

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA

ALIMENTARIA

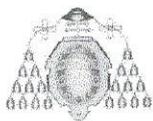
**“MATERIAS PRIMAS PARA LA
ELABORACIÓN DE BASES LÁCTEAS
HIPOALERGÉNICAS”**

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

SORAYA GARCÍA MÉNDEZ

JULIO, 2016



Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Francisco A. Riera Rodríguez (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que Dña. **Soraya García Méndez** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 10ª promoción curso 2015-2016.

Oviedo, de Julio de 2016

D. (Tutor)

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

Agradecimientos:

A Francisco Riera por confiar en mí para la elaboración de este proyecto y su paciencia, disponibilidad y ayuda en todo momento.

A las chicas del “labo”, por los cafés que aunque no digan nada ayudan a desahogar en los momentos más tediosos y, como no, por el gran descubrimiento del año: Juego de Tronos. A Claudia por “su encomiable valor como fregona”, por enseñarme a apreciar el conocimiento inútil y no tan inútil, por el máster intensivo en office y demás herramientas tecnológicas y por encontrar siempre solución a todo, a Melisa por su paciencia y disponibilidad y a Fátima porque a pesar de la distancia siempre ha estado cerca y siempre ha encontrado el modo de compaginar sus cosas con las mías y echarme una mano.

A Ismael por tener la paciencia en el último momento de escuchar la explicación de este proyecto, y ayudarme a buscar una solución y llevarla a cabo.

A mi familia por tanta paciencia y ayuda que me han dedicado siempre, en especial a mi madre porque, aparte de haberme dado la vida, día a día me da mucho más y a María Esther, siempre disponible para escuchar los agobios, resolver cualquier duda y servir de guía.

ÍNDICE

1. Introducción.....	pág 1
1.1. Objeto.....	pág 4
2. Consideraciones teóricas y experimentales.....	pág 5
2.1. Las proteínas lácteas: características estructurales y propiedades.....	pág 6
2.1.1. β -lactoglobulina.....	pág 6
2.1.2. α -lactoalbúmina.....	pág 9
2.1.3. Caseinomacropéptido.....	pág 11
2.1.4. Albúmina de suero bovino.....	pág 12
2.1.5. Inmunoglobulinas.....	pág 12
2.1.6. Lactoferrina.....	pág 12
2.1.7. Lactoperoxidasa.....	pág 14
2.1.8. Proteosomas-peptonas.....	pág 15
2.2. Materias primas como fuente de proteínas lácteas.....	pág 16
2.2.1. Suero lácteo.....	pág 16
2.2.2. WPC.....	pág 16
2.2.3. WPI.....	pág 17
2.3. Antecedentes bibliográficos sobre el fraccionamiento de proteínas del suero lácteo.....	pág 18
3. Materiales y métodos.....	pág 25
3.1. Materias primas.....	pág 26
3.1.1. WPC-35 en polvo.....	pág 26
3.1.2. WPC-65 líquido.....	pág 26
3.2. Disolventes, reactivos y patrones.....	pág 26
3.3. Equipamiento.....	pág 27
3.4. Métodos.....	pág 29
3.4.1. WPC-35 en polvo.....	pág 29
3.4.2. WPC-65 líquido.....	pág 30
3.4.3. Análisis de los resultados.....	pág 31
3.4.3.1. HPLC.....	pág 31
3.4.3.2. Electroforesis.....	pág 32

4. Resultados y discusión.....	pág 33
4.1. Análisis HPLC.....	pág 34
4.2. Electroforesis.....	pág 36
4.3. Optimización de las condiciones de precipitación (WPC-65)	pág 38
4.4. Ensayos con el producto WPC-35.....	pág 41
4.5. Aspectos de la investigación continuar en el futuro.....	pág 42
5. Conclusiones.....	pág 43
6. Lista de Tablas, figuras y símbolos.....	pág 45
7. Bibliografía.....	pág 49

Resumen:

En los productos lácteos se pueden encontrar diversas proteínas, como son la α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina o lactoferrina, las cuales tienen numerosas funciones y propiedades que resultan interesantes. La β -lactoglobulina constituye aproximadamente el 50% del contenido proteico total y presenta un elevado carácter alergénico, por lo que su presencia en los alimentos puede causar reacciones no deseadas en los consumidores.

El presente trabajo pretende aportar soluciones al problema expuesto mediante la técnica de separación de proteínas basada en la precipitación termocálica de la α -lactoalbúmina, segunda proteína láctea mayoritaria (20%). Para ello, se ensayaron varias condiciones de trabajo (pH, temperatura, y adición de diferentes ácidos) y se concluyó que las óptimas fueron: pH=4, temperatura= 55°C, y ácido cítrico como agente acidificante y quelatante.

Por otro lado, también se utilizaron distintas materias primas (WPC-65 líquido y WPC-35 en polvo) para determinar el precursor proteico más apto para la separación. Los resultados obtenidos en los diferentes análisis ponen de manifiesto que el rendimiento separativo es mayor cuando se utiliza el precursor líquido.

Bajo las condiciones anteriormente citadas, las cantidades de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, en sus variantes genéticas A y B, recuperadas fueron: 11,14%, 73,24% y 69,72%, respectivamente.

Para los análisis de los resultados se utilizaron las técnicas de HPLC en fase reversa (columna utilizada C18) y electroforesis en gel SDS-PAGE.

Abstract:

In dairy products we can find some proteins, such α -lactalbumin, β -lactoglobulin or lactoferrin, which have large functions and features that are interesting. β -lactoglobulin amounts to approximately 50% of the total protein contents, and has a high rate of allergenicity, so its presence in food can cause adverse reactions in consumers.

The present work aims to provide a solution to the above problem by using a separation technique based on thermocalcic precipitation of α -lactalbumin, which is the second major dairy protein (20%). To achieve this, various working conditions were tested (pH, temperature, different acids added) and the optimum conditions found were: pH=4, temperature= 55°C, and citric acid.

On the other hand, different raw materials (liquid WPC-65 and powdered WPC-35) were also used to determine which of them would perform better in the separation process. The results obtained in different analysis proved that the best separation was obtained by using liquid WPC.

Under the above conditions, the amounts of α -lactalbumin and β -lactoglobulin, in their genetic variants A and B, recovered were 11.14%, 73.24% and 69.72%, respectively.

The analytical techniques used to identify and quantify the proteins in this study were reverse-phase HPLC and SDS-PAGE electrophoresis.

1. Introducción

En la industria láctea se generan grandes cantidades de suero, en su mayoría procedentes de la fabricación de quesos, por precipitación de la caseína. Una composición aproximada del suero dulce, dada por Lucena et al. 2007, es la siguiente:

Tabla 1: Composición del suero dulce, Lucena et al. (2007).

pH	6,2
Extracto seco (%)	6,2
Proteínas (% E.S)	10
α-lactoalbúmina (g/l)	0,7
β-lactoglobulina (g/l)	3,0
BSA (g/l)	0,5
Igs (g/l)	0,6
Densidad (g/l)	1027,3
Lactosa (g/l)	49

Como se muestra en la Tabla 1, el suero tiene un contenido en nutrientes elevado, destacando la presencia de proteínas y de lactosa. En la actualidad, diversos estudios pretenden el aprovechamiento del contenido proteico en todos los ámbitos posibles, dejando de considerarlo como mero residuo, residuo que por otra parte, tiene restringido su vertido debido a su DBO, mayor de 35000 ppm, y su DQO, mayor de 60000 ppm, (Fernández, 2012).

Las proteínas séricas tienen numerosas propiedades de interés:

- Nutritivas: según la FAO existen unos niveles de ingesta de aminoácidos recomendados (Tabla 2).

Tabla 2: Necesidades de aminoácidos en la dieta de un adulto (WHO, FAO & UNU, 2002)

Aminoácido	mg/g proteína
Histidina	15
Isoleucina	15
Leucina	21
Lysina	18
Metionina + cisteína	20
Fenilalanina + tirosina	21
Treonina	11
Triptófano	5
Valina	15

Se sabe que hay alimentos muy valorados por su contenido proteico, en estos el contenido aminoacídico que aportan, teniendo en cuenta la recomendación anterior, es:

Tabla 3: Distribución de los aminoácidos en los alimentos (WHO, FAO & UNU, 2002)

	Huevo	Ternera	Leche	Soja	Patata	Arroz	Maíz	Trigo
Lisina	139	203	158	144	121	86	58	57
Triptófano	293	213	417	217	240	224	117	217
Treonina	223	202	191	191	167	153	157	127
Aminoácidos sulfurados	225	182	164	114	131	176	132	203
Aminoácidos ramificados	168	144	151	136	120	146	177	122
Aminoácidos aromáticos	301	275	271	281	243	305	314	306

Como se puede observar (tabla 3), el perfil aminoacídico de la leche cubre todas las necesidades de aminoácidos esenciales de la dieta, lo que, unido a su buena digestibilidad, un 95% (WHO, FAO & UNU, 2002), hace que las proteínas lácteas tengan una excelente calidad nutricional.

- Funcionales o tecnológicas: gelificantes, emulsionantes, espumantes, retención de agua, etc.
- Biológicas: anticarcinogénicas, antimicrobianas, anti-oxidantes, antifúngicas y antivíricas.

Además, la naturaleza de las proteínas permite su hidrólisis, ya sea química o enzimática.

Tabla 4: Ventajas e inconvenientes de la hidrólisis química o enzimática (Elaboración propia y Guadix et al. 2000)

	Química	Enzimática
Selectividad	no	Sí
pH y temperatura	Condiciones extremas	Condiciones moderadas
Adición de sustancias	Sí	No
Coste	Bajo	Elevado
Reproducibilidad	Compleja	Posible
Necesidad de Asepsia	No	Media*

*Se trata de un proceso lento en el que se pueden producir contaminaciones microbianas y alteraciones no deseadas

Del proceso de hidrólisis se puede obtener gran variedad de péptidos cuyo interés ha crecido en los últimos años, ya que se ha demostrado su bioactividad como opioides, inmunomoduladores, antimicrobianos, antioxidantes, antitrombóticos, citomoduladores, antihipertensivos, etc. (Muro et al. 2011).

Otros usos:

- Pueden ser añadidos a los alimentos funcionales.
- Para la fabricación de fármacos, con la ventaja de que se trata de productos naturales, ya que proceden de proteínas y no son sintetizados químicamente.
- Utilizados en dietas entéricas como fuente de nitrógeno para adultos enfermos o alimentación infantil (Guadix et al. 2000).

1.1 Objetivo:

Por todo ello, el objetivo de este trabajo es la separación de las proteínas presentes en un concentrado de suero lácteo. El procedimiento propuesto tiene además una ventaja adicional como es la separación de la b-Lg que es una proteína ampliamente descrita en la literatura por su carácter alergénico que puede explicar algunas intolerancias que presentan algunos sectores de la población al consumo de leches y de derivados de suero.

Hay que decir que la separación de cada proteína, es, en sí mismo, un objetivo de gran interés. Cada proteína tiene una función destacada y su efecto se potencia si se encuentra aislada o, al menos, concentrada, y además, pueden tener propiedades antagónicas, por lo que en una mezcla, como es un WPC, sus propiedades pueden reducirse o anularse. Otra de las ventajas derivadas de la separación es que la hidrólisis enzimática será más fácil de controlar en todos sus parámetros y la identificación de los péptidos bioactivos resultantes será mucho menos compleja. Por otro lado, también resulta de interés desde el punto de vista económico, ya que si se precisa de una función característica de una proteína en concreto, la cantidad de producto mezcla necesario aumenta al disminuir el contenido de dicha proteína en el material de partida.

Resumiendo:

- Un método de bajo coste, tanto de reactivos como de complejidad en cuanto a equipos necesarios, coste energético de operaciones, etc.
- Utilización de reactivos aptos para su uso en alimentos, ya que el destino final del preparado proteico será la cadena alimentaria.
- Facilidad de paso de escala para llevarlo a cabo industrialmente.
- Buena separación: se pretende conseguir un buen rendimiento con una pureza elevada, sobre todo en el caso de la separación selectiva la β -lactoglobulina, debido a sus características alergénicas.
- Evitar la desnaturalización irreversible, ya que ello provocaría una pérdida de su funcionalidad y propiedades.

2. Consideraciones teóricas y experimentales

2.1 Las proteínas lácteas: características estructurales y propiedades.

Las proteínas que se encuentran en los productos lácteos y su distribución en los mismos se puede observar en la tabla 5.

Tabla 5: Distribución del contenido proteico de un suero o derivados (Bonnaillie & Tomasula (2012))

Proteína	Contenido
β-lactoglobulina	50%
α-lactoalbúmina	20%
CMP (caseino macro péptido)	15-20%
BSA (Bovine Serum Albumin)	
Inmunoglobulinas	
Lactoferrina	≤10%
Lactoperoxidasa	
Proteosas-peptonas	
Caseínas residuales	

Todas ellas tienen numerosas características y propiedades, algunas de las cuales se describen a continuación:

2.1.1. β-lactoglobulina:

Características estructurales: Es una proteína de morfología globular que se encuentra presente en leches procedentes de multitud de animales pero no en la de los humanos ni en la de lagomorfos (Kontopidis et al. 2004). Su composición aminoacídica no es muy común en una proteína y su elevado contenido en la leche de rumiantes muestra que su valor nutricional para los mismos es elevado (Sawyer et al. 1998). Soluble en un gran intervalo de pH y reconocida como GRAS (generally recognised as safe) (Wilde et al. 2016).

Se trata de una proteína que presenta polimorfismo; existen 6 variantes genéticas (AA, BB, AB He, AB Ho, A y B (Veli & Rivas 2010)) siendo las más comunes en la leche bovina las de tipo A y B (Sawyer et al. 1998). Puede presentar diferentes grados de agregación; cada monómero está compuesto por 162 aminoácidos con un peso molecular de 18,4 kDa con dos enlaces disulfuro en su estructura tridimensional, formados entre Cys 106-119 y Cys 66-160, (He et al. 2016). Su estructura cristalina en estado sólido se puede observar en la Figura 1. Se trata de un cáliz formado por un -barril-β compuesto por 8 láminas β antiparalelas y una α-hélice con 3 giros de vuelta más una novena lámina β situada en el exterior de la estructura de barril (He et al. 2016).



Figura 1: Estructura tridimensional de la β -lactoglobulina en forma monomérica, las láminas β se representan por flechas, en las que la punta se corresponde con el carbono $-C$ terminal, y las hélices α por zonas más oscuras (Sawyer et al. 1998).

