tecnología de Alimentos

Director del CITA

Luis Fernando Arias Molina

Editor

Ricardo Quirós Castro

Consejo Editorial

Ing. Luis Fernando Arias Molina

Ing. Fernando Aguilar Villarreal

Ana Ruth Bonilla Leiva, Ph. D.

Lic. Vera García Cortes

Víctor Lobo Di Palma, M. Sc.

Juan Manuel Esquivel Kruse, M. Sc.

Diagramación

Jeanina García Ureña

La responsabilidad de los trabajos firmados es
de sus autores y no del CITA, excepto cuando se
indique expresamente lo contrario.

La mención de cualquier empresa o
procedimiento patentado no supone su
aprobación por parte del CITA.

Los artículos incluidos en REVITECA pueden
reproducirse libremente siempre y cuando se
haga mención expresa de su procedencia y se
envíe copia al Consejo Editorial.

Correspondencia por canje y suscripciones
Universidad de Costa Rica - Centro de
Investigaciones en Tecnología de Alimentos
REVITECA

San José - Costa Rica

Telex UNICORI 2544

Tels. 225-9885 / 224-8027 / 207-4212 / 207-4701

La presente edición de REVITECA es
patrocinada por la Fundación para la
Investigación Agroindustrial Alimentaria
(FIAA).

Cinéticas de deshidratación con aire caliente de zanahoria (*Daucus caroto*) en rodajas

Ana M. Rodríguez-Sibaja

Pedro Fito-Maupoe

1

La preservación de pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) por métodos combinados

Floribeth Viquez-Rodríguez

11

El análisis de superficies de respuesta en la preservación de pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) por métodos combinados en el nivel industrial

Floribeth Viquez-Rodríguez

Catalina García-Santamaria

19

Análisis cinético ultraestructural de la lipólisis de los glóbulos grasos lácteos

Teresita Rodríguez-Salas

Francisco Hernández-Chavarría

Julio Francisco Mata-Segreda

28

Supervivencia del *Vibrio cholerae* y *V. parahaemolyticus* en el ceviche

Priscilla Alvarado-Marengo

Vera García-Cortes

38

ANALISIS CINETICO ULTRAESTRUCTURAL DE LA LIPOLISIS DE LOS GLOBULOS GRASOS LACTEOS

Teresita Rodríguez-Salas*; Francisco Hernández-Chavarría**; Julio Francisco Mata-Segreda ***

ABSTRACT

Ultrastructural kinetic analysis of milk fat globules lipolysis

The action of pancreatic lipase on natural (cow and human) and homogenized milk fat was analyzed kinetic and ultrastructurally, studying the milk fat globules and their membranes.

It was found that *in vitro* reaction of the enzyme with homogenized milks was faster than with the natural ones. Also a larger proportion of ruptured or perforated milk fat globules was observed in homogenized milk. However, the non homogenized cow milk, showed a greater proportion of perforated milk fat globules than the human milk; this due to natural autolysis during post-excretion time.

The majority of the homogenized milk fat globules presented alterations at 180 min of reaction, or only their membranes were left. Meanwhile on the natural samples there was a higher proportion of complete globules, although, with cryofracture, in the scanning electron microscope, it was possible to observe hydrolysis in the lipidic core.

It is concluded that the protein membrane of milk fat globules in homogenized milk is more permeable to the enzyme than the fat globule membrane in natural milks, which might be due to the ruptures presented.

RESUMEN

Se analizó cinética y ultraestructuralmente la acción de la lipasa pancreática sobre la grasa de leches naturales (de vaca y humana) y homogeneizadas, mediante el estudio de los glóbulos grasos lácteos y sus membranas.

Se encontró que la reacción *in vitro* de la enzima con las leches homogeneizadas fue más rápida que con leches naturales. Además se observó una proporción mayor de glóbulos grasos lácteos con perforaciones o rupturas en las leches homogeneizadas. Sin embargo, la leche no homogeneizada de vaca, mostró una mayor proporción de glóbulos grasos lácteos perforados que la leche humana; esto debido a la autólisis natural ocasionada por el tiempo post-excreción.

La mayoría de los glóbulos grasos lácteos de las leches homogeneizadas presentaron alteraciones a los 180 min de reacción, o bien sólo quedaron sus membranas. En tanto en las leches naturales hubo una mayor proporción de glóbulos lácteos íntegros, aunque con criofractura, en el microscopio electrónico de barrido fue posible observar hidrólisis en el corazón lipídico.

