



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA**

**Evaluación del poder quelante de las
proteínas del lactosuero**

TESIS

Que para obtener el título de:

LICENCIADA DE QUÍMICA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A

Arizbeth Stevee Granados Benitez

Directora:

Dra. Araceli Castañeda Ovando

Co-directora:

Dra. Karina Aguilar Arteaga

Mineral de la Reforma, Hgo., octubre 2020.



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisicoquímica de Alimentos 2 del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Agradezco infinitamente a Dios y a mis padres;

Alberto Granados Andrés

Filomena Benitez Torres

“Con todo mi cariño, respeto y admiración”

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes.....	2
2.1. Leche bovina.....	2
2.1.1. Proteínas de la leche.....	2
2.1.2. Compuestos bioactivos de la leche	6
2.1.3. Lactosuero	7
2.2. Péptidos bioactivos.....	8
2.2.1. Generalidades	8
2.2.2. Clasificación.....	9
2.2.3. Actividad de los péptidos de la leche como complejantes de metales ...	11
2.2.4. Métodos de obtención de los péptidos bioactivos de la leche	12
2.3. Importancia de los macro y microelementos en el organismo humano	12
3. Objetivos	15
3.1. General	15
3.2. Específicos	15
4. Metodología	16
4.1. Obtención del suero.....	16
4.2. Preparación de soluciones	16
4.3. Análisis fisicoquímico del suero lácteo	16
4.4. Purificación y concentración de los péptidos del suero lácteo	17
4.5. Evaluación de la capacidad acarreadora de metales	18
4.5.1. Calcio.....	19
4.5.2. Hierro	19
4.5.3. Magnesio.....	20
4.6. Separación de péptidos por electroforesis en gel de poliacrilamida Tris-Tricina SDS-PAGE.....	20
4.7. Determinación de actividad antioxidante por el método de FRAP	22
5. Resultados y discusión	23
5.1. Extracción y caracterización del suero lácteo	23

5.2.	Purificación y concentración de los péptidos del suero lácteo	25
5.3.	Evaluación de la capacidad acarreadora	27
5.3.1.	Evaluación de la capacidad acarreadora con calcio	28
5.3.2.	Evaluación de la capacidad acarreadora con hierro	30
5.3.3.	Evaluación de la capacidad acarreadora con magnesio	33
5.3.4.	Comparación de la capacidad acarreadora	34
5.4.	Separación de péptidos y efecto de los iones metálicos.....	36
5.5.	Actividad antioxidante de los péptidos complejados con iones metálicos.....	39
6.	Conclusiones	40
7.	Perspectivas	41
Anexos	42
Referencias	47

1. Introducción

La leche es una fuente importante de nutrientes en la dieta humana debido al suministro de proteínas, vitaminas esenciales y minerales. Uno de los subproductos de la leche es el suero lácteo, el cual contiene proteínas solubles, que forman parte de la fracción no sedimentable, constituida por proteínas globulares, como la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina (Torres et al., 2005).

Además, el suero lácteo contiene péptidos bioactivos, de los que se han descrito propiedades estructurales en común; tales como, cadena corta de aminoácidos (de 2 a 9), residuos de aminoácidos hidrofóbicos en adición a grupos prolina, lisina o arginina, y resistencia a la acción de peptidasas digestivas, lo que permite su absorción y paso al torrente sanguíneo, sin alteración (Kitts & Weiler, 2003).

En los últimos años, relativamente pocos estudios han reportado el papel que juegan algunas fracciones peptídicas del lactosuero sobre la salud de los consumidores, en comparación con las derivadas de las caseínas, que han recibido mayor atención. Por otro lado, se sabe que la deficiencia en la ingesta de algunos minerales provoca un mal funcionamiento en el organismo, lo que conlleva al padecimiento de enfermedades como la osteoporosis, la hipertensión y la anemia (Carbajal, 2017). Por ello, se buscan alternativas que permitan aumentar la fijación de minerales en el cuerpo.

Considerando las características de las proteínas del suero lácteo y el papel que juegan muchos péptidos en la salud (Alvarado & Guerra, 2010), en el presente proyecto se evaluaron las fracciones peptídicas provenientes de la proteólisis de leche como acarreadores de metales, mediante la formación de complejos con Fe (II), Mg (II) y Ca (II) para considerarlos como aditivos en el desarrollo de alimentos funcionales y/o suplementos alimenticios.