Propiedades: esta proteína tiene una gran variedad de propiedades y aplicaciones muy interesantes que derivan de su estructura. Perteneció a la familia *lipocalycin* y, como tal, puede interactuar con grupos funcionales o moléculas de naturaleza hidrófoba y anfífilica, como ácidos grasos, alcoholes, retinol, beta-caroteno, fosfolípidos, vitamina D, ácido fólico y compuestos fenólicos (He et al. 2016). Su interacción con estas especies puede reducir su funcionalidad y propiedades (Wilde et al. 2016). Por otro lado, según Fox (1995) y Sawyer et al. (1998) esta proteína puede perder funcionalidad tras los tratamientos térmicos a los que se somete la leche en su procesado. Algunas de sus propiedades más destacadas son:

- **Emulsificante:** por sus propiedades surfactantes, sirve como estabilizador de emulsiones de aceite en agua (Purwanti et al. 2016). El tratamiento térmico induce la reducción del contenido en α -hélice de su estructura, lo que incrementa la hidrofobicidad de su superficie y la flexibilidad de la molécula y a su vez la capacidad de estabilizar emulsiones. Estas características también dependen del pH de la emulsión, siendo el óptimo 7 (Kim et al. 2005).
- **Gelificante:** la conformación tridimensional de esta proteína, permite que en su interior se acumule gran cantidad de agua y otras moléculas que aportan, a los alimentos en que se incorpora, la estructura, textura y estabilidad deseable (Estévez et al. 2016).
- **Nutricionales:** elevado valor y calidad nutricional (Wilde et al. 2016).
- **Inhibidora de la enzima** que facilita la síntesis de la angiotensina (ACE) (Zheng et al. 2016).
- **Actividad anticarcinogénica** (Zheng et al. 2016).
- **Actividad antimicrobiana** (Zheng et al. 2016).

2. Consideraciones teóricas y experimentales

- Efecto hipocolesterolémico (Zheng et al. 2016).
- Transfiere inmunidad pasiva al neonato por la lactancia materna (Madureira et al. 2007).
- Participa en la regulación del metabolismo del fósforo en la glándula mamaria (Madureira et al. 2007).
- Nanotransportador: por su estructura y características físico-químicas, esta proteína es un buen medio de transporte para moléculas de pequeño tamaño, muy interesante para moléculas bioactivas. Aspecto que ha despertado gran interés por sus aplicaciones en la administración de fármacos (Wilde et al. 2016).
- Protege a las antocianinas de su degradación (He et al. 2016).
- Es fuentes de cisteína, que juega un papel importante en la síntesis de GSH (glutathion) (Madureira et al. 2007).
- Estimula la lipasa pre-gástrica mediante su unión con ácidos grasos (Jameson et al. 2002).
- Efecto bactericida, en el caso de la β -Lg procedente de ganado bovino (Jameson et al. 2002).
- Capacidad espumante por burbujeo: en su estado nativo, tratada por el calor o glucosilada (Chevalier et al. 2001).

A pesar de todas sus propiedades positivas, esta proteína es el mayor alérgeno que podemos encontrar en la leche bovina (Wilde et al. 2016). Se ha demostrado que el 60% de los niños que sufren alergia a la leche de procedencia bovina, la presentan a esta proteína (Zhong et al. 2016), ya que resiste muy bien las condiciones gástricas del aparato digestivo gracias a su estructura (Wilde et al. 2016). Para disminuir la alergenicidad de los productos lácteos, se han utilizado numerosas técnicas, como tratamientos de presurización, térmicos, hidrólisis enzimáticas, fermentación, glicación, etc. (Zhong et al. 2016).

La β -lactoglobulina puede sufrir polimerización, fenómeno que se facilita cuando realizamos un tratamiento térmico a pH ácido (Mudgal et al. 2011). En todo caso, la polimerización de la proteína depende:

- de la concentración inicial a la que se encuentre: para una concentración menor del 5% se presenta en forma no agregada casi en su totalidad (Mudgal et al. 2011).
- del protocolo de calentamiento seguido.
- del tipo y concentración de sal añadida: decrece cuando se añade NaCl.
- del pH: la agregación se revierte por completo cuando nos alejamos del pl tanto por arriba como por abajo (Nicolai et al. 2011). Se encuentra como dímero a pH entre 7 y 5,2, como octámero entre 5,2 y 3,5 y como monómero cuando el pH se encuentra por debajo de 3 o por encima de 8 (Madureira et al. 2007).

2.1.2. α -lactoalbúmina (α -LA):

Características estructurales: Es la segunda proteína más abundante de la leche, tiene un peso molecular de 14,2 kDa y su punto isoeléctrico se sitúa en 4,2 (Lam & Nickerson, 2015); se encuentra unida a dos átomos de calcio (Permyakov & Berliner, 2000).

La α -LA de la leche procedente de ganado bovino consta de 123 residuos aminoacídicos, al igual que la procedente de la mayoría de mamíferos (Permyakov & Berliner, 2000).

La estructura tridimensional de la α -lactoalbúmina (Figura 2) se compone de dos dominios, uno mayor en forma de α -hélice compuesto por 4 α -hélices y otro más pequeño formado por láminas β y zonas en bucle (Permyakov & Berliner, 2000). Sin embargo, esta estructura se modifica en las condiciones siguientes:

- **pH:** a pH extremos, como por ejemplo 2, la estructura de la proteína es más abierta (Cornec et al 2001).
- **Temperatura:** a temperaturas superiores a los 90°C se produce una desnaturalización irreversible (Fang & Dalgleish 1998).
- **Presencia de Ca^{2+}** en el medio: la interacción con el ion metálico hace que la proteína sea menos flexible y más resistente a la temperatura. En ausencia del catión calcio la temperatura de desnaturalización es de 35°C, mientras que cuando la proteína interacciona con dicho ión esta temperatura se sitúa aproximadamente en los 64°C (Relkin et al 1993).

Sin embargo esta interacción complejante se inhibe a pH ácido, al aumentar la temperatura o con la presencia de algún agente desnaturalizante con una interacción más fuerte con el calcio. En cualquiera de estas circunstancias se libera la α -lactoalbúmina, que tiende a tomar la conformación comúnmente conocida como de glóbulo fundido, o apo- α -lactoalbúmina (Ewbank & Creighton, 1993). Según Dolgikh et al. (1981) se trata de un estado compacto en el que la estructura terciaria fluctúa y cuyo radio de giro incrementa con respecto al estado nativo en aproximadamente un 10% (Kataoka, et al. 1997). En este estado la proteína conserva su forma globular natural aunque en apariencia hinchada ya que se encuentra altamente hidratada, unida a 270 moléculas de agua (Permyakov & Berliner, 2000). Debido al plegamiento terciario podemos asumir que el calor tiene una gran capacidad para desdoblar la α -LA en su estado de glóbulo fundido. Por otro lado, se sugiere que interacciones hidrofóbicas también participan en la adopción de este estado conformacional y que los puentes disulfuro contribuyen a estabilizarlo (Kataoka, et al. 1997).

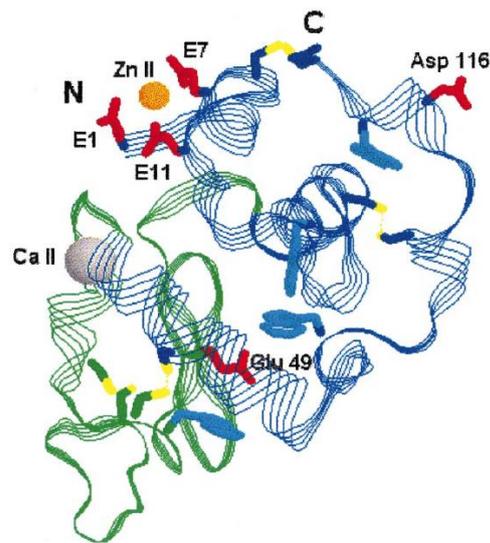


Figura 2: Estructura tridimensional de la α -lactoalbúmina determinada por rayos X (Permyakov & Berliner, 2000)

El estado nativo de la α -lactoalbúmina tiene 4 enlaces disulfuro (Cys 6-120, Cys 28-111, Cys 61-77 y Cys 73-91). Cuando la proteína está plegada, la escisión reductora del enlace disulfuro 6-120 se produce muy rápidamente y deja a la molécula con 3 enlaces disulfuro, que junto a los enlaces con Ca^{2+} , mantienen la estructura plegada de la molécula. Si la concentración de iones Ca^{2+} es muy elevada, se produce la escisión de otro enlace disulfuro (28-111) (Ewbank & Creighton, 1993). Los enlaces disulfuro son los que mantienen la estructura terciaria del dominio de α -hélice cuando la proteína se encuentra en el estado de glóbulo fundido (Kataoka, et al. 1997).

La unión de cationes a la molécula incrementa su estabilidad, incluso en el caso de otros cationes metálicos, excepto en el caso del Zn^{2+} que disminuye la estabilidad térmica. Ello facilita la agregación e incrementa la susceptibilidad a ser digerida (Permyakov & Berliner, 2000).

La α -lactoalbúmina puede interactuar con compuestos orgánicos de bajo peso molecular y también con las membranas lipídicas (Permyakov & Berliner, 2000).

Propiedades:

- Nutricional.
- Participa en la síntesis de la lactosa como componente de la enzima lactosa sintetasa (Permyakov & Berliner, 2000).
- Su digestión con tripsina o quimiotripsina produce péptidos con función bactericida, fundamentalmente contra Gram-positivas (Permyakov & Berliner, 2000).
- Anticarcinogénica: Reduce el riesgo de incidencia de determinados cánceres y tiene efectos que disminuyen la proliferación de las células del adenocarcinoma de colon (Madureira et al. 2007).

- Reguladora del estado fisiológico de las células de las glándulas mamarias (Permyakov & Berliner, 2000).
- Efectiva para el tratamiento de la enfermedad de estrés inducido (Madureira et al. 2007).
- Emulsificante: las proteínas de leche han demostrado tener una elevada tendencia a la reticulación con transglutaminasa; cuando esto ocurre con la α -lactoalbúmina se produce la formación de agregados de proteína unidos covalentemente, que actúan como emulsificantes, situándose en la interfase entre el agua y el aceite, aunque no destaca por esta propiedad (Sharma et al. 2002). Esta capacidad mejora cuando se encuentra en un ambiente en ausencia de calcio, a pH 7 y con un tratamiento previo de 65°C (Lam & Nickerson, 2015).

2.1.3. Caseinomacropéptido (CMP):

Características estructurales: El caseinomacropéptido es el segmento C terminal de la κ -caseína, que se libera por la acción de la quimosina en la fabricación del queso, presente solo en suero dulce. Su composición es variable dependiendo de la leche de la que proceda (Svanborg et al. 2016).

Es la tercera fracción peptídica más abundante en los productos comerciales de proteínas séricas, ya que supone un 15-20 % en peso de la fracción proteica total o incluso más si las proteínas han sido sometidas a un tratamiento térmico intenso previo a la fabricación del queso para desnaturalizarlas y así conseguir una mayor retención de las mismas y mejor rendimiento quesero (Croguennec et al. 2014).

Propiedades:

- Inhibición de la adhesión de bacterias y virus a las células del epitelio bucal y a la placa dental (Madureira et al. 2007).
- Inhibe la unión de la toxina colérica a los puntos de recepción (Madureira et al. 2007).
- Actividad antibacteriana contra las *E. coli* enterotoxigénicas (Madureira et al. 2007).
- Antivíricas (Madureira et al. 2007).
- Efecto negativo sobre la resistencia de los geles térmicos formados a partir de WPC o WPI (Svanborg et al. 2016).
- Acción bioactiva en las funciones gastrointestinales a corto plazo: participa en la defensa intestinal impidiendo que toxinas, bacterias y virus se unan al epitelio; favorece el desarrollo de la microbiota favorable y participa en la modulación del sistema inmune; participa en la regulación de las secreciones pancreáticas y estomacales; modifica el perfil de estas secreciones por la inhibición del aumento de secreción de ácido clorhídrico tras la ingesta de alimentos, disminuyendo también así la incidencia de

úlceras y acidez estomacal, ayudando también al tratamiento de infecciones causadas por *H. Pylori* (Guilloteau et al. 2010).

2.1.4. Albúmina de Suero Bovino (BSA):

Características estructurales: Esta proteína no se sintetiza en la glándula mamaria pero aparece en la leche debido a la transmisión de la misma desde el torrente sanguíneo. Contiene 582 residuos aminoacídicos y presenta un peso molecular de 66,2 kDa. Posee 17 enlaces disulfuro en su estructura y un tiol libre en la posición 34 (Madureira et al. 2007).

Propiedades:

- Punto de unión de ácidos grasos: lo que permite su participación en la síntesis de lípidos (Madureira et al. 2007).
- Acción anti-oxidante: protege a los lípidos de la oxidación fenólica (Madureira et al. 2007).
- Acción anti-cancerígena: por su capacidad para inhibir el crecimiento de los tumores (Madureira et al. 2007).

2.1.5. Inmunoglobulinas:

Se trata de un grupo complejo de proteínas que son producidas por los linfocitos B y que están presentes en los fluidos fisiológicos de todos los mamíferos. Deben su nombre a su poder inmunológico. En cuanto a su estructura las IG son monómeros o polímeros de una molécula de cuatro cadenas, que consta de dos cadenas polipeptídicas ligeras (cuyo peso molecular se sitúa en torno a los 25 kDa) y otras dos pesadas (50-70 kDa) (Madureira et al. 2007).

- **Propiedades:** Antimicrobianas: las gastritis infantiles producidas por *H. Pylori* se combaten de manera efectiva alimentando al paciente afectado con leche que contiene anticuerpos específicos para *H. Pylori*. También se han visto efectos positivos del consumo de estas proteínas en las infecciones por cepas enteropatógenas de *E. coli* (Madureira et al. 2007).
- Antivirales (Madureira et al. 2007).
- Modulación del sistema inmune: proporcionan protección contra enfermedades mediante inmunidad pasiva. La mayoría de los estudios se han centrado en los rumiantes recién nacidos, pero las investigaciones más recientes han comenzado a explorar los efectos sobre los animales no rumiantes y adultos (Madureira et al. 2007). Disminuyen de la presión arterial (Madureira et al. 2007).

2.1.6. Lactoferrina:

También denominada BLF (Lactoferrina Bovina), es una proteína quelatante de hierro. Se trata de una glicoproteína monomérica

compuesta por 692 aminoácidos y con un peso molecular de 80 kDa, a la que están unidos dos grupos de carbohidratos (van der Strate et al. 2001). Está presente en el cuerpo humano, sintetizada por las células epiteliales glandulares y los neutrófilos maduros, y se puede encontrar en la leche, saliva, lágrimas, secreciones nasales e intestinales, jugo pancreático y el fluido seminal. La leche bovina contiene entre 0,02 y 0,35 mg/ml de lactoferrina, dependiendo del período de lactancia, mientras que la leche humana contiene 4,00 mg / ml (Madureira et al. 2007).

Cuando la proteína no está unida al hierro suele denominarse apo-BLF (Madureira et al. 2007).

Propiedades:

- Antibacteriana: tiene actividad bacteriostática y bactericida, gracias a la capacidad secuestrante de hierro (que evita que este elemento esté presente para la actividad metabólica de las bacterias), o por unión directa a su membrana (daña la pared de las bacterias Gram-negativas al unirse a los lipopolisacáridos de la misma). También contribuyen al tratamiento de infecciones entéricas (actúa sinérgicamente con la lisozima o los anticuerpos). Junto con las IGS y la lactoperoxidasa potencia la acción de algunos antibióticos contra Gram-negativas.
 - o Contribuye a eliminar las toxinas de *E. Coli*.
 - o Mejora la susceptibilidad de *S. Aureus* a los mecanismos de defensa.
 - o Inhibe la unión de *Streptococcus Mutans*, principal causante de caries, a los componentes de la saliva.
 - o Protege frente infecciones de *Haemophilus influenzae* que causa otitis media en niños.
 - o Presenta actividad antimicrobiana contra *H. pylori*, *Carnobacterium viridans*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* (Madureira et al. 2007).
- Antifúngica: especialmente contra los hongos pertenecientes al género *Candida* (van der Strate et al. 2001), alterando la permeabilidad de la superficie de las células (García-Montoya et al. 2012).
- Antivíricas: fue la primera proteína a la que se le atribuyó esta actividad. Actúa contra los virus pero no contra las células afectadas, aunque puede actuar sobre ellas antes de que sean infectadas, tal como ocurre en el caso del virus causante de hepatitis B, en el que la lactoferrina se une a las proteínas de la superficie celular bloqueando los receptores de los virus. Es eficaz contra muchas especies de virus como por ejemplo el causante de la Hepatitis C, G y B, Poliovirus, enterovirus, papiloma humano, etc (Madureira et al. 2007).