Se concluye que la membrana proteica del glóbulo graso lácteo homogeneizado es más permeable a la enzima que la membrana del glóbulo graso de las leches naturales, lo cual puede deberse a las rupturas que presentan.

INTRODUCCION

Los glóbulos grasos lácteos (GGL) están constituidos de un 97% a un 99% por triglicéridos, el resto corresponde a fosfolípidos y esteroides. Este núcleo lipídico que constituye el GGL, está recubierto por una membrana de tipo unitario denominada membrana del glóbulo graso lácteo (MGGL), cuya ultraestructura es similar a la de una membrana celular (Blackberg, 1981; Cheftel, 1980). Sin embargo, por autólisis natural de la leche, esas membranas se alteran tanto estructural como químicamente, al grado de ser sustituida por una membrana proteica, conocida como membrana secundaria (Bracco *et al*, 1972; Wooding,

* Escuela de Tecnología de Alimentos

** Unidad de Microscopía Electrónica

*** Escuela de Química

1971). Algo similar ocurre durante el proceso de homogeneización, pues las MGGL se rompen y son sustituidas por una capa proteica derivada del plasma lácteo (Brunner, 1976; Wooding, 1971). Así, la estructura de membrana unitaria de los GGL solo puede ser observada en muestras procesadas inmediatamente después de la excreción (Hernández & Akahori, 1983).

La MGGL protege el núcleo lipídico; sin embargo, para el proceso de la digestión representa una barrera física que obstaculiza el paso de enzimas. Ese bloqueo se manifiesta por ejemplo en la acción con la lipasa pancreática en la que se requiere que esta actúe sobre el corazón lipídico del GGL; (Blackberg, 1981; Mata-Segreda, 1981). Así, el objetivo de este estudio fue evaluar la acción de la lipasa pancreática sobre los GGL de leches naturales y homogeneizadas y definir el efecto que produce esta enzima en la MGGL.

MATERIALES Y METODOS

Muestras de leche

Se estudiaron las siguientes leches: leche homogeneizada de vaca de tres marcas comerciales (muestras A, B y C); leche sin homogeneizar de vaca, obtenida de un expendio comercial por lo que el tiempo de post-excreción no fue determinado (muestra D) y dos muestras de leche humana de diferentes fuentes (muestras E y F) recolectadas la primera a los quince días *post partum*, y la segunda a los 4 meses. Tales muestras fueron procesadas inmediatamente post-excreción.

Reacción enzimática

Se utilizó un preparado de lipasa pancreática de origen porcino (40 mg/mL de agua destilada), que se añadió a cada muestra de leche en solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.2). La composición de la mezcla de reacción fue de tres partes de amortiguador por una parte de enzima y otra parte de leche. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C y se tomaron alícuotas a los 0, 30, 60 y 180 min.

Extracción de la grasa

De cada mezcla de reacción se extrajeron alícuotas de 14 mL y se centrifugaron durante 15 min a 3000 rpm a 4°C, (centrífuga Hitachi OSPR-22). Los tubos se taparon con tapones de hule perforable y se colocaron invertidos en el rotor, de manera que la capa lipídica al centrifugarse flotó localizándose en el fondo de los tubos. Luego, sin invertir los tubos, se perforaron los tapones con una aguja hipodérmica para permitir la entrada de aire y con otra aguja y una jeringa hipodérmica se extrajo la fase acuosa del tubo, de manera que al colocarlos en posición normal la capa de grasa quedó en el fondo.

Microscopia electrónica de barrido

La grasa extraída de cada alícuota de la mezcla de reacción enzimática se fijó con glutaraldehído al 2,5% en solución amortiguadora de fosfatos (0,2 M, pH 7,2) durante 2 h a 4 °C; se postfijó con tetróxido de osmio al 2% en el mismo amortiguador por 1 h. Se deshidrató en una escala ascendente de alcohol etílico de 30 a 100%. Se depositó una gota en una membrana Millipore de 0,45 µm de porosidad y luego se secó en un secador de punto crítico (Hitachi HCP-2). Las membranas Millipore con la muestra adsorbida se colocaron sobre bases de aluminio; se cubrieron con oro en un cobertor iónico (Eiko IB-3), y se observaron en un microscopio electrónico de barrido (Hitachi S-570).