2. Antecedentes

2.1. Leche bovina

La leche es una secreción polifásica producida por la glándula mamaria, que contiene aproximadamente 5% de lactosa, 3.3% de proteína, 4% de lípidos, 0.7% de sales minerales y el porcentaje restante lo representa el agua. Por estas características ha sido reconocida como parte fundamental de la dieta humana desde tiempos inmemoriales (Artica, 2014).

2.1.1. Proteínas de la leche

La leche de vaca presenta un contenido proteico que oscila entre el 3 y el 4%, distinguiendo tres categorías para el nitrógeno proteico; las caseínas, las proteínas del suero y las proteínas de la membrana del glóbulo graso (Swaisgood, 2003). Estas proteínas se separan mediante la acidificación de la leche a pH 4.6, el punto isoeléctrico de las caseínas, que produce su precipitación (Alvarado & Guerra, 2010). El contenido medio de proteína en una leche es de aproximadamente 30-35 g L⁻¹ (Artica, 2014). En la Tabla 1 se muestra la composición de las proteínas en la leche.

A) Caseínas

Constituyen alrededor del 78% de las proteínas lácteas a un pH de 4.6, y se encuentran unidas principalmente con fosfato de calcio Ca₃(PO₄)₂ en una estructura sólida y esponjosa llamada micela (Farell et al., 2006; Ferrandini et al., 2006). Son proteínas insolubles a pH 4.6, contienen ácido glutámico y aspártico, por lo que se conocen como proteínas ácidas (Hernández, 2002).

Las caseínas de la leche se clasifican en función de su movilidad electroforética como: α_{s1}-caseína, α_{s2}-caseína, β-caseína, κ-caseína y γ-caseína (Farell et al., 2004; Barbosa et al., 2012). Estas caseínas tienen una notable capacidad para estabilizar la fracción proteica de la leche, es decir, para inhibir agregación y precipitación de las proteínas por cualquier tipo de estrés (Farell et al., 2006).

Tabla 1. Principales proteínas presentes en la leche de vaca, porcentaje aproximado¹.

Proteína	Abreviatura	g/L	%
Caseínas		28.0	78
α_{s1} -caseína	α_{s1} -CN	12.4	34.7
α_{s2} -caseína	α_{s2} -CN	3.0	8.3
β -caseína	β -CN	7.0	19
κ -caseína	K-CN	4.2	12
γ -caseína	γ -CN	1.4	4
Proteínas del suero		7.2	20
β -lactoglobulina	β -LG	4.2	11.7
α -lactoalbúmina	A-LA	1.1	3
Fracción proteosa-peptona	PP	0.8	2.2
Inmunoglobulina G	IgG	0.6	1.7
Inmunoglobulina M	IgM	0.09	0.25
Inmunoglobulina A	IgA	0.01	0.027
Albúmina de suero	AS	0.3	0.83
Lactoferrina	LF	0.1	0.27
Proteínas de la membrana del glóbulo graso		0.7	2

¹Asumiendo 36 g/L de proteína y 78% de caseína. Fuente: Swaisgood, 2003; Farrell et al., 2006; Barbosa et al., 2012.

α_{s1} -caseína: se encuentra en mayor proporción en la micela de caseína. Está compuesta por 199 aminoácidos, de los cuales tiene 17 restos de prolina, distribuidos a lo largo de toda su cadena, con ocho o nueve grupos fosfato que interaccionan con el calcio, tres regiones no polares o hidrofóbicas y una zona polar o hidrofílica de carga neta negativa, en la que se encuentran la mayoría de los grupos fosfato proporcionando a la leche un pH de 6.6 (Horne, 2006; Dalgleish & Corredig, 2012).

α_{s2} -caseína: es una proteína con una masa molecular de 25.23 kDa y está formado por 207 aminoácidos con 13 grupos fosfato para interaccionar con calcio, muy pocos restos de prolina, y un enlace disulfuro entre las cisteínas (Farrell et al.,

2006). La α_{s2} -CN es más hidrofílica que la α_{s1} -CN ya que tiene tres zonas polares y sólo una región no polar con aminoácidos hidrofóbicos y carga neta positiva (Swaisgood, 2003).