- Antiparasitaria: actividad que se demostró utilizando péptidos procedentes de la molécula completa y que guarda relación con su capacidad secuestrante de hierro (García-Montoya et al. 2012).
- Modulación del sistema inmune: juega un papel importante en la estimulación del sistema inmune:
 - o Incrementa la actividad de los macrófagos.
 - o Antiinflamatoria: actúa sobre las citoquinas inflamatorias.
 - o Simula la proliferación de linfocitos.
 - o Activa los monocitos.
 - o En ganado ovino se ha registrado la estimulación de la respuesta inmune humoral de las células rojas de la sangre para promover el anticuerpo periférico intestinal adecuado.
 - o Mejora la capacidad inmunológica de las mucosas lo que está directamente relacionado con su capacidad para unirse a la mucosa intestinal (Madureira et al. 2007).
- Anticarcinogénica: el hierro libre presente en el organismo puede actuar como agente mutagénico induciendo un daño oxidativo de la estructura de los ácidos nucleicos, de esta forma cuando la lactoferrina está presente se une al hierro y reduce este riesgo (Madureira et al. 2007).
- Antiaterogénica: inhibe la acumulación de ésteres de colesterol (Madureira et al. 2007).
- Ingrediente bioactivo: ya que pasa a través del tracto gastrointestinal sin sufrir modificaciones y no presenta toxicidad cuando se administra de manera oral (Madureira et al. 2007).
- Precursora de péptidos bioactivos: el tratamiento enzimático de esta proteína con pepsina produce péptidos de bajo peso molecular que poseen propiedades antibacterianas contra un elevado número de Gram-positivas y Gram-negativas (García-Montoya et al. 2012).

2.1.7. Lactoperoxidasa:

Está presente en varias secreciones animales como lágrimas, saliva y leche. Pertenece a la familia de las peroxidases de mamíferos y es una de las enzimas más abundantes de la leche; representa el 1% en peso del contenido total proteico (Madureira et al. 2007).

Propiedades:

- Antimicrobiana: protege frente a la invasión microbiana actuando como ion donador de electrones, es efectiva, por ejemplo, sobre la resistividad térmica de *Salmonella* spp. En general la familia de las peroxidases tienen un importante efecto inhibitorio sobre las caries dentales, en el control de la microbiota que crece en la leche y en la muerte de patógenos mediada por células (Madureira et al. 2007).

2.1.8. Proteosomas-peptonas:

Este grupo es una mezcla compleja y heterogénea de proteínas del suero que permanecen estables al calor y a la acidez del medio (Karamoko et al. 2016, Innocente et al. 1998). La mezcla está compuesta por glicoproteínas, fosfoproteínas y péptidos, se cree que puede contener al menos 38 componentes (Innocente et al. 1998). Son aquellas proteínas que permanecen en solución después de que la leche haya sufrido un calentamiento a 95°C durante 20 minutos y se acidifique hasta pH 4,7 con 12% de ácido tricloroacético (Swaisgood, 1982).

Representa sobre el 10% del peso total de proteína del suero (Innocente et al. 1998).

Propiedades:

- La determinación del nivel de proteosomas-peptonas es un indicador muy sensible del envejecimiento de la leche pasteurizada envasada (De Noni et al. 2007).
- Elevada y rápida capacidad de reducción de la tensión interfacial (Karamoko et al. 2016).
- Precursor de péptidos con actividad antimicrobiana y antiviral, los cuales son eficaces tanto contra Gram-positivas como Gram-negativas además del rotavirus humano (Campagna et al. 2004, Inagaki et al. 2010).
- Actividad antigénica (Innocente et al. 1998).
- Propiedades tensioactivas: capacidad espumante y capacidad emulsificante que depende de la presencia de ciertas glicoproteínas, útil por ejemplo para la fabricación de helados (Innocente et al. 1998, 2002).
- Elevada posibilidad de interaccionar con compuestos orgánicos volátiles, especialmente los más hidrofóbicos, siendo así capaz de retener aromas (Innocente et al. 2001).

2.2 Materias primas como fuente de proteínas lácteas:

La industria láctea ofrece numerosos productos de los que partir para obtener proteínas:

2.2.1 Suero lácteo:

Según el *códex alimentarius*, el suero lácteo es “el producto lácteo líquido obtenido durante la elaboración del queso, la caseína o productos similares, mediante la separación de la cuajada, después de la coagulación de la leche y/o los productos derivados de la leche”, se producen entre 8 y 9 kg de suero lácteo por cada kg de queso fabricado.

Se trata de un producto muy diluido, en torno a un 94% de su composición es agua, lo que, además, dificulta el manejo y los procesos de aprovechamiento.

Una de sus utilidades principales es la producción de proteínas minoritarias a escala industrial como la lactoferrina y la lactoperoxidasa, proceso que requiere de alta tecnología, por lo que no es fácilmente aplicable a cualquier industria.

Lo más común para su aprovechamiento es transformarlo en otros productos como son el WPC y el WPI que se describen a continuación.

2.2.2 WPC:

Se corresponde con las siglas de Whey Protein Concentrate, cuyo significado es concentrado proteico a partir de suero. Se obtiene, como su propio nombre indica por concentración del suero en varias fases:

- Desgrasado y eliminación de sólidos.
- Pasteurización.
- Ultrafiltración.

De ésta forma se suele conseguir de un 35 a un 80% de proteínas sobre el extracto seco, dependiendo del grado de concentración.

Una vez obtenido el WPC se puede dejar en forma líquida o proceder a su secado para asegurar una mejor conservación, el método más ampliamente extendido es el secado en spray.

2.2.3 WPI:

Se trata de Whey Protein Isolate, un producto parecido al WPC en el que su contenido proteico se eleva más del 80-90%. Se produce mediante ultrafiltración y diafiltración del suero. Este proceso de fabricación hace que su coste sea más elevado.

Se utiliza para la formulación de gran cantidad de preparados proteicos destinados a la alimentación de deportistas.

Para la realización de este trabajo se partirá de WPC ya que su contenido proteico es aceptable para la cuantificación de la separación, además de que su obtención y coste no son excesivos.

2.3 Antecedentes bibliográficos sobre fraccionamiento de proteínas de suero lácteo.

En la literatura científica del tema objeto de este trabajo están descritos diferentes métodos de separación, que se pueden clasificar en dos grandes tipos: los destinados a la obtención de proteínas lácteas separadas para análisis de las mismas en laboratorio, (tabla 6) y los destinados a una obtención a escala mayor (tabla 7).

Tabla 6: Métodos de separación analíticos.

FUENTE	MATERIAL DE PARTIDA	MÉTODO DE SEPARACIÓN	CARACTERÍSTICAS DEL EQUIPO	CONDICIONES DEL ENSAYO	RESULTADOS OBTENIDOS
El-Sayed & Chase 2009	WPC- 80	Columnas empaquetadas.	Columna grande: 5 ml. 1,6 cm Ø interno, 2,5 cm altura del lecho. Columna pequeña: 1ml. 0,7 cm Ø interno, 2,5 cm altura del lecho.	20 °C pH 3,7 con tampón acetato 0,1M. Fracciones separadas → electroforesis en gel (SDS-PAGE)	Recuperación β-LG del 80% (95% de pureza). Recuperación α-LA 84% (32% de pureza).
Santos et al. (2012)	WPC-80	Cromatografía de intercambio iónico.	Columna iónica (Mono Q 5/50 GL).	Dilución del WPC-80 en Tris-HCl (5g/l). Gradiente salino de elución (Tris-HCl 20 mM + de 0 a 1 M NaCl) Fases separadas → electroforesis en gel (SDS-PAGE).	Óptima separación a pH = 6,3 con gradiente lineal de disolventes. La fracción de α-LA+ IGS se recuperan totalmente puras, en la que contiene la BSA → residuos de β-LG. Recuperación de la β-LG del 60,5%.
Naqvi et al. (2010)	Leche fresca bovina	Filtración en gel y electroforesis en poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).	Columna Bio-Gel P10 (2,3 x 83 cm)	pH=3 Separación α+β mediante filtración en gel y purificación de β-LG mediante electroforesis.	Purificación de 10 mg de β-LG en 4-5 horas.
Ye et al. (2000)	Suero de queso.	Cromatografía de intercambio iónico	Columna Dietilaminoetil (DEAE) de 1,5 x 18 cm.	Elución con NaCl en concentración lineal de 0 a 0,3M en 500 ml de disolución tampón 0,05 M de Tris-HCl a pH 8,5.	45 mg de α-LA y 125 mg de β-LG.
Neyestani et al. (2003)	Leche bovina desnatada → suero obtenido de ella por aislamiento de caseína con HCl.	Precipitación de globulinas con sulfato amónico al 50%, dos medios de purificación de β-LG, filtración en gel y cromatografía para β-LG, α-LA y BSA resto de proteínas.	Filtración en gel: columna rellena de Sephadex G-50, de 65 cm de longitud con diámetro interno de 1,6 cm. Cromatografía de intercambio iónico: columna de dietilaminoetil celulosa (DEAE-C).	Filtración: pH = 8,6. Cromatografía: pH=6,5; concentración de NaCl= 0,1 – 0,4 M.	De 50 ml de leche: - 166 mg de β-LG (pureza 100%) mediante filtración en gel y 178 mg mediante cromatografía. - 54,5 mg de α-LA. - 11,5 mg de BSA.

Tabla 7: Diferentes métodos de separación con posibilidad de paso de escala

FUENTE	MATERIAL DE PARTIDA	MÉTODO DE SEPARACIÓN	CARACTERÍSTICAS DE LA MEMBRANA	CONDICIONES DEL ENSAYO	CONDICIONES ÓPTIMAS	RESULTADOS OBTENIDOS
Bonnaillie & Tomasula (2012)	WPI	CO ₂ supercrítico		Varias diluciones de WPI, diferente temperatura, agitación continua.	[WPI]= 10% pH= 4,8-5. T ^a = 65°C.	Pureza de α-LA > 62% con CMP residual del 2- 7%.
Pereira et al. (2011)	Suero.	Sistema acuoso de dos fases (Polietilenglicol 13% p/p y fosfato de sodio 13% p/p)		Suero añadido en fase salina, mezcla del sistema, centrifugado e incubado (25 °C). Variación de pH y de concentración de NaCl.	pH= 6,7 [NaCl]= 0,35 mol/l	α-LA y GMP → fase rica en PEG, extracción del 81,1 y 97,8%. β-LG → fase rica en Na ₂ PO ₄ , rendimiento extractivo del 97,3%.
Montilla et al. (2007)	Suero dulce.	Formación del complejo β-LG- quitosano.		1,4 mg quitosano/ ml suero en acético 0,1M a pH=6,2. Agitación y centrifugación 5000G →10 min.	pH=10 10 ml de acetato de sodio 0,1M.	Precipitación del 85% de la β-LG, el 90% del resto de las proteínas en el sobrenadante.
Mokhtarani et al. (2011)	Suero.	Sistema acuoso de dos fases (Polivinilpirrolidona 40% y fosfato ácido de sodio 20%)		Mezcla del suero en el sistema. Temperatura = 10-35°C pH= 6,5-8,5	pH= 6,5 T ^a = 30°C	La α-LA migra a la fase PVP y la β-LG a la fase rica en sal.
Vyas et al. (2002)	Suero de quesería.	Separación de la β-LG por su afinidad con <i>all-trans-retinal</i> inmovilizado en columna con partículas de biosilicato de calcio.		pH= 5,1. Adsorción y desorción de β-lactoglobulina con tampones fosfato a diferente concentración.		46% de β-lactoglobulina en estado nativo tras 4 ciclos de procesado, pureza del 95%.
He et al. (2016)	WPI 88%	Sistema acuoso de dos fases (poly(ethylene glycol-ran-propylene glycol) monobutyl ether 40%, y fosfato ácido de sodio 15,5%).		Adición de WPI y NaCl en distinta concentración al sistema, centrifugación e incubación (4°C; 12-16 h).	[WPI]=1 mg/ml pH= 4 [NaCl]=0,04 g/ml	Rendimiento extractivo de α-LA 98,23% y β-LG 96,56%.
Bhattacharjee et al. (2006)	Suero.	Ultrafiltración con discos rotatorios	Membrana de polietersulfona en disco giratorio (76 mm Ø, 56 mm	Microfiltración, diafiltración (membrana de PES 5kg/mol). Posterior	pH= 5,6 Presión transmembrana= 5 x 10 ⁵ Pa.	87,6% de pureza de β-LG.