De la muestra F también se tomaron dos alícuotas a los 0 y 180 min de reacción, que se fijaron con glutaraldehído en la misma condición expresada anteriormente, se lavaron con amortiguador de fosfatos y se resuspendieron en glicerol al 5%, luego se congelaron en nitrógeno líquido, se criofracturaron y se observaron a -100 °C en el microscopio electrónico de barrido (Hitachi S-570), empleando un dispositivo de etapa criogénica.

Microscopia electrónica de transmisión

Se procesaron las alícuotas obtenidas a los 0 y a los 180 min de reacción de las muestras A, B, C y D; para ello la fracción lipídica, una vez deshidratada, se embebió en resina Epoxi (Tabb tipo Spurr) y se incubó a 70 °C durante 72 h. Se hicieron cortes ultrafinos de 50 y 90 nm de espesor, (Ultramicrotomo Sorvall MT2-2). Los cortes se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión (Hitachi HU-12A).

RESULTADOS Y DISCUSION

Ultraestructura del GGL

Al microscopio electrónico de barrido, los GGL aparecen como corpúsculos esferoides de diferente diámetro, algunos presentan una superficie lisa y otros corrugada (Bauer, 1972). En este trabajo esto se puede apreciar observando las Figuras 1a, 1b, 1c, 1d y 4a, para las diferentes leches estudiadas. Mediante cortes ultrafinos observados al microscopio electrónico de transmisión, se apreciaron diferencias en la MGGL. Las leches no procesadas presentaron MGGL tipo unitario con aspecto trilaminar como lo describió Wooding (1971). En la leche no homogeneizada de vaca, se aprecia un proceso de

vacuolización, observándose estructuras electrodensas emergiendo de la MGGL a manera de corpúsculos esferoides gemando, cuyo material parece provenir exclusivamente de la MGGL (Figura 2a). Por tal razón esas estructuras han sido denominadas plasmalemasomas (Wooding, 1972). En las leches homogeneizadas la MGGL ha sido sustituida por una membrana más gruesa, originada posiblemente por proteínas lácteas (Brunner, 1976). El aspecto ultraestructural granular de esta membrana es más acentuado que el observado en la leche sin procesar (Figura 2b). Las discontinuidades de la MGGL observadas en esta micrografía podrían corresponder a los agujeros que se presentan en la superficie de los GGL apreciadas en las micrografías electrónicas de barrido (Figura 2c).

El interior del GGL (corazón lipídico) es disuelto durante el procesamiento de la muestra para microscopia electrónica de transmisión y barrido, pues en el primer caso sólo se observan las MGGL y en el segundo caso los GGL aparecen como esferas vacías (Figuras 2a, 2b y 2c) presentando rupturas en las MGGL. De tal manera que una opción para observar el interior del GGL al microscopio electrónico es mediante estabilización de la estructura por ultracongelación y criofractura, como se observa en las Figuras 5a y 5b, en la cual el GGL ha sido dividido diametralmente mostrando una masa lipídica interna. Además, es posible apreciar la MGGL criofracturada como un casquete que envuelve al corazón lipídico.