β -caseína: está compuesta por 209 aminoácidos, con cinco grupos fosfato para interaccionar con calcio, no presenta cisteína, pero es la caseína con el mayor número de residuos de prolina (Farell et al., 2004). Esta caseína tiene una división entre clara entre su región polar y su zona no polar, constituida por una gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos (Swaisgood, 2003).

κ -caseína: es una proteína con una masa molecular de 19 kDa. Compuesta por 169 aminoácidos, es su estructura tiene dos cisteínas (Hernández, 2002) y presenta una glucosilación con los residuos de serina en varios segmentos de su molécula (Swaisgood, 2003). Presenta únicamente un grupo fosfato, generando una interacción con el calcio mucho menor en comparación con las otras caseínas (Farell et al., 2006). La región N-terminal es hidrofóbica y la C-terminal, es hidrofílica y posee una fuerte carga negativa (Fox & Kelly, 2004).

B) Proteínas del suero

Contribuyen el 20% del nitrógeno proteico total, contienen sulfuro en vez de fósforo, y permanecen en la solución láctea a un pH de 4.6 (Swaisgood, 2003). Dentro de su secuencia de aminoácidos contienen precursores de péptidos bioactivos, que pueden ser liberados por reacciones hidrolíticas para tener actividad biológica y contribuir a los efectos benéficos para la salud (Baro et al., 2001).

Las proteínas del suero se conocen como proteínas solubles o no sedimentables, se clasifican en: β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, seroalbúmina, inmunoglobulinas y lactoferrina (Hernández, 2002).

β -lactoglobulina: es una proteína globular, con una masa molecular de 18.3 kDa, que representa el 50% de la fracción proteica del lactosuero. Es una proteína con importante fuente de péptidos biológicamente activos, su estructura está formada por 162 aminoácidos (Kilara, 2004), de los cuales 84 son aminoácidos esenciales, de 16 a 18 aminoácidos son hidrofóbicos por lo que es capaz de fijar moléculas

hidrófobas como colesterol y retinol, la distribución de los residuos no polares, polares e ionizados es uniforme (Fox, 2003).

α-lactoalbúmina: es una proteína globular de bajo peso molecular (14.2 kDa), que representa el 25% de las proteínas del suero. Es una molécula con 123 residuos aminoacídicos, organizados en una estructura terciaria globular, mantenida por cuatro enlaces disulfuro (Considine et al., 2007; Swaisgood, 2003). Presenta una gran afinidad por el calcio y otros minerales como zinc, magnesio, cadmio, cobre y aluminio (Parra, 2009). La presencia de iones calcio unidos a su estructura y los puentes disulfuro la mantienen en una compacta estructura helicoidal con una zona interior hidrófoba (Hernández, 2002). Esta proteína es muy importante en la preparación de fórmulas lácteas, debido a su elevado contenido en aminoácidos esenciales, particularmente triptófano (Peso et al., 2012).

Inmunoglobulinas: se conocen como anticuerpos, existen cinco clases de ellos; IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. El calostro contiene concentraciones significativamente mayores de inmunoglobulinas, con respecto a la leche madura. Del mismo modo la fracción de suero de leche contiene una cantidad significativa de inmunoglobulinas, aproximadamente, del 10 al 15 % del total de las proteínas del suero de leche (Marshall, 2004).

Seroalbúmina/albúmina de suero sanguíneo: presenta una estructura secundaria. Formada por 528 aminoácidos, contiene alrededor de 200 residuos de aminoácidos cargados, distribuidos por la molécula, contribuyendo al carácter hidrofílico y altamente soluble. El punto isoeléctrico de esta proteína es de 4.7. Las albúminas se caracterizan por un bajo contenido de triptófano y metionina, presentan un alto contenido de cisteína y de aminoácidos cargados, como el aspartato, ácido glutámico y lisina (Hernández, 2002).

Dentro del grupo de proteínas minoritarias de la leche se encuentran la lactoferrina, la transferrina, la fibronectina, inmunoglobulinas, enzimas, hormonas peptídicas, etc.

Lactoferrina: es una glucoproteína fijadora de hierro presente en la leche, con una amplia gama de funciones fisiológicas, tales como actividades antimicrobianas, antivirales, inmunomoduladoras y antioxidantes (Wakabayashi et al., 2006).

C) Proteínas de la membrana del glóbulo graso

Estas fueron adheridas durante la secreción apocrina a través de la membrana celular del lactocito, sólo representan alrededor del 2% de las proteínas lácteas (Reinhardt & Lippolis, 2006).