2. Consideraciones teóricas y experimentales

			Ø efectivo). corte → 5, 10 y 30 kg/mol.	ultrafiltración, primero a 30kg/mol y luego a 10kg/mol, en diferentes condiciones.	Rotación de membrana = 300 rpm.	
Konrad & Kleinschmidt (2008)	Suero concentrado.	Ultrafiltración	Membrana de corte 100, 0,093 m ² , de polietersulfona en tipo omega y 150 kDa, 5,5 m ² , de polisulfona en espiral.	Ultrafiltración en modo concentración, hidrólisis del permeado con tripsina, ultrafiltración del resultado y diafiltración del concentrado.	45°C 2 bar pH 6,7	Transmisión de α-LA al permeado del 25% con una pureza del 36% para PES y del 44% para la de polisulfona.
Cheang & Zydny (2004)	WPI enriquecido con BSA.	Ultrafiltración.	Membrana de filtración tangencial, 50 cm ² , de celulosa regenerada. Tamaños de corte 30 y 100 kDa.	Alimentación en disolución tampón fosfato pH=7 Varios flujos y estrategias de filtrado.	Flujo = 50 l/m ² h. 1ª membrana de 100 kDa y después 30 kDa.	α-LA → permeado, separación 95%. β-LG → retenido, separación 70%.
Baldasso et al. (2011)	Suero dulce en polvo.	Ultrafiltración y diafiltración discontinua.	Membrana de polietersulfona en módulo espiral, corte = 10kDa y 0,28 m ² .	50°C. Experimento 1: concentración de 30 l de suero a 6l; 5 etapas de diafiltración. Experimento 2: concentración de 30l de suero a 5l; 4 etapas de diafiltración.	A mayor factor volumétrico de concentración mejor separación de proteínas.	Concentración de las proteínas del suero del 70%
Almécija et al. (2007)	Suero ácido bovino clarificado.	Ultrafiltración	Membrana de cerámica (ZrO ₂ -TiO ₂), 1,20 m de largo, y 0,045m ² . Tres canales con diámetro hidráulico de 3,6 mm.	Volumen de filtrado = 2 l. Flujo= 3,5 m/s. Temperatura= 30 °C.	pH = 3 y 9.	Aumento de la pureza de BSA y lactoferrina en 1,5 veces y la de las IGS en 1,6 veces.
Metsämuuronen & Nyström (2009)	Suero en polvo y suero de leche fresca (mezclas de ácido y dulce).	Ultrafiltración	Membrana plana de 20 x 220 mm, 2x10 ⁻³ m ² . Diferentes materiales poliméricos con corte de 30 y 100 kg/mol.	pH =3,5 - 6,8. Variación de la temperatura, velocidad y presión de filtrado.	Membrana de celulosa regenerada (30 kg/mol) pH = 4,3. Presión transmembrana= 20 kPa. Velocidad = 1m/s. T ² = 40°C.	Incremento de la relación α/β de 13 a 15 en un paso.
Rabiller-Baudry et al. (1998)	WPC 90 en polvo y líquido	Ultrafiltración	Membrana inorgánica de filtración	Presión = 1,5 x 10 ⁵ Pa. 5 m/s.	Membrana modificada con	Permeado de β-LG < 1%. Transmisión

2. Consideraciones teóricas y experimentales

	procedente de suero ácido.		tangencial y diferentes pesos de corte, modificada o no con polietilenamida.	pH = 7. T ^a = 50°C. Variación de la fuerza iónica.	polietilenamida.	de α-LA = 10%.
Arunkumar & Etzel (2014)	Suero permeado de leche obtenido por microfiltración.	Ultrafiltración con membrana cargada.	Membrana de celulosa regenerada, corte 300kDa y 50 cm ² .	Filtración a 40°C y 22°C, 2 bar, pH = 4,3 y 5,2 (+NaCl 1M).	3 etapas con membrana cargada a pH = 4,3; 40 °C; velocidad = 36 l/m ² h.	87% de pureza en α-LA y 83% de β-LG.
Caessens et al. (1997)	WPF (Whey Protein Fraction) 86% en proteína.	Diafiltración y ultrafiltración.	Membrana de 1,4 m ² y peso molecular de corte 10kDa.	Precipitación con TCA. pH ≈ 3,5 T ^a = 20 °C. Diafiltración del 600%. Ultrafiltración del 300% del retenido.		Sobrenadante precipitación: β (86%) y CMP (14%). Diafiltración: extracción del 60% de la β-LG contenida en el WPF con pureza del 95%.
Jara & Pilosof (2011)	WPC 80 en polvo.	Sistema acuoso de dos fases de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y WPC.		Diferentes concentraciones de las dos fases: WPC 8-20% y HPMC 0,5 ó 2% a pH=6,5 y 25°C	Concentración inicial de WPC del 20% (p/p) y de HPMC del 0,5% (p/p).	α y β → fase rica en polisacárido, pureza del 90%.
Pereira et al. (2014)	Suero fresco de leche bovina.	Separación en sistema de dos fases acuosas de Polietilenglicol (PEG) y poliácido de sodio (NaPA).		Diferentes concentraciones de polímeros y diferentes pH. T ^a = 25°C Concentración de NaCl 1%.	[PEG]=12% [NaPA] =12% pH=7,2	α-LA → fase rica en PEG (coeficiente de reparto = 7,2). β-LG → fase con NaPA (coeficiente de reparto = 0,02).
Muller et al. (1999)	Suero ácido	Ultrafiltración	Membrana de óxido de circonio con tres canales, 1,20 m de largo, 3,6 mm de diámetro hidráulico y 0,045 m ² . 300 kg/mol.	Experimentación en diafiltración continua, concentración continua y discontinua.	Concentración de 11-15 veces o proceso combinado de concentración y diafiltración.	Concentración + diafiltración continuas: pureza de α-LA en permeado del 16% y concentraciones de 1,75 g/l.
Konrad et al. (2000)	Suero de leche procesada.	Varios métodos de aislamiento de β-LG.	Dos membranas de microfiltración en espiral, de superficie 6m ² , y poro 0,1 μm.	-Tratamiento peptídico y filtración con membrana. -Precipitación 3% ácido tricloroacético (TCA). -Salting-out.	Tratamiento peptídico (hidrólisis con pepsina, E/S = 0,02%; pH=1,9; 40°C; 2 h y filtración con membrana.	Rendimiento de producción de β-LG en estado nativo del 67,3%.

2. Consideraciones teóricas y experimentales

				-Precipitación térmica selectiva.		
Lozano et al. (2008)	Suero bovino procedente de queso cottage.	Precipitación selectiva con sulfato amónico.		pH= 3,0 4°C. Concentración de sulfato de amonio del 10 al 90%.	Sulfato amónico del 50%, redisolución del precipitado y nueva separación con concentración del 70%.	Rendimiento extractivo de β -LG en el sobrenadante del 14,32% con una pureza del 95%.
Kalaivani & Regupathi (2015)		Separación mediante dos fases acuosas de Polietilenglicol (PEG) y citrato trisódico.		Variables: -Tie Line Length (TLL). -pH -relación de volúmenes -concentración de suero.	TLL = 54,12% (p/p) [Suero] = 30,6% pH= 7,23	Recuperación del 89% de la α -LA, pureza del 96% y del 96% de la β -LG, pureza del 76%.
Byrne & Fitzpatrick (2002)	WPC-30 en polvo	Precipitación selectiva		60°C pH=4,1 (HCl 2M)	Agitación moderada.	El 70-80% de la α -LA precipita a los 50 minutos.
Fernández et al. (2012)	WPC-65	Precipitación termocálcica.		pH=3,5 55°C agitación continua. Lavado de los precipitados.		Eliminación del 92% de β -LG, pérdida de un 5% de la α -LA.
Toro-Sierra et al. (2013)	WPI 895 con 96,3% de proteína	Precipitación termocálcica, microfiltración y ultrafiltración.	Microfiltración: cerámica, corte 100nm y 1,68 m ² . Ultrafiltración : 10 kDa, 17 m ² , módulo espiral de polietersulfona y 25kDa; 3 m ² .	Precipitación: pH= 3,4 50°C. Filtración: pH=3,4 55°C;		Recuperación de α -LA entre 60,7% y 80,4% (pureza del 91,3%) y de β -LG de 80,2% a 97,3% (pureza del 97,2%)..
Bramaud et al. (1996)	WPC líquido	Precipitación termocálcica.		pH= 2,0-8,0. Concentración de calcio ajustada con citrato sódico y ácido cítrico. 20-65 °C.	pH \approx 3,9	Eliminación del 98% de la β -LG.
Fernández et al. (2010)	Suero dulce, WPC-35 y WPC-65.	Precipitación termocálcica.		Ajuste del pH con diferentes ácidos y temperatura controlada en agitación.	Ácido cítrico pH = 4 Temperatura = 55°C	Precipitación de α -LA \approx 80% y de β -LG \approx 10%.
Lucena et al. (2006)	WPC 65 líquido.	Precipitación termocálcica.		pH= 4 55°C 90 min.		Recuperación de α -LA del 85,6% (pureza del 74,2%). Separación de

Lucena et al. (2007)	Suero dulce, WPC-35, WPC-65 y WPI-80.	Precipitación termocálcica.		Agitación continua 500 rpm. pH, relación ácido/Ca ²⁺ y temperatura variables.	WPC-65 50 °C pH = 4 Ácido orgánico/ Ca ²⁺ ≈ 9	β-LG ≈ 100%. Precipitación de α-LA en torno al 90%.
Cheang & Zydney (2003)	Patrones de α-LA y β-LG.	Ultrafiltración	Membranas de polietersulfona (50 kDa) y de celulosa (30 kDa).	Variación de pH y la fuerza iónica.	Diafiltración en membrana de celulosa pH=5,5 50mM de fuerza iónica.	Recuperación del 90% de β-LG en retenido y del 99% de α-LA en permeado.

Las técnicas de separación mediante sistemas acuosos de dos fases no son aplicables para el objetivo de este trabajo puesto que utilizan reactivos no aptos para su uso con alimentos.

En Montilla et al. (2007), la separación se basa en la formación del complejo quitosano-β-lactoglobulina; para que el aprovechamiento de la proteína fuese viable tras el proceso, debería incorporar una fase de eliminación del quitosano, lo que incrementa el coste.

En los procesos que utilizan membranas, se presenta la problemática de que el peso molecular de las dos principales proteínas del suero es muy similar, por lo que la separación puede dificultarse. Un posible remedio sería intentar la octamerización de la β-lactoglobulina.

2.4 Método de precipitación termocálcica

Tras el análisis de los estudios recogidos en las tablas anteriores y teniendo en cuenta los objetivos del presente trabajo, nos centramos en la precipitación termocálcica como proceso de separación de las proteínas objeto de estudio. Diferentes grupos de investigación, como Pierce (1983), Bramaud et al. (1997) y Gésan-Guiziu et al. (1998), han estudiado la solubilidad de las proteínas séricas y llegaron a la conclusión de que la precipitación de la α-LA se producía a una temperatura elevada (sin llegar a la desnaturalización térmica de la proteína), con un tiempo de “maduración” y agitación moderada (Byrne & Fitzpatrick, 2002) y en las siguientes condiciones:

- con un incremento aparente de su tamaño.
- a un pH próximo a su punto isoeléctrico
- con la presencia de un agente quelante de calcio.

Atendiendo a estos resultados, se establecen nuestras condiciones experimentales de trabajo. Como ya hemos visto, al eliminar el calcio de la molécula de α-lactoalbúmina, se produce un cambio conformacional. En él, se encuentra unida a 270 moléculas de

2. Consideraciones teóricas y experimentales

agua, por lo que se habrá conseguido el aumento de su tamaño. Para el ajuste del pH se necesitará un ácido, puesto que el punto isoeléctrico de la α -lactoalbúmina se encuentra en 4,2 y el pH del suero concentrado proteico suele rondar el valor de 6. Si se tiene en cuenta también que algunos ácidos orgánicos, como por ejemplo el etildiamintetraacético (AEDT), el cítrico, o el láctico, son agentes secuestrantes de calcio, podríamos cumplir con todas las premisas de precipitación expuestas. Además estos dos son totalmente inocuos en su uso con alimentos, y el láctico puede obtenerse como subproducto en la industria láctea, por lo que su utilización también supondría un menor coste en el proceso.

3. Materiales y métodos

3.1 Materias primas:

Con el fin de evaluar el método de separación, se utilizaron dos materias primas diferentes: un producto en polvo reconstituido y uno líquido, cuyas características se detallan a continuación.

3.1.1. WPC - 35 en polvo:

Suministrado por CAPSA Foods, procedente de Lactalis ingredients (Bourgarré, Francia). Obtenido por ultrafiltración del lactosuero, concentración y atomización, con una solubilidad mayor del 99%.

Su composición se muestra en la tabla 8.

Tabla 8: Composición aproximada del WPC- 35.

pH	≈ 6,2
Nitratos	< 50 ppm
Humedad	4,0
Proteínas	35,0
Lactosa	53,0
Materia grasa	3,5
Cenizas	7,5

3.1.2. WPC - 65 líquido:

Suministrado por Renny Picot (Asturias, España) cuya composición se puede observar en la tabla 9.

Tabla 9: Composición aproximada del WPC- 35.

pH	≈ 5,80
Densidad (g/l)	1097,00
Proteínas (% E.S)	65
Lactosa (g/l)	48
Ca²⁺ (g/l)	0,87
Na⁺ (g/l)	0,79
K⁺ (g/l)	2,00

3.2 Disolventes, reactivos y patrones:

- Agua destilada.
- Agua milli-Q.
- Ácido clorhídrico 1N (Prolabo) y 0,75 M obtenido a partir de éste.
- Disoluciones 1 y 0,75 M de ácido cítrico anhidro 100% (Panreac).
- Ácido láctico de pureza 85-92% (Panreac) en disoluciones 1 y 0,75 M.
- Acetonitrilo 99,9% para HPLC (VWR Chemicals, Prolabo).

- Ácido trifluoroacético (TFA) 99,9%, CROMASOLV® para HPLC (Sigma Aldrich).
- Patrones:
 - α -lactoalbúmina: α -lactoalbumin from bovine milk, Type III, Calcium depleted, $\geq 85\%$ (Sigma).
 - β -lactoglobulina (DaviSCO, Foods international, INC.)
 - BSA: Albumin, Bovine $\approx 99\%$ (Sigma).

3.3 Equipamiento:

- Reactor de 2 litros de capacidad, construido en vidrio transparente con camisa para su acondicionamiento térmico.

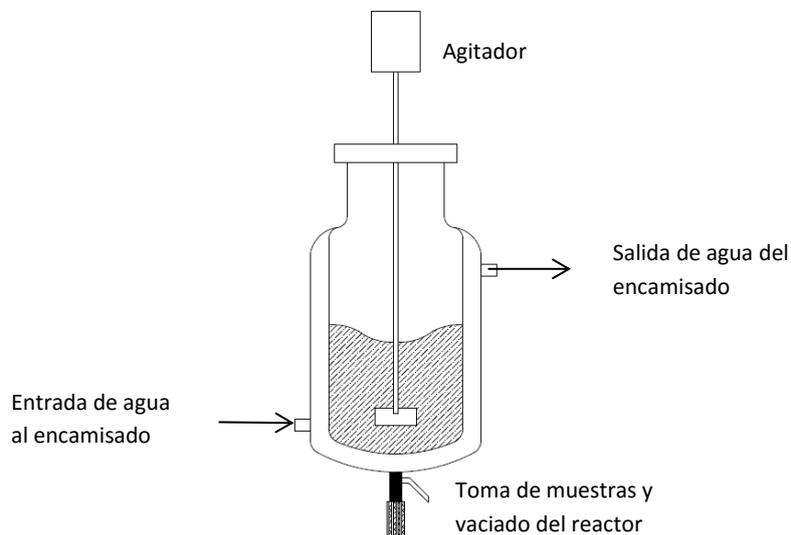


Figura 3: Esquema del reactor.

- Baño de agua para el acondicionamiento térmico del sistema, Modelo Haake DC 10, con depósito Haake B3.
- Centrífuga Kubota 6500, equipada con rotor AG-5004.
- Balanza analítica Mettler Toledo.
- Granatario Cobos CB Complet.

- Equipo para HPLC: Cromatógrafo Agilent 1200 series, equipado con bomba de pistón binaria, autoinyector, detector fotodiodo (PDA) y columna analítica de fase inversa C18 (Jupiter 5u C18 300A, Phenomenex).



Figura 4: Equipo de HPLC

- Equipo para la electroforesis: Bio-Rad.

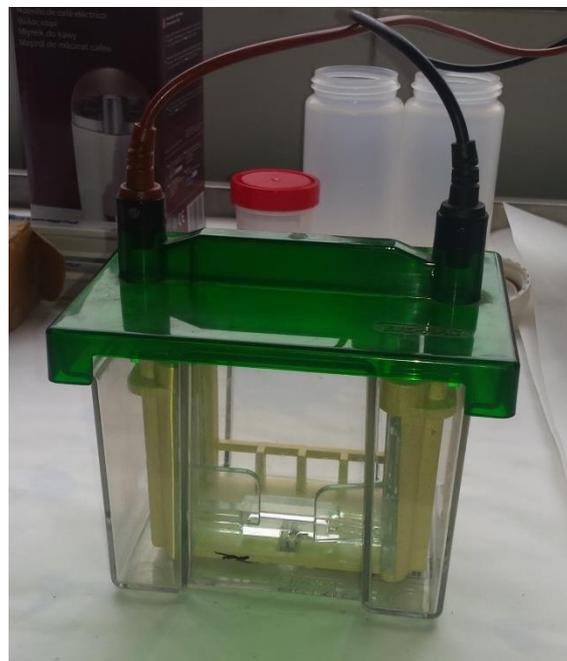


Figura 5: Equipo de electroforesis.