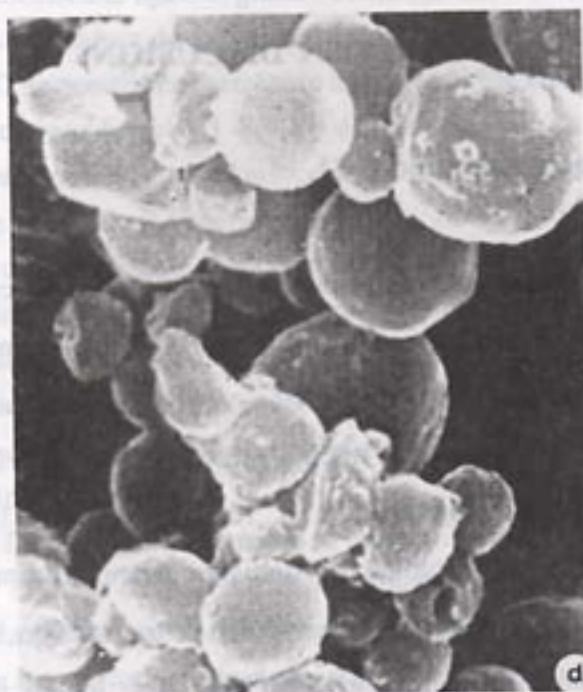
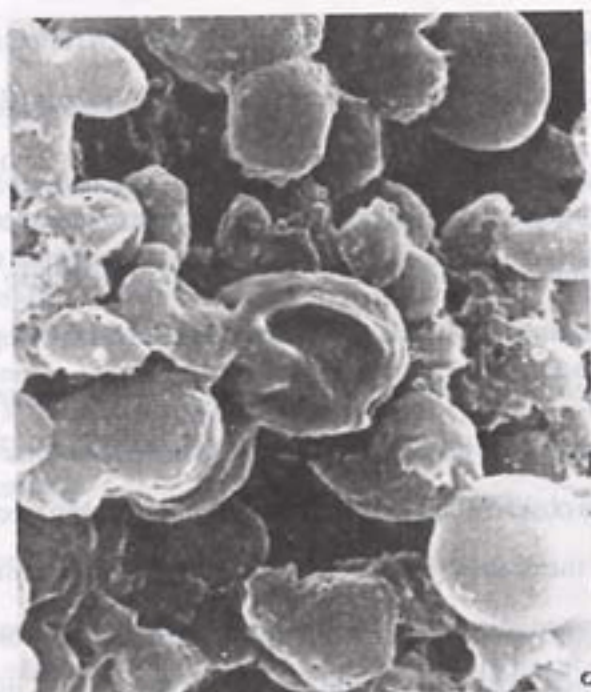
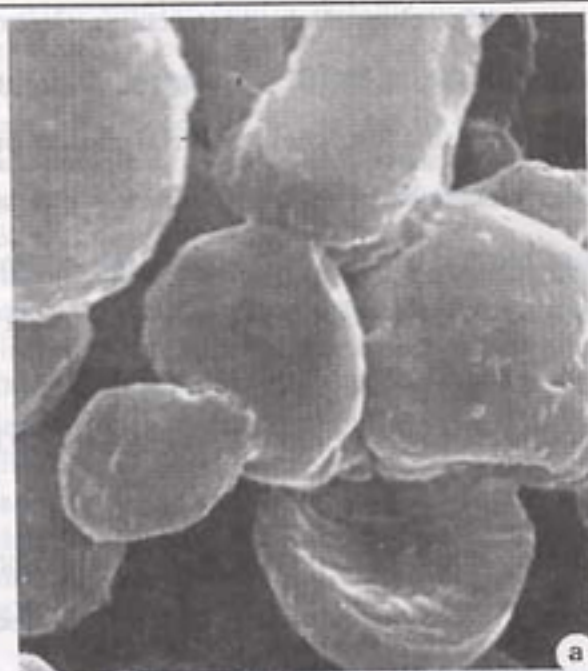


Figura 1. Micrografías electrónicas de barrido de GGL de leches de vaca

- a- Leche sin homogeneizar (14 000X)
 b- Leche homogeneizada A (14 000X)

- c- Leche homogeneizada B (15 500 X)
 d- Leche homogeneizada C (17 000 X)



Figura 2. Micrografías electrónicas de GGL de leches de vaca

a- Transmisión, leche no homogeneizada (125 000 X)

b- Transmisión, leche homogeneizada (105 000 X)

c- Barrido, leche homogeneizada (14 000 X)

Análisis ultraestructural del la lipólisis de los GGL

En las curvas de la Figura 3, se observa que la lipasa pancreática actúa a una velocidad de reacción mayor sobre los GGL de la leche cruda (muestra D), seguida por la de los de las leches homogeneizadas (muestras A, B y C). En esta figura se observa que con la leche humana (muestra E) es con la que se presenta la menor velocidad de reacción. Aunque las micrografías electrónicas de barrido muestran que las MGGL de esta leche permanecen prácticamente sin alteración y que la proporción de los GGL es la misma durante las 3 h de reacción enzimática (Figuras 4a y 4b). Sin embargo, en las muestras procesadas por criofractura es posible observar que la enzima actúa sobre el corazón lipídico después de 180 min de reacción (Figuras 5a y 5b).