Las proteínas de la leche, especialmente las caseínas, son fuente importante de péptidos que han demostrado tener funcionalidad fisiológica, tal como se describirá en el apartado 2.1.2.

2.1.2. Compuestos bioactivos de la leche

La leche contiene moduladores de funciones gastrointestinales y hemodinámicas, hormonas y factores de crecimiento, además de cumplir con funciones de inmunoregulación como, la defensa contra enfermedades y modulación de la población de microorganismos intestinales (Torres et al., 2005). Por lo que, se considera un sistema integral de compuestos bioactivos, los cuales se clasifican de acuerdo con la proteína de la que provienen.

Péptidos derivados de las caseínas

- La α -casomorfina, opioide, podría participar en el desarrollo de condiciones como el autismo, muerte de cuna, diabetes tipo I, psicosis postparto, trastornos circulatorios y alergias alimentarias.
- La α -casoquinina y β -casoquinina, que es inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), regula la presión arterial y el equilibrio de agua y sal.
- La casoplatelina presenta actividad antitrobótica y la casoxina que es antagonista opiácea.
- Los fosfopéptidos, que actúan como enlace de mineral, para su absorción, ejemplo: Ca, P y Zn.

- El glicomacropéptido, el cual es un antimicrobiano, regula el sistema inmune, promueve el crecimiento de las bifidobacterias, además regula la circulación sanguínea, tiene acción antihipertensiva y antitrombótica (Young & Park, 2009).

Péptidos derivados de las proteínas del suero

Entre ellos destacan: serorfina, lactoquinina y seroquinina (Meisel, 2001). Las principales funciones bioactivas son:

- La serorfina, α -lactorfina y β -lactorfina actúan como receptores ligantes de opioides (Torres et al., 2005).
- La lactoquinina y seroquinina se encargan de regular la presión arterial (Hernández, 2002).

2.1.3. Lactosuero

El lactosuero es un subproducto líquido translúcido verde, obtenido de la leche, después de la precipitación de la caseína durante la elaboración de queso (Foegeding & Luck, 2002).

Existen dos tipos de lactosuero, el primero denominado dulce, que es obtenido de la coagulación por renina a pH 6.5 y el segundo llamado ácido resulta del proceso de fermentación o adición de ácidos orgánicos/minerales para coagular la caseína (Jelen, 2002).

La composición química y el tipo de lactosuero varía considerablemente dependiendo del tipo de leche, tipo de queso elaborado y el proceso de tecnología empleado. En la tabla 2 se puede detallar la composición nutricional del lactosuero dulce y ácido.

El lactosuero también contiene una rica cantidad de minerales donde sobresale el potasio, seguido del calcio, fósforo, sodio y magnesio, así como también vitaminas del grupo B (tiamina, ácido pantoténico, rivo flavina, piridoxina, ácido nicótico, cobalamina y ácido ascórbico) (Londoño et al., 2008). Representa una rica y variada mezcla de proteínas secretadas que poseen amplio rango de propiedades químicas, físicas y funcionales.

Tabla 2. Composición del lactosuero dulce y ácido.

Componente	Lactosuero dulce	Lactosuero ácido
Sólidos totales (g/L)	63.0 – 70.0	63.0 – 70.0
Lactosa (g/L)	46.0 – 52.0	44.0 – 46.0
Proteína (g/L)	6.0 – 10.0	6.0 – 8.0
Lípidos (g/L)	4 – 5	4 – 5
Calcio (g/L)	0.4 – 0.6	1.2 – 4.5
Fosfatos (g/L)	1.0 – 3.0	2.0 – 4.5
Lactato (g/L)	2.0	6.4
Cloruros (g/L)	1.1	1.1
pH	5.8 – 6.6	4.3 - 4.7

Fuente: Panesar et al., 2007.

El gran contenido de nutrientes genera aproximadamente 3.5 kg de demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y 6.8 kg de demanda química de oxígeno (DQO) por cada 100 kg de lactosuero líquido, siendo la lactosa, el principal componente de sólidos que contribuye a la alta DBO y DQO (Muñi et al., 2005).