3.4 Métodos:

3.4.1 WPC – 35 en polvo:

En la Figura 6 se muestra un esquema que recoge los diferentes pasos del tratamiento de las muestras. Así, el primer paso supone la preparación de las disoluciones. Teniendo en cuenta los datos aportados por Lucena et al (2007), quienes concluyeron que la concentración de α -lactoalbúmina óptima para la separación que se pretendía llevar a cabo, estaba entre 9 y 12 g/l. La muestra sólida se disolvió hasta obtener una concentración de 286 g/l, en la que la concentración de α -lactoalbúmina se encontraba en ese rango.

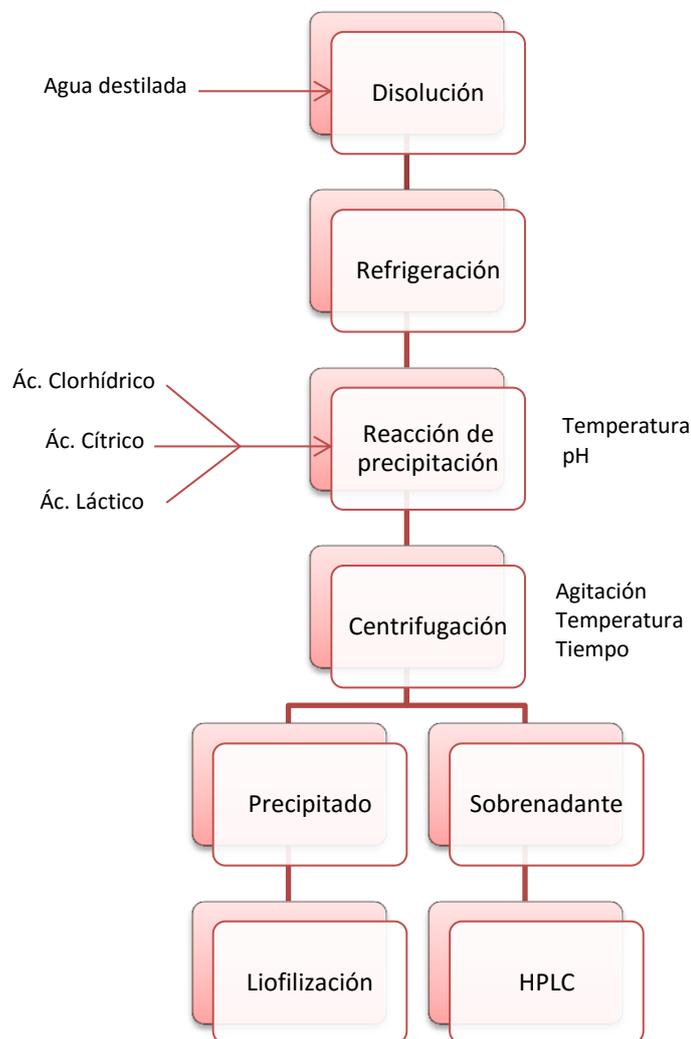


Figura 6: Esquema del proceso de precipitación termocálica.

Para facilitar la reconstitución de las proteínas, la disolución se almacenó a 4°C durante toda la noche. Tras este periodo de tiempo, se tomaron 1,5 l de la disolución y se introdujeron en el reactor con el fin de ajustar las condiciones

necesarias para el proceso. Esta operación se realizó por triplicado, utilizando en cada repetición un ácido diferente (de los anteriormente citados) para ajustar el pH hasta un valor de 4, y con una temperatura de 55°C. Este sistema se mantuvo en estas condiciones durante 90 minutos, siguiendo el protocolo propuesto por Lucena et al. 2006.

Seguidamente, el contenido del reactor fue enfriado mediante un baño de hielo y agitación suave con una placa magnética. Una vez alcanzados 20°C se sometió la suspensión a un proceso de centrifugación en tres pasos:

1. 4000 rpm a 20°C durante 30 minutos.
2. 5000 rpm a 10°C durante 50 minutos.
3. 8000 rpm a 4°C durante 60 minutos.

Con el fin de determinar el grado de separación alcanzado en cada experimento, los sobrenadantes se analizaron mediante HPLC. Por otro lado, los precipitados generados en el proceso de centrifugación se liofilizaron para facilitar su conservación.

3.4.2 WPC – 65 líquido:

Se siguió el mismo procedimiento, a excepción del primer paso, preparación de la disolución, pero en este caso se utilizaron diferentes condiciones de pH y temperatura, ensayando todas las combinaciones posibles, tal como se recoge en la Figura 7:

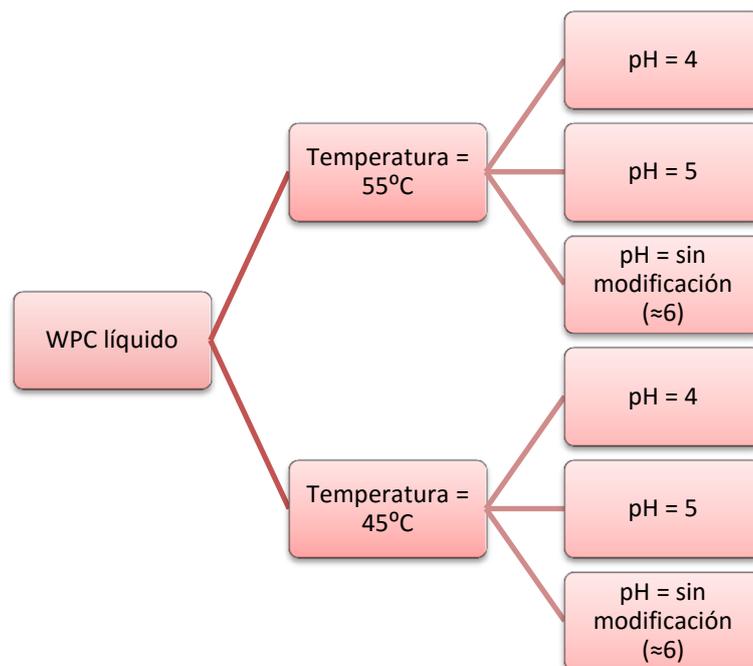


Figura 7: Combinación de las variables de proceso

3.4.3 Análisis de los resultados:

3.4.3.1 HPLC:

Los resultados obtenidos se analizaron mediante los métodos siguientes:

- WPC-35: para esta materia prima los disolventes utilizados fueron :
 - A: 100% agua milli-Q + 0,1% TFA.
 - B: 100% ACN + 0,1% TFA.

El programa de elución seguido fue el siguiente:

Tabla 9: variación de los gradientes de disolventes frente al tiempo para el análisis del WPC-35.

tiempo	%B
0	20,0
1	20,0
7	25,0
20	30,0
25	42,0
48	42,5
50	70,0
55	95,0

Tras el análisis de cada muestra, regresa a las condiciones iniciales de ensayo en 5 minutos.

Flujo 1 ml/min, temperatura de la columna 30°C y volumen de muestra inyectado de 50 µl.

- WPC-65: en este caso, se utilizó el método descrito por Fernández et al. 2011, en él la composición de disolventes era:
 - A: 100% agua milli-Q + 0,1% TFA.
 - B: 80% ACN 20% de agua milli-Q + 0,09% TFA.

El programa de elución seguido fue el siguiente:

Tabla 10: variación de los gradientes de disolventes frente al tiempo para el análisis del WPC-65.

tiempo	%B
0	25
4	48
10	48
12	55
15	65
16	90
20	90

Vuelta a las condiciones iniciales del ensayo en 3 min.

Flujo 1 ml/min, temperatura de la columna 40°C y volumen de muestra inyectado de 50 µl.

3.4.3.2 Electroforesis:

El análisis de los sobrenadantes de las reacciones mediante electroforesis se realizó en un gel con 16% de acrilamida, siguiendo el método descrito por Laemmli (1970).

4. Resultados y discusión

4.1 Análisis HPLC:

En la Figura 8 se puede observar el cromatograma resultante del análisis del WPC-65. La asignación de las señales correspondientes a las proteínas: α -LA, β -LG y BSA, se realizó con los cromatogramas de los patrones de dichas proteínas. En el resto de casos se da una identificación aproximada, utilizando como referencia los cromatogramas obtenidos por Fernández et al. 2011.

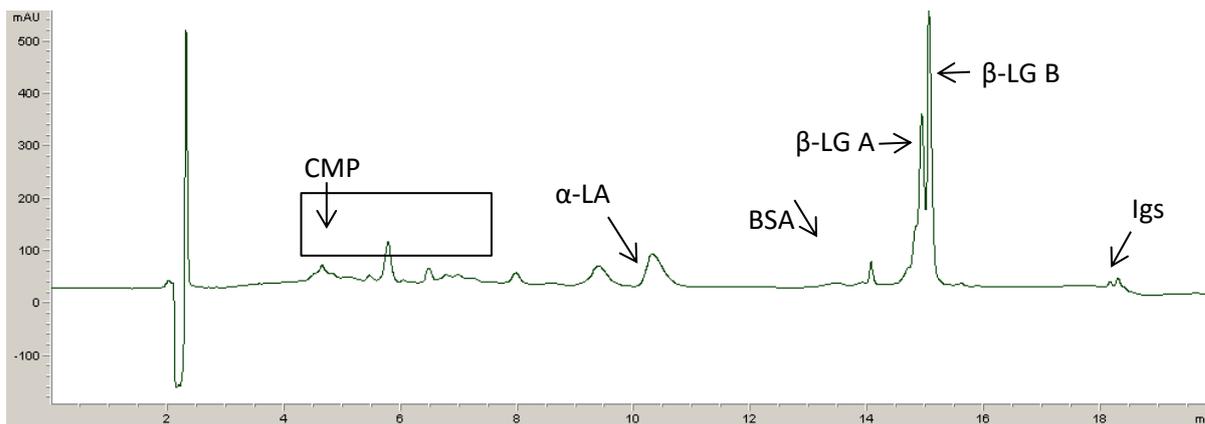


Figura 8: Cromatograma de la muestra de WPC-65 analizada mediante HPLC en fase reversa

La Tabla 11 recoge los tiempos de retención de las proteínas identificadas.

Tabla 11: Tiempos de retención de cada una de las proteínas en la columna Júpiter C18.

Proteína	Tiempo de retención (min)
α -lactoalbúmina	10
β -lactoglobulina	13
BSA	15

En cuanto a los análisis de los sobrenadantes, en la Figura 9 se representan los cromatogramas obtenidos para las condiciones de reacción:

- Ácido cítrico, pH = 4, temperatura 55°C.
- Ácido clorhídrico, pH = 4, temperatura 45°C.

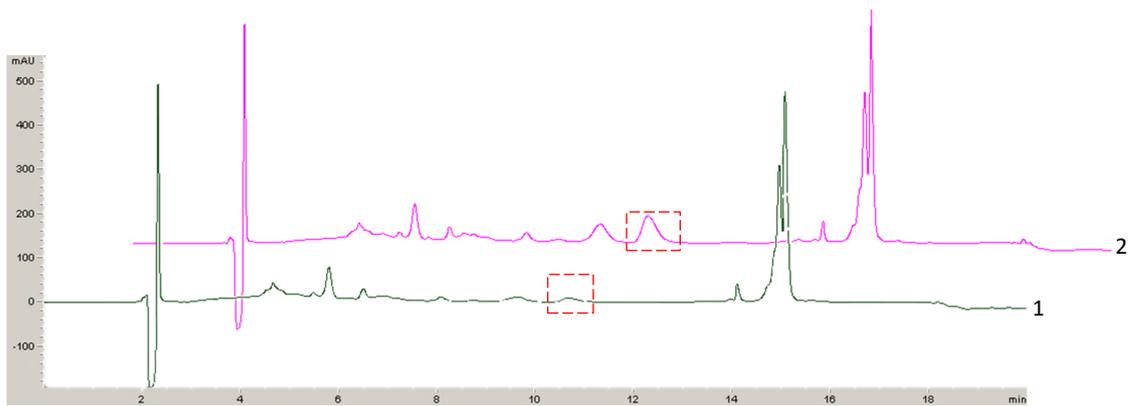


Figura 9: Cromatogramas correspondientes al análisis de los sobrenadantes en las siguientes condiciones:

1. pH= 4; 55°C; ác. cítrico
2. pH= 4; 45°C; ác. clorhídrico.

Como se puede apreciar, si se comparan ambas señales, el tamaño de la correspondiente a la α -lactoalbúmina (resaltada en el gráfico mediante un recuadro con línea discontinua) es significativamente inferior en el caso 1. El área correspondiente a cada pico es de 170,3 y 1096,6 mAU, para 1 y 2 respectivamente. Este dato permite, a simple vista, estimar el grado de precipitación de dicha proteína.

En el caso de la β -lactoglobulina el contenido es similar en ambos sobrenadantes, aunque menor en el cromatograma 1 (área del pico 5296,3 mAU frente a 5900,4 mAU en el cromatograma 2), lo que nos permite interpretar que parte de la proteína ha quedado en el precipitado.

4.2 Electroforesis:

La técnica de electroforesis se utilizó para completar el estudio de caracterización de las proteínas presentes en el WPC-65 y los sobrenadantes. Ello, permitió identificar que la BSA estaba presente en las muestras, habida cuenta de que la concentración a la que se encuentra es demasiado pequeña como para poder discriminar con exactitud la señal correspondiente mediante HPLC (Figuras 10 y 11).

Esta técnica establece la separación de las proteínas en función de su peso molecular. Una vez aplicada la corriente eléctrica en la cubeta, los componentes de la muestra migran a través del gel, siendo los de mayor tamaño los que recorren menor distancia.

Con el fin de que la concentración de las proteínas fuese suficiente y el ensayo fuese eficaz, se prepararon dos gels con diferentes concentraciones de las muestras: 120 (Figura 10) y 180 μ l (Figura 11).