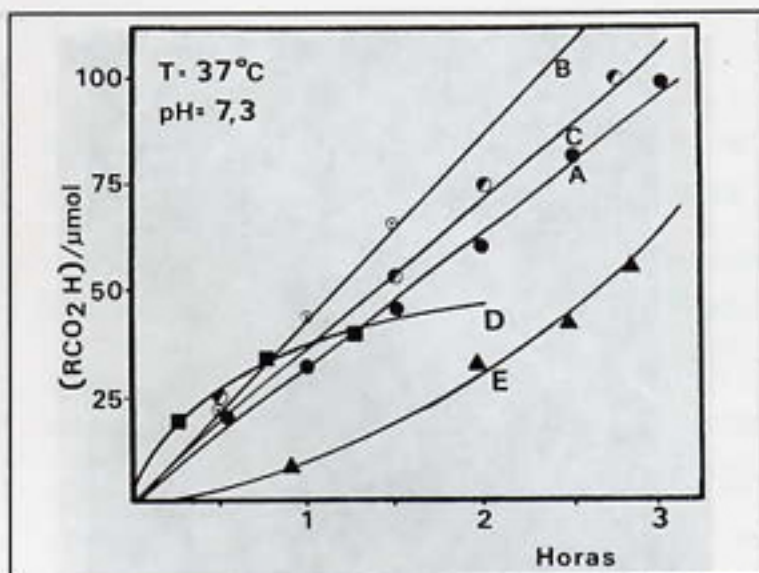


Figura 3. Curvas de reacción de la lipasa pancreática con las diferentes leches

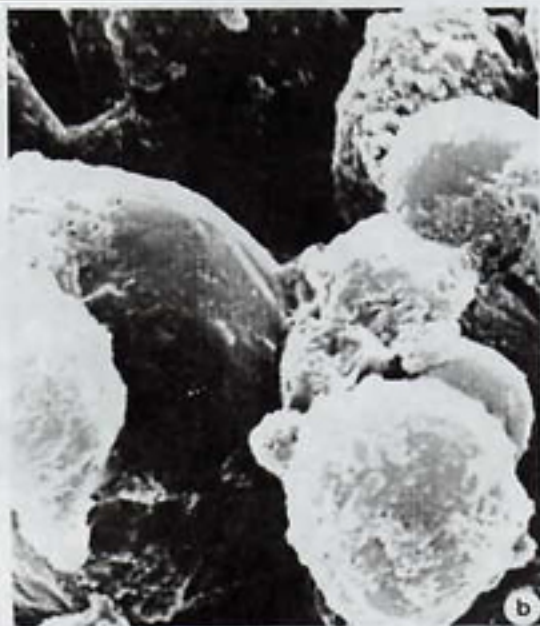


Figura 4. Micrografías electrónicas de barrido de GGL de leche humana a dos tiempos extremos de reacción con la lipasa pancreática

- a- 0 min, (15 000 X)
- b- 180 min, (12 000 X)

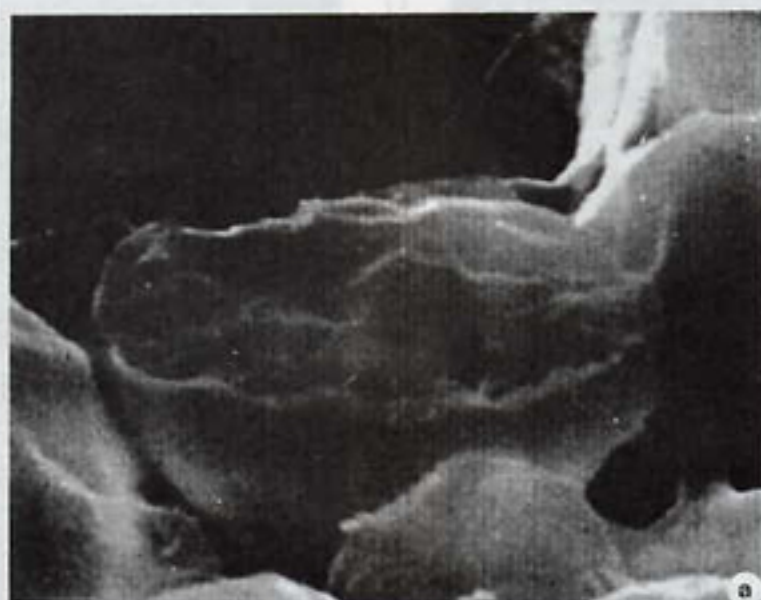


Figura 5. Micrografías electrónicas de barrido de GGL de leche humana crio fracturados a dos tiempos extremos de reacción con lipasa pancreática

a- 0 min, (11 500 X)

b- 180 min, (10 000 X)