2.2. Péptidos bioactivos

2.2.1. Generalidades

Los péptidos bioactivos han sido definidos como fragmentos específicos de proteínas. Muchos péptidos que se liberan *in vivo* o *in vitro* a partir de proteínas animales o vegetales, tienen un impacto positivo sobre funciones o condiciones corporales y pueden influir sobre la salud humana (Kitts & Weiler, 2003).

Diferentes efectos sobre la salud se han atribuido a los péptidos derivados de alimentos, estos actúan en cuatro sistemas: cardiovascular, nervioso, digestivo y sistema inmune cuyas funciones se agrupan en: antihipertensivos, antitrombóticos, opioide, antioxidante, ligador de metales antimicrobiano e inmunomodulador (Fernández, 2015; Hernández, 2002; Torres et al., 2005).

Muchos péptidos de origen vegetal o animal con potencial bioactivo relevante se han descubierto, entre los que destacan los aislados de productos

lácteos; la mayoría de estos péptidos han sido obtenidos a partir de las caseínas y muy pocos a partir de las proteínas del lactosuero (Alvarado & Guerra, 2010).

2.2.2. Clasificación

Los péptidos bioactivos se clasifican de acuerdo con la actividad que ejercen, destacando: péptidos opioides, inmunoestimuladores, acarreadores de minerales, antitrombóticos, bactericidas y antihipertensivos (Hernández, 2002).

Opioides

Son derivados de la α y β -caseína, hidrolizados por las enzimas digestivas. Entre los péptidos opioides se encuentran los péptidos llamados casomorfina, que tienen de 4 a 10 aminoácidos (Teschemacher, 2003).

Estos péptidos pueden producir analgesia, modulan la conducta social e influyen en la estimulación de la secreción de insulina y somatostatina. Los receptores opioides se encuentran en el sistema nervioso, endocrino e inmune, pueden interactuar con sus ligandos endógenos/exógenos con opioides y antagonistas de opioides (FitzGerald & Meisel, 2003).

Inmunoestimuladores

Estos péptidos producen una respuesta mayor del sistema inmune, potenciándolo o mostrando un efecto antimicrobiano a través de un aumento de la actividad fagocítica de los leucocitos. Investigaciones han demostrado que la actividad metabólica de las bacterias lácticas en la leche, generan péptidos inmunoestimuladores a través de la vía enzimática (Torres et al., 2005).

Acarreadores de minerales

Los péptidos fijadores de minerales o caseinofosfopéptidos (CPP) poseen cargas negativas, por esta razón tienen la capacidad de formar complejos solubles con metales como el calcio y magnesio (Torres et al., 2005). Algunas de sus aplicaciones son las siguientes:

- En el intestino, forman compuestos solubles con el calcio, por lo que favorecen su absorción (Hernández, 2002).
- Pueden inhibir la caries dental a través de la recalcificación del esmalte dental (Aimutis, 2004).
- Forman sales organofosfatadas con trazas de elementos como Fe, Mn, Cu y Se, para funcionar como acarreadores (Hernández, 2002).
- Mejoran la calcificación de los huesos en ausencia de Vitamina D (Aimutis, 2004).
- Juegan un papel importante en el transporte de calcio durante la absorción en la mucosa del duodeno, así como la absorción en las microvellosidades del intestino (Hernández, 2002).

Antitrombóticos

Son péptidos generados de la κ -caseína. La casoplatelina, afecta la formación e inhibe la agregación de plaquetas activadoras de ADP y las ligadas al fibrinógeno humano. Al hidrolizar las proteínas de la leche con tripsina se obtiene un fragmento de κ -caseína, la casiopiasrina que posee actividad antitrombótica, a través de la inhibición de la unión del fibrinógeno (Hernández, 2002).

Bactericidas

Son péptidos (fragmentos de la α -caseína y de la lactoferrina) que tienen la capacidad de inhibir microorganismos patógenos por un incremento de la permeabilidad de la membrana celular (Baró et al., 2011). Esto es debido a que la mayoría de los aminoácidos constituyentes son básicos y entre ellos forman un bucle de α -hélice en el extremo carboxilo terminal, que provoca la formación de canales iónicos en la membrana de los microorganismos, alterando su permeabilidad y provocando la muerte celular (Hernández, 2002).

Antihipertensivos

Son péptidos inhibidores de la ECA, la cual juega un papel importante fisiológico en la regulación de la presión sanguínea y el balance salino de los

fluidos en mamíferos. En el caso de los individuos que sufren de hipertensión se hace imperativo controlar la actividad de esta enzima (Fitzgerald & Murray, 2006).