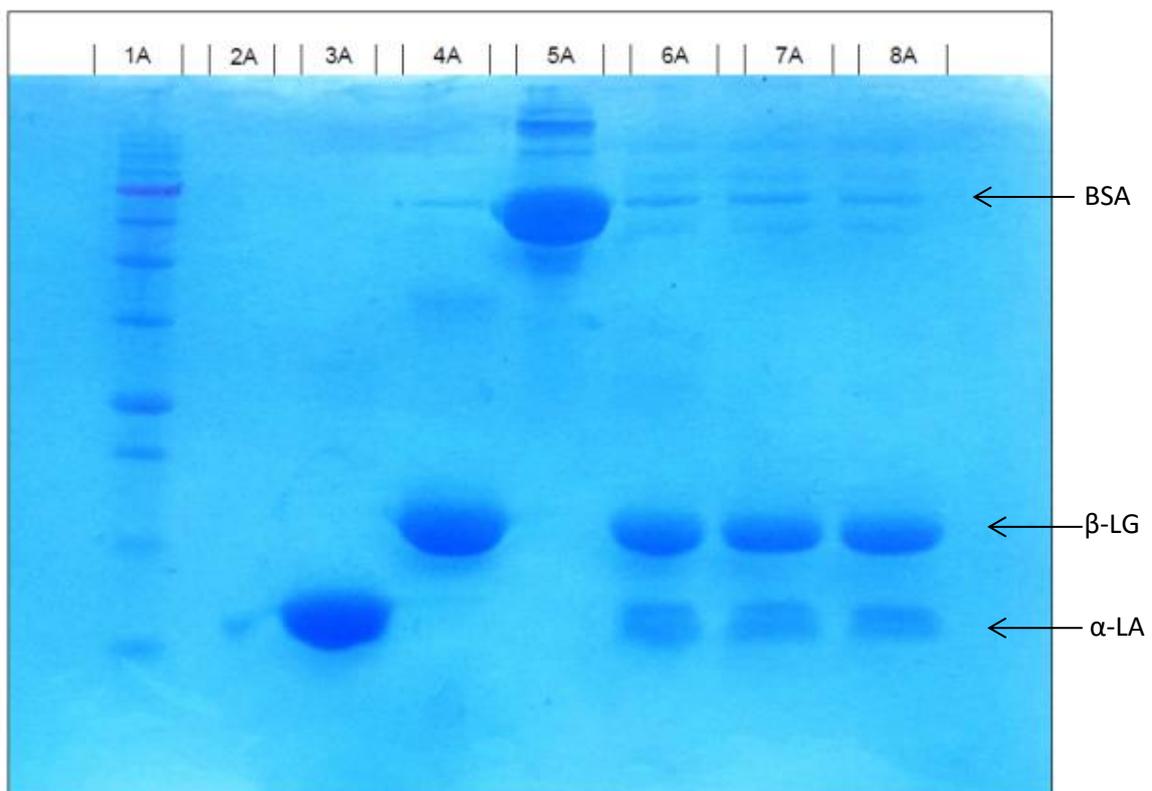


Figura 10: análisis de muestras (preparadas en una disolución de 120 μ l de sobrenadante y enrasado a 10 ml) y patrones de las diferentes proteínas, en gel SDS-PAGE.

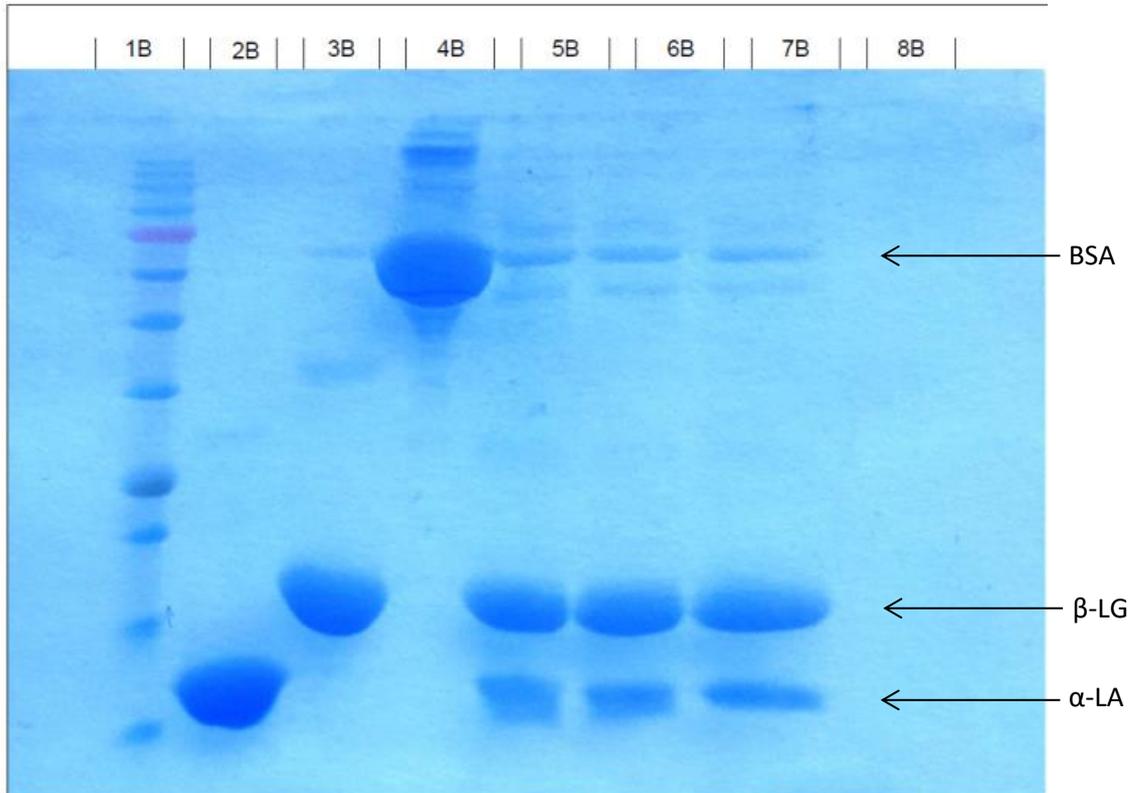


Figura 11: análisis de muestras (preparadas en una disolución de 180 μ l de sobrenadante y enrasado a 10 ml) y patrones de las diferentes proteínas, en gel SDS-PAGE.

En ambas figuras, la línea 1 corresponde al patrón de peso molecular que se utiliza en el análisis, las tres siguientes a una disolución de 2000ppm de los patrones de las proteínas: α -LA, β -LG y BSA (3A, 4A, 5A, 2B, 3B y 4B). Las líneas sucesivas resultan del análisis de las muestras en el orden que se indica a continuación:

- WPC-65 (6A y 5B).
- Sobrenadante resultado de la centrifugación del experimento a pH=5 y temperatura 55°C con ácido cítrico (7A y 6B).
- Sobrenadante resultado de la centrifugación del experimento a pH=5 y temperatura 45°C con ácido cítrico (8A y 7B).

Como se observa, para las tres muestras analizadas se identifican las tres proteínas.

Por otro lado, esta técnica analítica permitiría determinar la concentración de cada una de las proteínas presente en cada muestra analizada. Sin embargo, ello requiere un análisis exhaustivo de las imágenes, que no estaría exento de mayor error que los resultados derivados del HPLC.

4.3 Optimización de las condiciones de precipitación (WPC-65):

Los resultados derivados de los diferentes cromatogramas nos permiten elaborar la gráfica que aparece en la Figura 12. Como se observa en el eje Y se representa el % α -lactoalbúmina y en el eje X las diferentes condiciones de cada ensayo. Así, el menor contenido de α -lactoalbúmina en el sobrenadante se consigue cuando se añade ácido cítrico, hasta un valor de pH=4 y con el sistema a 55°C (11,14%). Mientras que las condiciones en las que el sobrenadante presenta más cantidad de α -lactoalbúmina son utilizando ácido clorhídrico, a pH= 4 y 45°C (89,28%). Por todo ello, las condiciones de separación óptimas, entre todas las estudiadas corresponden a: la utilización de ácido cítrico con control de pH=4 y temperatura del reactor a 55°C.

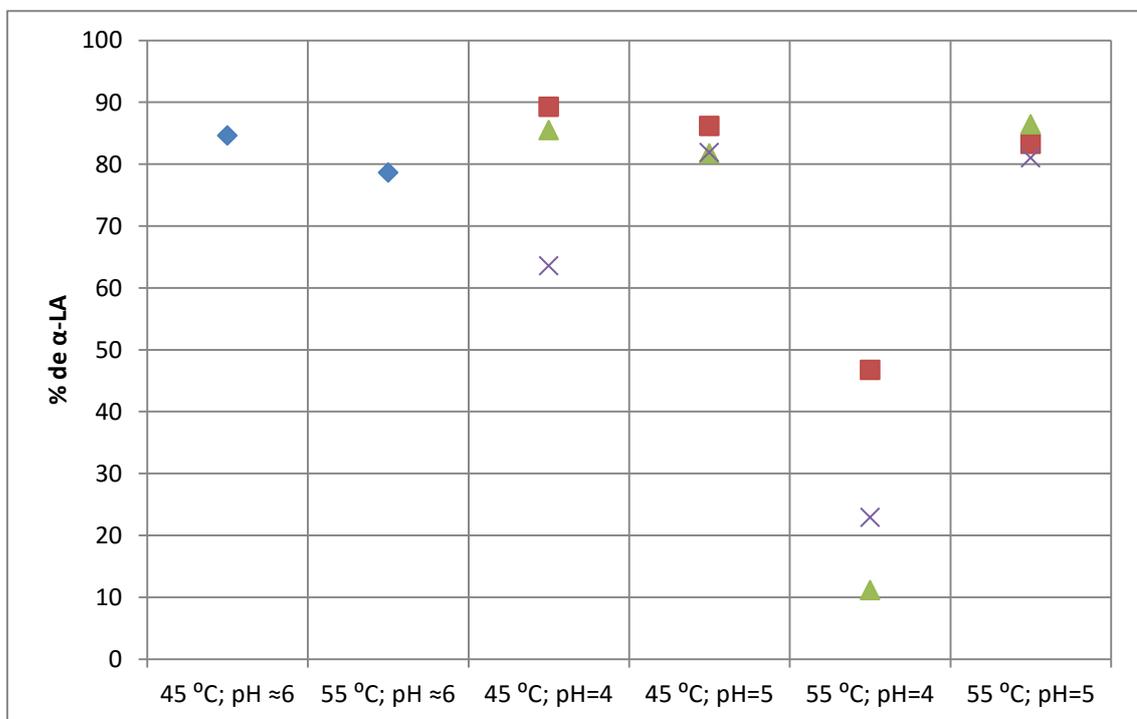


Figura 12: Contenido en α -lactoalbúmina. En el eje X se representan las condiciones del ensayo realizado y en el eje Y el porcentaje de α -lactoalbúmina que permanece en el sobrenadante tras la centrifugación. El ácido clorhídrico viene representado por (*), el ácido cítrico por (Δ) y el ácido láctico por (x). Las muestras a las que no se modificó el pH se representan por (\diamond).

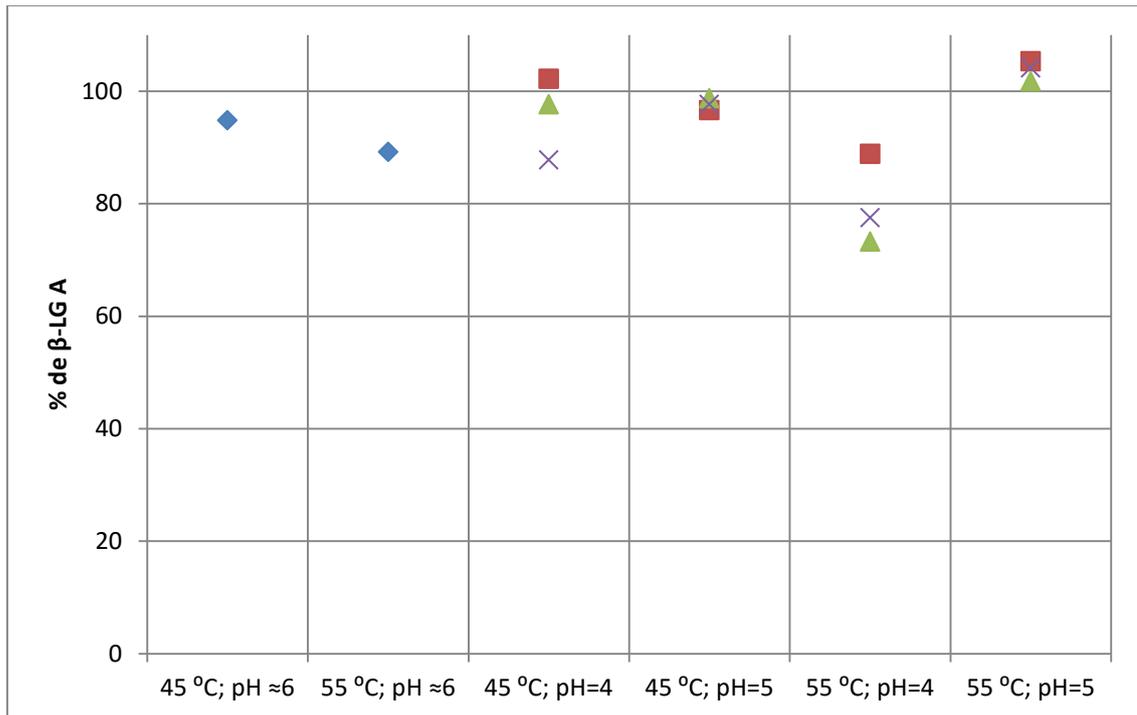


Figura 13: Contenido en β -lactoglobulina A. En el eje X se representan las condiciones del ensayo realizado y en el eje Y el porcentaje de β -lactoglobulina A que permanece en el sobrenadante tras la centrifugación. El ácido clorhídrico viene representado por (*), el ácido cítrico por (Δ) y el ácido láctico por (x). Las muestras a las que no se modificó el pH se representan por (\diamond).

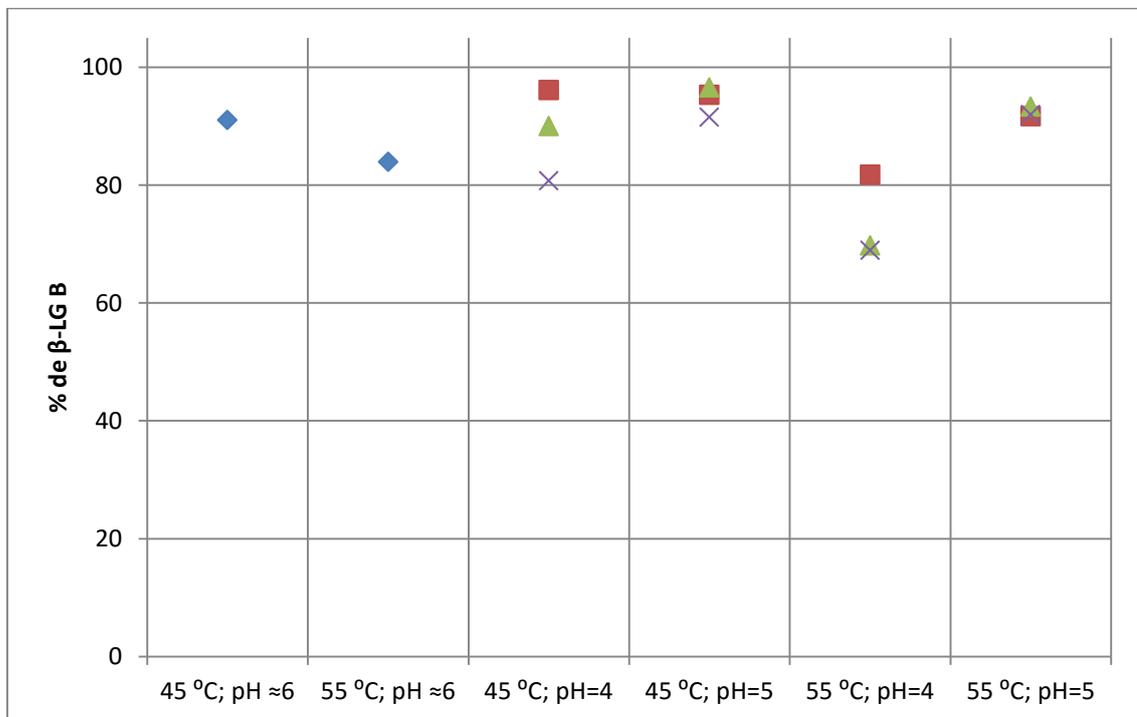


Figura 14: Contenido en β -lactoglobulina B. En el eje X se representan las condiciones del ensayo realizado y en el eje Y el porcentaje de β -lactoglobulina B que permanece en el sobrenadante tras la centrifugación. El ácido clorhídrico viene representado por (*), el ácido cítrico por (Δ) y el ácido láctico por (x). Las muestras a las que no se modificó el pH se representan por (\diamond).