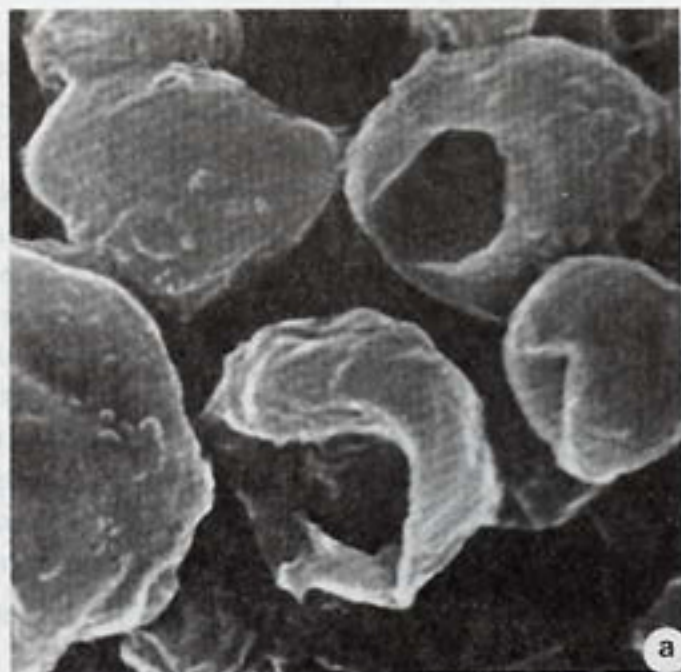


Figura 6. Micrografías electrónicas de barrido de GGL de leche sin homogeneizar

a- Barrido (14 000 X)

b- Transmisión (25 000 X)

Los GGL de la leche sin homogeneizar de vaca, observados al microscopio electrónico de barrido, (Figura 6a), presentan agujeros en sus membranas desde el principio de la reacción debido a la autólisis natural de los mismos (Wooding, 1972), que es comprobada por la observación de gran cantidad de plasmalemasomas en las micrografías electrónicas de transmisión (Figura 6b).

Las leches homogeneizadas fueron las que reaccionaron más rápidamente con la lipasa pancreática; las diferencias estadísticas entre estas velocidades de reacción, fueron altamente significativas entre sí ($P < 0,04$). Las diferencias ultraestructurales entre estas leches se pueden observar en las Figuras 7a, 7b y 7c, en donde se aprecia que en la leche A, la reacción fue más drástica, al grado de que en la alícuota tomada a los 180 min sólo quedaron fragmentos de GGL a manera de cascarones vacíos. Las leches B y C, ultraestructuralmente presentaron un panorama muy similar; aunque como se mencionó la diferencia en las velocidades de reacción fue altamente significativa.

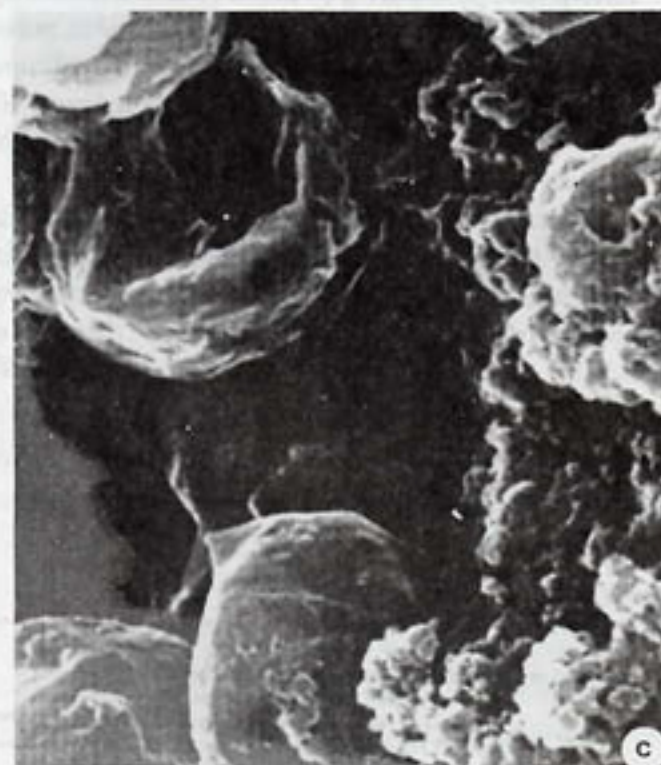
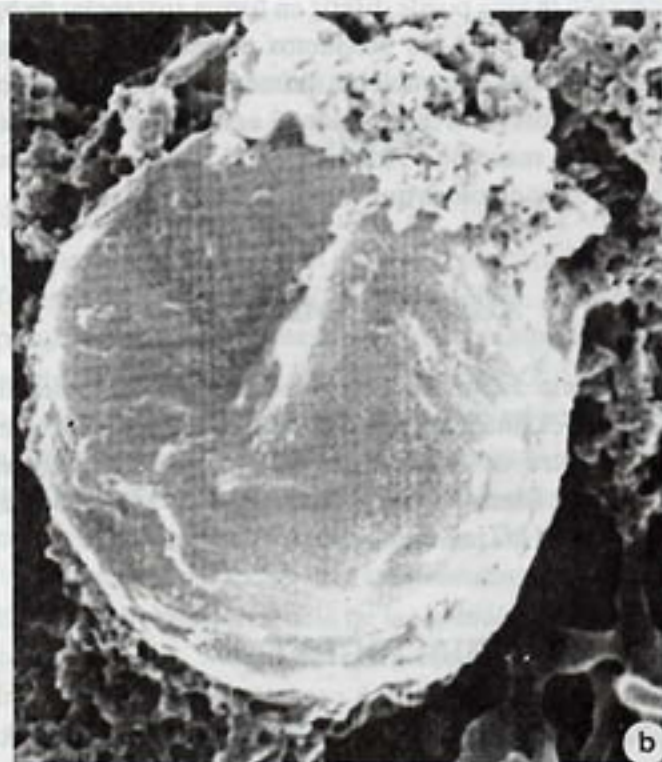