De acuerdo con los estudios realizados, los péptidos que muestran actividad inhibidora de la ECA poseen residuos hidrofóbicos, tales como triptófano (Trp), tirosina (Tyr) o fenilalanina (Phe), en por lo menos una de las tres posiciones C-terminales, con los cuales se unen a los sitios activos de la ECA, bloqueando su actividad (Alvarado & Guerra, 2010).

Los péptidos inhibidores de ECA derivados de la leche son diferentes fragmentos de caseínas, llamados casoquininas, y los péptidos generados por las proteínas del suero son llamadas lactoquininas. Las casoquininas, son altamente activas y son fragmentos de la α_{s1} -caseína y de la β -caseína (Fitzgerald y Murray, 2006).

2.2.3. Actividad de los péptidos de la leche como complejantes de metales

La complejación consiste en la transición entre un ion metálico y un ligante cargado o no, que actúa como donante de electrones, el cual puede ser monodentado, bidentado o polidentado, de acuerdo con los electrones donantes (Ibáñez, 2006).



Figura 1. Esquema de la estructura micelar de las caseínas bovinas (Farell et al., 2004).

La alta concentración de cargas negativas en las cadenas laterales en los caseinomacropéptidos (CMP) son las responsables de la unión con los metales como se observa en la estructura micelar (Figura 1); así mismo los hace resistentes a una proteólisis posterior. Los CMP han mostrado capacidad de ligar

macroelementos como el calcio, el magnesio y el hierro, pero también tiene la capacidad de ligar oligoelementos como el zinc, bario, cromo, níquel, cobalto y selenio (Figuroa, 2012).

2.2.4. Métodos de obtención de los péptidos bioactivos de la leche

Los péptidos bioactivos de la leche se pueden obtener por tres métodos: fermentación microbiana, hidrólisis enzimática y digestión gastrointestinal (Hernández, 2002).

Fermentación microbiana

Durante la fermentación microbiana, las bacterias ácido lácticas (BAL) utilizan la proteína de la leche, principalmente la caseína, como fuente de carbono para su desarrollo. Los péptidos bioactivos pueden ser generados o no en el arranque de la fermentación con *Lactobacillus*, *Lactococcus* o *Streptococcus* para la fabricación de productos lácteos fermentados (Hernández, 2002).

Hidrólisis enzimática

Para la hidrólisis enzimática se han utilizado distintas enzimas para liberar péptidos biológicamente activos de proteínas enteras. Las enzimas utilizadas han sido las gastrointestinales, como la tripsina, la pepsina, y las enzimas obtenidas de hongos, bacterias, o en combinación (Kilara & Panyam, 2003).

Digestión gastrointestinal

En la digestión gastrointestinal la liberación de los péptidos bioactivos se da de manera natural por la acción de las enzimas pancreáticas (tripsina, quimotripsina y aminopeptidasas) y la pepsina. Por último, la absorción de estos se da a nivel del epitelio intestinal para ser transportados a órganos periféricos (Foltz et al., 2007).

2.3. Importancia de los macro y microelementos en el organismo humano

En la naturaleza existen distintos elementos químicos, algunos de ellos realizan funciones orgánicas dentro del organismo. Estos elementos son de suma

importancia y se pueden clasificar, de acuerdo con las concentraciones encontradas en el organismo humano, como: macroelementos, microelementos, elementos traza y elementos ultratraza (Carbajal, 2017).

Los macroelementos son los elementos más abundantes en el cuerpo, aproximadamente son 95% de los elementos químicos dentro del organismo humano, por tanto, son los demandados en mayor cantidad (en unidades de g), los microelementos forman un 4% y son requeridos en concentraciones menores (en unidades de mg) (Carbajal, 2017). Entre ellos destacan el calcio, el hierro y el magnesio.

Calcio

El calcio es el mineral más abundante e importante del cuerpo humano, el 99 % se halla en los huesos. La ingesta adecuada de calcio es muy importante, ya que éste desempeña numerosas funciones fisiológicas en el organismo. Su presencia a nivel celular es fundamental, porque participa en la excitabilidad neuromuscular, transmisiones de impulsos nerviosos. Mientras que, en el interior de la célula participa como coenzima en algunos procesos, ayuda también en la regulación de la permeabilidad de la célula y regulaciones hormonales como la calcitonina y vitamina D₃, y la parathormona o paratohormona (PTH), también denominada hormona paratiroidea o paratirina. La ingesta diaria admisible (IDA), de calcio varía en cada etapa de vida humana, en hombres y mujeres se recomienda una IDA de 800 mg a 1200 mg (Carbajal, 2017; García, 2006).