De modo análogo a lo comentado para la α -lactoalbúmina, en las Figuras 13 y 14 se representa la cantidad de β -lactoglobulina A y B, respectivamente, presentes en los diferentes sobrenadantes. El mayor porcentaje de recuperación de su variante genética A, se obtiene a pH=5 y una temperatura de 55°C, independientemente del tipo de ácido utilizado. Cabe destacar que bajo estas condiciones de trabajo los valores obtenidos, tras los cálculos realizados, son ligeramente superiores al 100% del contenido inicial de la muestra, lo cual puede deberse a errores acumulados por una homogeneización deficitaria a la hora de tomar las muestras del sobrenadante o a una precisión escasa en la medición del volumen del mismo tras la centrifugación, aspecto que debería ser revisado en un futuro.

Teniendo en cuenta que la recuperación del máximo contenido en α -lactoalbúmina en el precipitado y de β -lactoglobulina en el sobrenadante son los objetivos planteados al inicio de esta investigación, y que las condiciones óptimas para cada premisa no coinciden, debemos optar por una situación de compromiso para ambos objetivos. Así, las mejores condiciones de trabajo coinciden con las óptimas para la precipitación de la α -lactoalbúmina (ácido cítrico con control de pH=4 y temperatura del reactor a 55°C), pues en dichas condiciones la cantidad de β -lactoglobulina que consigue separar es aceptable, como se puede apreciar en la Figura 15, donde se muestra la cantidad de ambas proteínas presente en el sobrenadante a tales condiciones.

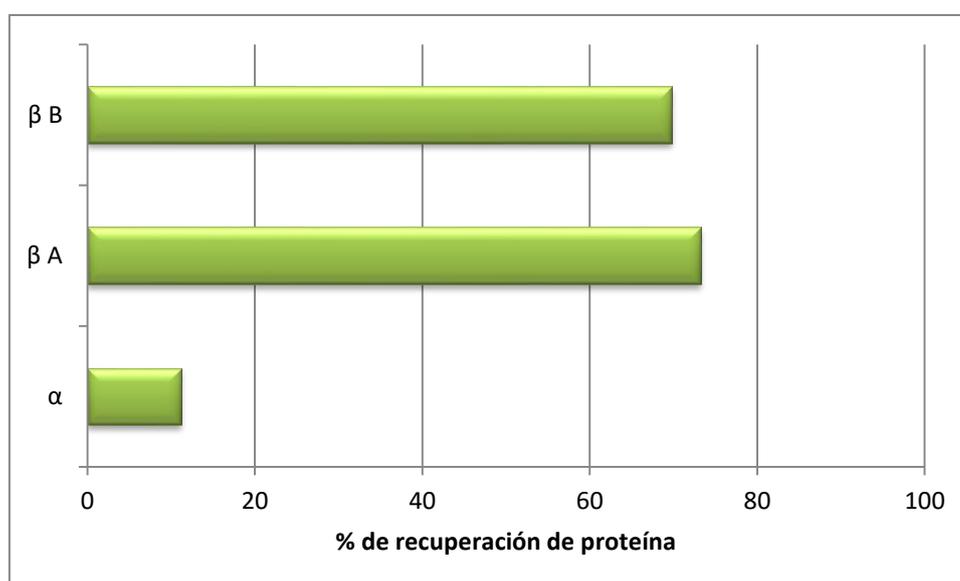


Figura 15: Resultados del análisis del sobrenadante obtenido en el ensayo realizado a 55°C; pH=4; ácido cítrico.

Una posible explicación que nos permita entender la diferencia entre el papel que desempeñan los tres ácidos en el proceso de precipitación termocálcica, podría encontrarse en las diferencias coordinativas de los aniones presentes en las condiciones de los ensayos. Mientras que el ion Cl^- , es una base débil, con capacidad nula para atrapar al ion Ca^{2+} , el ácido láctico y el cítrico son ácidos carboxílicos, cuyas bases conjugadas son fuertes y con gran capacidad coordinativa para atrapar iones metálicos. Por otro lado, el ácido láctico,

[CH₃CH(OH)COOH], es un ácido monocarboxílico y el cítrico, [C(OH)(COOH)₃], es tricarboxílico, lo que determina una mayor facilidad coordinativa de las bases conjugadas derivadas de este último. En consecuencia el ácido con mayor potencial para formar quelatos con el Ca²⁺ es el ácido cítrico.

4.4 Ensayos con el producto WPC-35:

Con el fin de completar el estudio y analizar las diferencias entre la utilización de diferentes materias primas, se completó la investigación con el precursor sólido WPC-35. En este caso, sólo se estudiaron las condiciones óptimas determinadas a partir del precursor líquido, y que han sido discutidas en las secciones previas.

En la Figura 16 se muestran los resultados de recuperación de cada proteína en el sobrenadante tras el tercer paso de centrifugación del WPC-35. Como se puede observar, se obtiene una mayor precipitación de α -lactoalbúmina, al igual que con la materia prima líquida, cuando se utiliza ácido cítrico para el ajuste de pH (95% de precipitación). Sin embargo, en este caso el rendimiento separativo es inferior.

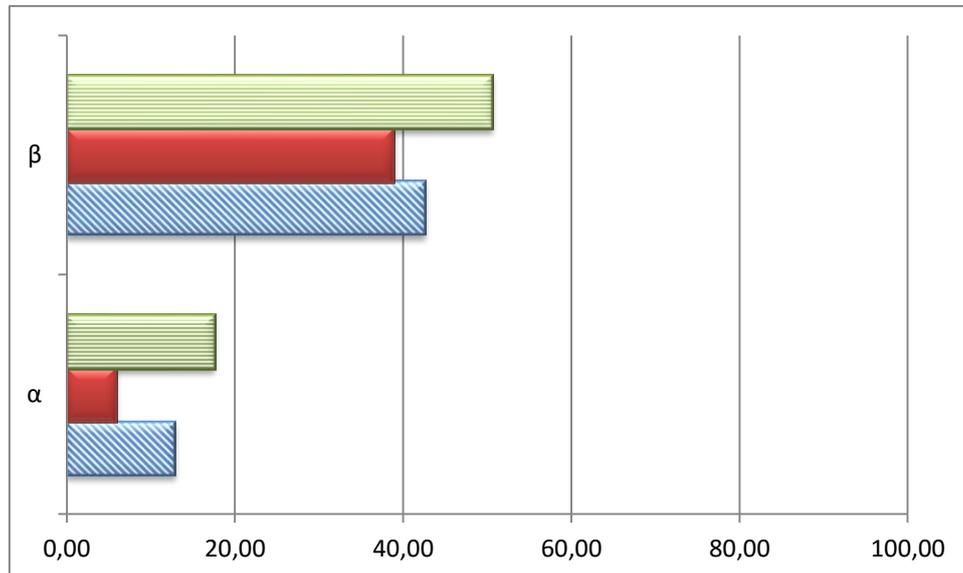


Figura 16: Porcentaje de recuperación de α -LA y β -LG en el sobrenadante de la precipitación termocálica del WPC-35 a pH=4 y 45°C. El ácido clorhídrico se representa en azul rayado oblicuo, el cítrico en rojo sólido y el láctico en verde con rayado horizontal.

4.5 Aspectos de la investigación continuar en el futuro:

Como se visualiza en las Figuras 12, 13, 14, 15 y 16 gran parte de la β -lactoglobulina permanece en el sobrenadante, pero una pequeña fracción es arrastrada con la α -lactoalbúmina al precipitado, quedando atrapada en el mismo. Así, será necesario mejorar las condiciones de lavado del precipitado, optimizando aspectos como: concentración de cloruro cálcico, pH, temperatura del lavado y tiempo.

Otro aspecto importante, para el paso de escala y para poder utilizar una centrífuga continua, es tener en cuenta la reología del precipitado. Los precipitados obtenidos a 55 °C tienen mayor consistencia que los generados a 45 °C, que fluyen con más facilidad.

Por último, destacar que un objetivo futuro importante es establecer las condiciones óptimas de resolubilización del precipitado, para su posterior utilización como base láctea hipoalergénica.

5. Conclusiones

- La técnica de precipitación termocálcica ha resultado ser apropiada para la separación de la β -lactoglobulina del suero con el fin de obtener un producto hipoalergénico.
- Las condiciones óptimas de trabajo son reduciendo el pH con ácido cítrico hasta alcanzar un valor de 4 y a una temperatura de 55°C. El ácido láctico también es apto para el objetivo planteado, aunque la recuperación de la α -lactoalbúmina resulta menor.
- La utilización de una materia prima en polvo reduce el rendimiento de la operación. Esto puede tener su origen en el proceso de fabricación en su etapa de secado, que desnaturaliza, en parte, las proteínas y ese cambio de estructura afecta a su comportamiento en las condiciones de precipitación termocálcica. Para subsanar este problema deberían optimizarse las condiciones de secado para que resulten menos agresivas: temperatura; presión del sistema; atomización, etc.
- Para el paso de escala la utilización de una centrifuga discontinua es inviable. Es necesario estudiar la reología de los precipitados e intentar mejorar su fluidez para poder utilizar una centrifugación continua en la etapa de separación.
- Quedan abiertas las siguientes líneas de estudio a realizar en un futuro:
 - o Comportamiento del resto de proteínas contenidas en el producto inicial durante la reacción de precipitación termocálcica.
 - o Recuperación de la β -lactoglobulina retenida en el precipitado mediante lavado del mismo y optimización de las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo.
 - o Condiciones de resolubilización del precipitado rico en α -lactoalbúmina para su utilización posterior.

6. Lista de tablas, figuras y símbolos

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Composición del suero dulce.....	pág 2
Tabla 2: Necesidades de aminoácidos en la dieta de un adulto.....	pág 2
Tabla 3: Distribución de los aminoácidos en los alimentos.....	pág 3
Tabla 4: Ventajas e inconvenientes de la hidrólisis química o enzimática.....	pág 3
Tabla 5: Distribución del contenido proteico de un suero o derivados.....	pág 6
Tabla 6: Métodos de separación analíticos.....	pág 18
Tabla 7: Diferentes métodos de separación con posibilidad de paso de escala...	pág 19
Tabla 8: Composición aproximada del WPC- 35.....	pág 26
Tabla 8: Composición aproximada del WPC- 65.....	pág 26
Tabla 9: Gradientes HPLC para WPC-35.....	pág 31
Tabla 10: Gradientes HPLC para WPC-65.....	pág 31
Tabla 11: Tiempos de retención de las proteínas en la columna.....	pág 34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estructura tridimensional de la β -lactoglobulina.....	pág 7
Figura 2: Estructura tridimensional de la α -lactoalbúmina.....	pág 10
Figura 3: Esquema del reactor.....	pág 27
Figura 4: Equipo HPLC.....	pág 28
Figura 5: Equipo de electroforesis.....	pág 28
Figura 6: Esquema del proceso de precipitación termocálcica.....	pág 29
Figura 7: Combinación de las variables de proceso.....	pág 30
Figura 8: Cromatograma del WPC-65.....	pág 34
Figura 9: Cromatogramas de los sobrenadantes.....	pág 35
Figura 10: Análisis de muestras (120 μ l) en gel SDS-PAGE.....	pág 36
Figura 11: Análisis de muestras (180 μ l) en gel SDS-PAGE.....	pág 37
Figura 12: Contenido en α -lactoalbúmina de los sobrenadantes.....	pág 38
Figura 13: Contenido en β -lactoglobulina A de los sobrenadantes.....	pág 39
Figura 14: Contenido en β -lactoglobulina B de los sobrenadantes.....	pág 39
Figura 15: Resultados del análisis del experimento a 55°C; pH=4; ácido cítrico...	pág 40
Figura 16: Porcentaje de recuperación de α -LA y β -LG en WPC-35.....	pág 41

SÍMBOLOS

- AEDT → ácido etildiamintetraacético.
- BLF → Bovine Lactoferrin, lactoferrina bovina.
- BSA → Bovine Serum Albumin, Albumina de suero bovino.
- Ca → calcio.
- CMP → Caseinomacropéptido.
- Cys → cisteína.
- DEAE → Dietielaminoetil.
- GRAS → Generally Recognised As Safe, Reconocida generalmente como segura.
- HPLC → High Performance Liquid Chromatography, Cromatografía líquida de alta eficacia.
- Igs → Inmunoglobulinas.
- LF → Lactoferrina.
- LP → Lactoperoxidasa.
- pI → punto isoeléctrico.
- SDS-PAGE → Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio.
- TCA → ácido tricloroacético.
- TRIS-HCl → ácido clorhídrico tris(hidroximetil)aminometano.
- WPC → Whey Protein Concentrate, Concentrado de proteínas del suero.
- WPI → Whey Protein Isolate, Aislado de proteínas del suero.
- Zn → zinc.
- α -LA → α -lactoalbúmina.
- β -LG → β -lactoglobulina.

7. Bibliografía

- Almécija, M. C., Ibáñez, R., Guadix, A. & Guadix, E. M. (2007). Effect of pH on the fractionation of whey proteins with a ceramic ultrafiltration membrane. *Journal of Membrane Science* 288, 28-35.
- Arunkumar, A. & Etzel, M. R. (2014). Fractionation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from bovine milk serum using staged, positively charged, tangential flow ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science* 454, (2014) 488-495.
- Baldasso, C., Barros, T.C. & Tessaro, I.C. (2011). Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination* 278, 381-386.
- Bhattacharjee, S., Bhattacharjee, C. & Datta, S. (2006). Studies on the fractionation of β -lactoglobulin from casein whey using ultrafiltration and ion-exchange membrane chromatography. *Journal of Membrane Science* 275, 141-150.
- Bonnaille, L. M. & Tomasula, P. M. (2012). Fractionation of Whey Protein Isolate with Supercritical Carbon Dioxide To Produce Enriched α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin Food Ingredients. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 60, 5257-5266.
- Bramaud, C., Aimar, P. & Daufin, G. (1996). Optimisation of a whey protein fractionation process based on the selective precipitation of α -lactalbumin. *Lait* 77, 411-423.
- Byrne, E. P. & Fitzpatrick, J. J. (2002). Investigation of how agitation during precipitation, and subsequent processing affects the particle size distribution and separation of α -lactalbumin enriched whey protein precipitates. *Biochemical Engineering Journal* 10, 17-25.
- Caessens, P. W. J. R., Visser, S. & Gruppen, H. (1997). Method for the Isolation of Bovine β -Lactoglobulin from a Cheese Whey Protein Fraction and Physicochemical Characterization of the Purified Product. *International Dairy Journal* 7, 229-235.
- Campagna, S., Mathot, A.-G., Fleury, Y., Girardet, J.-M., & Gaillard, J.-L. (2004). Antibacterial Activity of Lactophorin, a Synthetic 23-Residues Peptide Derived from the Sequence of Bovine Milk Component-3 of Proteose Peptone. *Journal of Dairy Science* 87, 1621–1626.
- Cheang, B. & Zydney, A. L. (2003). Separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin Using Membrane Ultrafiltration. *Biotechnology and Bioengineering* 83, nº 2.
- Cheang, B. & Zydney, A. L. (2004). A two-stage ultrafiltration process for fractionation of whey protein isolate. *Journal of Membrane Science* 231, 159-167.
- Chevalier, F., Chobert, J.-M., Popineau, Y., Nicolas, M. G. & Haertlé T. (2001). Improvement of functional properties of β -lactoglobulin glycosylated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. *International Dairy Journal* 11, 145-152.
- Cornec, M., Kim, D. A., & Narsimhan, G. (2001). Adsorption dynamics and interfacial properties of α -lactalbumin in native and molten globule state conformation at air–water interface. *Food Hydrocolloids*, 15, 303–313.