Figura 7. Micrografías electrónicas de barrido de GGL de leche homogeneizada de vaca a 180 min de reacción con la lipasa pancreática

a- Muestra A, (31 000 X)

b- Muestra B, (22 000 X)

c- Muestra C, (15 000 X)

CONCLUSIONES

La acción de la lipasa pancreática sobre la MGGL depende del proceso a que se haya sometido la leche después de excretada.

Las leches homogeneizadas presentaron una velocidad de reacción mayor con la lipasa pancreática que las leches naturales, o sea que de alguna manera el proceso de homogeneización facilita la acción *in vitro* de esta enzima.

La reacción *in vivo* puede diferir en forma sustancial de lo expuesto aquí, pues los productos de reacción estarían siendo removidos del ambiente químico, y el peristaltismo intestinal favorecería la reacción al agitar continuamente la mezcla de reacción. Además, en el intestino estarían presentes otras enzimas que intervendrían en la reacción.

AGRADECIMIENTO

A la Agencia Japonesa de Cooperación Internacional (JICA), por el financiamiento para la elaboración de este trabajo dentro del marco del IV Curso Regional de Microscopia Electrónica en la Unidad de Microscopia Electrónica de la Universidad de Costa Rica.

BIBLIOGRAFIA

- BAUER, H. 1972. Ultrastructural observations on the milk fat globule envelope of cow's milk. *J. Dairy Sci.* 55:1375.
- BLACKBERG, L., HERNELL, O. & OLIVECRONA, T. 1981. Hydrolysis of human milk fat globules by pancreatic lipase. *J. Clin. Invest.* 67:1748.
- BRACCO, U., HIDALGO, J. & BOHREN, H. 1971. Lipid composition of the fat globule membrane of human and bovine milk. *J. Dairy Sci.* 55:165.
- BRUNNER, J.R. 1976. Characteristics of edible fluids of animal origin: milk. In Fennema, O.R. Principles of Food Science, Part I. Food Chemistry. New York, Marcel Dekker.
- CHEFTEL, J.C. & CHEFTEL, H. 1976. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Vol. I. Zaragoza. Acribia.
- HERANDEZ, F. & AKAHORI, H. 1983. Análisis ultraestructural de glóbulos lácteos de calostro y leche humana. *Rev. Biol. Trop.* 31:245.
- MATA-SEGREDÁ, J.F. 1985. Lipólisis de los glóbulos grasos lácteos. Trabajo no publicado. Escuela de Química. Universidad de Costa Rica.
- WOODING, F.B.P. 1971. The structure of milk fat globule membrane. *J. Ultrastruct. Res.* 37:388.
- _____, 1972. Milk microsomes, viruses and the milk fat globule membrane. *Experientia.* 28:1077.