Hierro

El hierro un elemento metálico que se puede encontrar en forma férrica Fe (III) o ferrosa Fe (II). En la dieta humana el Fe se encuentra como hierro hemínico (forma parte de la hemoglobina o mioglobina animal) en las carnes (rojas y blancas) o como hierro no hemínico (no forma parte de la hemoglobina, sino de cualquier otro compuesto) en los alimentos de origen vegetal, las sales minerales y algunos alimentos de origen animal como la leche y los huevos (Carbajal, 2017).

La principal función del hierro en el organismo consiste en la formación de compuestos esenciales para el transporte y utilización del oxígeno. La mayor parte

del hierro que ha sido ingerido se encuentra en el cuerpo en forma de hemoglobina, que es un complejo formado entre una proteína y el hierro de los glóbulos rojos, que transporta el oxígeno en todo el cuerpo. También se puede encontrar en la mioglobina, los citocromos, algunas metaloenzimas o almacenado en forma de ferritina (Carbajal, 2017).

El hierro inorgánico por acción del ácido clorhídrico del estómago pasa a su forma reducida, ion ferroso (Fe^{2+}), que es la forma química soluble capaz de atravesar la membrana de la mucosa intestinal. Algunas sustancias como el ácido ascórbico, ciertos aminoácidos y azúcares pueden formar quelatos de hierro de bajo peso molecular que facilitan la absorción intestinal de éste (Forrellat et al., 2000). Se recomienda una IDA de calcio de 15 mg a 20 mg en hombres y mujeres (García, 2006).

Magnesio

El magnesio, es el segundo catión intracelular más abundante en el organismo humano, después del potasio, siendo esencial en gran número de procesos enzimáticos y metabólicos (Carbajal, 2017).

Es un cofactor en todas las reacciones enzimáticas que involucran al ATP y forma parte de la membrana que mantiene la excitabilidad eléctrica de las células musculares y nerviosas (Carbajal, 2017).

Al igual que el calcio, el magnesio influye en el metabolismo óseo, ayudando a prevenir la fragilidad de los huesos (Carbajal, 2017). También se encuentra en la sangre y el resto en los tejidos blandos, formando parte de cerca de 300 enzimas, la más importante es la ATPasa, la cual es utilizada en todas las funciones que requieran gasto energético (Carbajal, 2017). El magnesio al igual que todos los elementos requeridos en el organismo, necesita ser ingerido de forma suficiente para que el metabolismo abastezca a las células que lo requieren. La IDA de magnesio en hombres y mujeres se considera de 300 mg a 400 mg (García, 2006).

3. Objetivos

3.1. General

Evaluar el poder quelante de las proteínas del lactosuero, mediante la formación de complejos con Fe(II), Mg(II) y Ca(II) para considerarlos como posibles aditivos en el desarrollo de alimentos funcionales y/o suplementos alimenticios.

3.2. Específicos

- Obtener el suero lácteo a partir de una hidrólisis enzimática de leche para su posible aplicación en la industria de alimentos.
- Separar las fracciones proteicas y peptídicas presentes en el suero lácteo mediante tratamientos químicos y físicos.
- Evaluar la capacidad para acarrear metales de las proteínas y péptidos, utilizando reacciones de complejación con Fe(II), Mg(II) y Ca(II) a diferentes concentraciones para obtener el de mayor afinidad.
- Analizar el perfil electroforético por gel de poliacrilamida para identificar el cambio en las fracciones proteicas y peptídicas ante la presencia de Fe(II), Mg(II) y Ca(II).

4. Metodología

4.1. Obtención del suero

Se trabajó con 8 L de leche bronca, a partir de la cual se obtuvo el suero lácteo mediante hidrólisis enzimática. La leche bronca fue descremada y pasteurizada a 72°C por 15 s, seguido de un choque térmico. A la muestra se le realizó una evaluación organoléptica y se midieron parámetros fisicoquímicos, tales como: porcentaje de grasa, densidad y acidez (Artica, 2014).