- Croguennec, T., Leng, N., Hamon, P., Rousseau, F., Jeantet, R. & Bouhallab S. (2014). Caseinomacropéptide modifies the heat-induced denaturation/agggregation process of β -lactoglobulin. *International Dairy Journal* 36, 55-64.
- De Noni, I., Pellegrino, L., Cattaneo, S. & Resmini P. (2007). HPLC of proteose peptones for evaluating ageing of packaged pasteurized milk. *International Dairy Journal* 17, 12–19.
- Dolgikh, D.A., Gilmanshin, R.I., Brazhnikov, E.V., Bychkova, V.E., Semisotnov, G.V., Venyaminov, S.Y. and Ptitsyn, O.B. (1981) α -lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure?. *FEBS Letters* 136 vol. 2, 311-315.
- El-Sayed, M. & Chase, H. (2009). Toward Separating Alpha-lactalbumin and Beta-lactoglobulin Proteins from Whey through Cation-exchange Adsorption. *IAENG Transactions on Engineering Technologies Volume II*.
- Estévez, N., Fuciños, P., Bargiela, V., Pastrana, L., Tovar, C. A. & Rúa, M. L. (2016). Structural and thermo-rheological analysis of solutions and gels of a β -lactoglobulin fraction isolated from bovine whey. *Food Chemistry* 198, 45-53.
- Ewbank, J. J. & Creighton, T. E. (1993). Structural characterization of the disulfide folding intermediates of Bovine α -lactalbumin. *Biochemistry* 32, 3694-3707.
- Fang, Y., & Dalgleish, D. G. (1998). The conformation of alpha-lactalbumin as a function of pH, heat treatment and adsorption at hydrophobic surfaces studied by FTIR. *Food Hydrocolloids*, 12, 121–126.
- Fernández, A. (2012). Fraccionamiento y producción de proteínas y péptidos activos a partir de sueros lácteos y derivados. Tesis doctoral. Oviedo, Noviembre 2012.
- Fernández, A., Menéndez, V. & Riera, F. A. (2012). α -Lactalbumin solubilisation from a precipitated whey protein concentrates fraction: pH and calcium concentration effects. *International Journal of Food Science and Technology* 47, 467-474.
- Fernández, A., Menéndez, V., Riera, F. A. & Álvarez, R. (2010). Caseinomacropéptide behaviour in a whey protein fractionation process based on a α -lactalbumin precipitation. *Journal of Dairy Research* 78, 196-202.
- Fox, P. F. (1995) *Heat Induced Changes in Milk*, 2nd edn. International Dairy Federation, Brussels.
- García-Montoya, I. A., Cendón, T., Arévalo-Gallegos, S. & Rascón-Cruz, Q. (2012). Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820, 226–236
- Gésan-Guiziu, G., Daufin, G., Timmer, M., ALLERSMA D. & Van Der Horst, C. (1999). Process steps for the preparation of purified fractions of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from whey protein concentrates. *Journal of Dairy Research* 66, 225-236.
- Guadix, A., Guadix, E. M., Páez-Dueñas, M. P., González-Tello, P. & Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica* 41:1; 79-89.
- Guilloteau, P., Romé, V., Delaby, L., Mendy, F., Roger, L. & Chayvialle, J. A. (2010). Is caseinomacropéptide from milk proteins, an inhibitor of gastric secretion?. *Regulatory Peptides* 159, 129–136.

- He, Z., Bin, J., Zhi-Biao, F., Yu-Xiao, Q. & Xuan L. (2016). Separation of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin in Whey Protein Isolate by Aqueous Two-phase System of Polymer/Phosphate. *Chinese Journal Of Analytical Chemistry* 44, 754-759.
- He, Z., Zhu, H., Xu, M., Zeng, M., Qin, F. & Chen J. (2016). Complexation of bovine β -lactoglobulin with malvidin-3-O-glucoside and its effect on the stability of grape skin anthocyanin extracts. *Food Chemistry* 209, 234-240.
- Hudson, H.M., Daubert, C.R., Foegeding, E.A. (2000). Rheological and physical properties of derivatized whey protein isolate powders. *J. Ag. Food Chem.* 48, 3112–3119.
- Inagaki, M., Nagai, S., Yabe, T., Nagaoka, S., Minamoto, N., Takahashi, T., Matsuda, T., Nakagomi, O., Nakagomi, T., Ebina, T., & Kanamaru Y. (2010). The Bovine Lactophorin C-Terminal Fragment and PAS6/7 Were Both Potent in the Inhibition of Human Rotavirus Replication in Cultured Epithelial Cells and the Prevention of Experimental Gastroenteritis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74, 1386–1390.
- Innocente, N., Comparin, D., & Corradini, C. (2002). Proteose-peptone whey fraction as emulsifier in ice-cream preparation. *International Dairy Journal* 12, 69–74.
- Innocente, N., Corradini, C., Blecker, C. & Paquot, M. (1998). Dynamic Surface Properties of the Proteose-Peptone Fraction of Bovine Milk. *Journal of Dairy Science* 81, 1833-1839.
- Innocente, N., Marchesini, G. & Biasutti, M. (2011). Feasibility of the SPME method for the determination of the aroma retention capacity of proteose-peptone milk protein fraction at different pH values. *Food Chemistry* 124, 1249–1257.
- Jameson, G. B., Adams, J. J. & Creamer L. K. (2002). Flexibility, functionality and hydrophobicity of bovine β -lactoglobulin. *International Dairy Journal* 12, 319-329.
- Jara, F. & Pilosof, A. M. R. (2011). Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein concentrate/hydroxypropylmethylcellulose aqueous two-phase systems. *Food Hydrocolloids* 25, 374-380.
- Kalaivani, S. & Regupathi, I. (2015). Synergistic extraction of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin from acid whey using aqueous biphasic system: Process evaluation and optimization. *Separation and Purification Technology* 146, 301-310.
- Karamoko, G., Renaville, R. & Blecker, C. (2016). Interfacial activities of milk total proteose-peptone: Contribution and miscibility of nonhydrophobic and hydrophobic fractions. *International Dairy Journal* 61, 29-36.
- Kataoka, M., Kuwajima, K., Tokunaga, F. & Goto, Y. (1997) Structural characterization of the molten globule of α -lactalbumin by solution X-ray scattering. *Protein Science* 6. 422-430.
- Kim, D. A., Cornec, M. & Narsimhan, G. (2005). Effect of thermal treatment on interfacial properties of β -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science* 285, 100-109.

- Konrad, G. & Kleinschmidt, T. (2008). A new method for isolation of native α -lactalbumin from sweet whey. *International Dairy Journal* 18, 47-54.
- Konrad, G., Lieske, B. & Faber, W. (2000). A large-scale isolation of native β -lactoglobulin: characterization of physicochemical properties and comparison with other methods. *International Dairy Journal* 10, 713-721.
- Kontopidis, G., Holt, C. & Sawyer L. (2004). Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. *Journal of Dairy Science* 87, 785-796.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680-685.
- Lam, R. S. H. & Nickerson M. T. (2015) The effect of pH and temperatura pre-treatments on the structure, surface characteristics and emulsifying properties of α -lactalbumin. *Food Chemistry* 173, 163-170.
- Lozano, J. M., Giraldo, G. I. & Romero, C. M. (2008). An improved method for isolation of β -lactoglobulin. *International Dairy Journal* 18, 55-63.
- Lucas, D., Rabiller-Baudry, M., Millesime, L., Chaufer, B. & Daufin, G. (1998). Extraction of α -lactalbumin from whey protein concentrate with modified inorganic membranes. *Journal of Membrane Science* 148, 1-12.
- Lucena, M. E., Álvarez, S., Menéndez, C., Riera, F. A. & Álvarez, R. (2006). Beta-lactoglobulin removal from whey protein concentrates. Production of milk derivates as a base for infant formulas. *Separation and Purification Technology* 52, 310-316.
- Lucena, M. E., Álvarez, S., Menéndez, C., Riera, F. A. & Álvarez, R. (2007). α -lactalbumin precipitation from comercial whey protein concentrates. *Separation and Purification Technology* 52, 446-453.
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M.P., Pintado, M. E. & Malcata F. X. (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International* 40, 1197–1211.
- Metsämuuronen, S. & Nyström, M. (2009). Enrichment of α -lactalbumin from diluted whey with polymeric ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science* 337, 248-256.
- Mokhtarani, B., Mortaheb, H. R., Mafi, M. & Amini, M. H. (2011). Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in aqueous two-phase systems of polyvinylpyrrolidone and potassium phosphate. *Journal of Chromatography B* 879, 721–726.
- Montilla, A., Casal, E., Moreno, F. J., Belloque, J., Olano, A. & Corzo, N. (2007). Isolation of bovine β -lactoglobulin from complexes with chitosan. *International Dairy Journal* 17, 459-464.
- Mudgal, P., Daubert, C.R. & Foegeding, E.A. (2011). Kinetic study of β -lactoglobulin thermal aggregation at low pH. *Journal of Food Engineering* 106, 159-165.
- Muller, A., Daufin, G. & Chaufer, B. (1999). Ultrafiltration modes of operation for the separation of α -lactalbumin from acid casein whey. *Journal of Membrane Science* 153, 9-21.

- Muro, C., Álvarez, R., Riera, F., Arana, A. & Téllez, A. (2011). Review: Production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology International* 17(4), 293-317.
- Naqvi, Z., Khan, R. H. & Saleemuddin, M. (2010). A procedure for the purification of β -lactoglobulin from bovine milk using gel filtration chromatography at low pH. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 40, 326-336.
- Neyestani, T. R., Djalali, M. & Pezeshki, M. (2003). Isolation of α -lactalbumin, β -lactoglobulin, and bovine serum albumin from cow's milk using gel filtration and anion-exchange chromatography including evaluation of their antigenicity. *Protein Expression and Purification* 29, 202-208.
- Nicolai, T., Britten, M. & Schmitt, C. (2011). β -Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. *Food Hydrocolloids* 25, 1945-1962.
- Pearce, R. J. (1983). Thermal separation of β -lactoglobulin and α -lactalbumin in bovine cheddar cheese whey. *Australian Journal of Dairy Technology* 38.4, 144-148.
- Pereira, L. A., Minim, L. A., Rodrigues, V. P., Ferreira, R. C., Mendes, L. H. & Hespanhol, M. do C (2011). Application of the response surface methodology for optimization of whey protein partitioning in PEG/phosphate aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography B* 879, 1881- 1885.
- Pereira, L. A., Vieira, I., Ferreira, R. C., Mendes, L. H., Hespanhol, M. do C., Rodrigues, V. P. & Minim, L. A. (2014). Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from cheese whey in aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycol) and sodium polyacrylate. *Food and Bioproducts Processing* 92, 409–415.
- Permyakov, E. A. & Berliner, L. J. (2000). α -Lactalbumin: structure and function. *FEBS letters* 473, 269-274.
- Purwanti, N., Ichikawa S., Neves, M. A., Uemura, K., Nakajima, M. & Kobayashi, I. (2016). β -lactoglobulin as food grade surfactant for clove oil-in-water and limonene-in-water emulsion droplets produced by microchannel emulsification. *Food Hydrocolloids* 60, 98-108.
- Relkin, P., Launay, B., & Eynard, L. (1993). Effect of sodium and calcium addition on thermal denaturation of apo-a-lactalbumin: A differential calorimetric study. *Journal of Dairy Science*, 76, 36–47.
- Santos, M. J., Teixeira, J. A. & Rodrigues, L. R. (2012). Fractionation of the major whey proteins and isolation of β -Lactoglobulin variants by anion exchange chromatography. *Separation and Purification Technology* 90, 133–139.
- Sawyer, L., Brownlow, S., Polikarpov, I. & Wu S-Y. (1998). β -Lactoglobulin: Structural Studies, Biological Clues. *International Dairy Journal* 8, 65-72.
- Sharma, R., Zakora, M. & Qvist, K. B. (2002). Characteristics of oil–water emulsions stabilised by an industrial α -lactalbumin concentrate, cross-linked before and after emulsification, by a microbial transglutaminase. *Food Chemistry* 79, 493–500.
- Svanborg, S., Johansen, A.-G., Abrahamsen, R., Schüller, R. & Skeie S. (2016) Caseinomacropptide influences the functional properties of a whey protein concentrate. *International Dairy Journal* 60, 14-23.

- Swaisgood, H. E. (1982). Chemistry of milk protein. *Developments in Dairy Chemistry* 1, 66-110.
- Toro-Sierra, J., Tolkach, A. & Kulozik, U. (2013). Fractionation of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin from Whey Protein Isolate Using Selective Thermal Aggregation, an Optimized Membrane Separation Procedure and Resolubilization Techniques at Pilot Plant Scale. *Food and Bioprocess Technology* 6, 1032-1043.
- van der Strate, B.W.A., Beljaars, L., Molema, G., Harmsen, M.C. & Meijer D.K.F. (2001). Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Research* 52, 225–239.
- Veli, E. & Rivas, E. (2010). Caracterización genética de Kappa caseínas y Beta lactoglobulinas del bovino criollo de cuatro comunidades andinas del Perú. *Animal Genetic Resources* 46, 67–72.
- Vyas, H. K., Izco, J. M. & Jiménez-Flores, R. (2002). Scale-Up of Native β -Lactoglobulin Affinity Separation Process. *Journal of Dairy Science* 85, 1639-1645.
- WHO, FAO & UNU, report of a joint expert consultation. (2002). Protein and amino acid requirements in human nutrition. WHO Technical Report Series, 935.
- Wilde, S. C., Keppler, J. K., Palani, K. & Schwarz, K., (2016). β -Lactoglobulin as nanotransporter for allicin: Sensory properties and applicability in food. *Food Chemistry* 199, 667-674.
- Ye, X., Yoshida, S. & Ng, T.B. (2000). Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin, α -lactalbumin, β -lactoglobulin B and β -lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatography. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32, 1143-1150.
- Zheng, G., Liu, H., Zhu, Z., Zheng, J. & Liu, A. (2016). Selenium modification of β -lactoglobulin (β -Lg) and its biological activity. *Food Chemistry* 204, 246-251.
- Zhong, J., Cai, X., Liu, C., Liu, W., Xu, Y. & Luo, S. (2016). Purification and conformational changes of bovine PEGylated β -lactoglobulin related to antigenicity. *Food Chemistry* 199, 387-392.