La leche se calentó a 35-37°C, al llegar a esta temperatura se agregaron 4 mL de renina y se dejó reposar durante 45 min, bajo las mismas condiciones de temperatura, para obtener la coagulación enzimática. Posteriormente, la cuajada se cortó y se dejó en reposo durante 15 min, con el propósito de estimular la sinéresis. La cuajada se removió por filtración. El suero lácteo recuperado se filtró con algodón, se envasó en condiciones asépticas, para finalmente almacenarlo en frascos de vidrio ámbar de 100 mL a -20°C (Pérez & Martínez, 2011).

4.2. Preparación de soluciones

La preparación de todas las soluciones utilizadas durante la experimentación se encuentra descrita en la sección de anexos.

4.3. Análisis fisicoquímico del suero lácteo

Para conocer los componentes del suero lácteo y la cantidad de cada uno de ellos, se utilizó el equipo Lactoscan MCC50. La muestra se analizó a temperatura ambiente y no requirió de tratamiento previo. Los parámetros que se midieron fueron: grasa, densidad, lactosa, sólidos, proteína, agua añadida, temperatura de la muestra, pH y conductividad.

4.4. Purificación y concentración de los péptidos del suero lácteo

Las proteínas de alto peso molecular contenidas en el suero lácteo se precipitaron en medio ácido, se siguió la metodología descrita por Galindo et al., 2006; para lo cual, se trataron dos muestras, una de ellas con ácido tricloroacético al 24% (muestra A) y la otra con ácido perclórico al 15% (muestra B).

Para el proceso de precipitación se tomaron alícuotas de 250 mL de suero lácteo. El tratamiento de las muestras (A y B) consistió en agregar 10.5 mL de ácido tricloroacético al 24% y 16.7 mL de ácido perclórico al 15%, respectivamente. Después de 3 horas, las muestras se sometieron a centrifugación a 2000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se separó para realizar el tratamiento de diálisis.

Para la purificación de los péptidos remanentes se utilizó un sistema de diálisis ilustrado en la Figura 2, se adaptó la metodología de Amorós et al., 2013, con modificaciones, consistió en un vaso enchaquetado de 2L, en el que se colocó agua desionizada, un conductímetro (ORION, modelo 130) para medir la conductividad del agua en $\mu\text{S/cm}$, una parrilla de agitación y un baño termostatzado para controlar la temperatura a 4°C.

La muestra (100 mL) se introdujo en la membrana de diálisis, que se sumergió en agua desionizada. Después de que el agua no presentó cambios en la conductividad eléctrica, el líquido interior remanente se ultracongeló a -70°C, para posteriormente eliminar el agua por liofilización en un equipo Freeze Dry System/Freezone 4.5 de Labconco a -47°C y 133×10^{-3} mBar de vacío.

El sólido obtenido se transfirió en frascos de vidrio ámbar de 100 mL y se almacenó hasta su análisis.

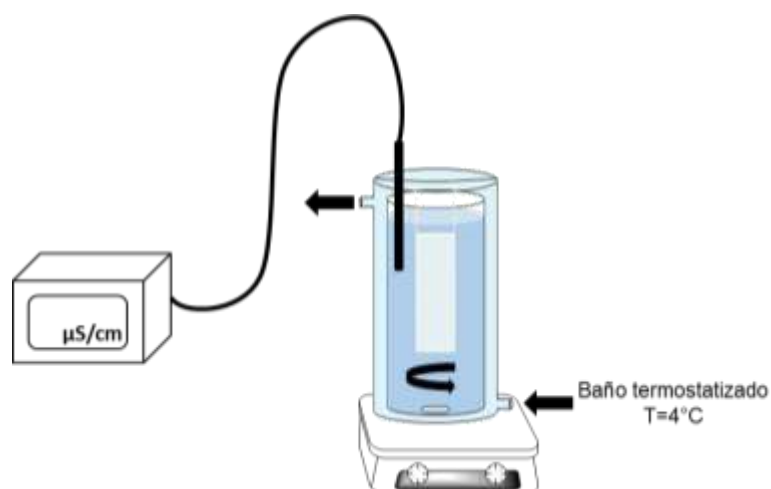


Figura 2. Sistema de diálisis para la purificación de proteínas y péptidos del suero lácteo.

4.5. Evaluación de la capacidad acarreadora de metales

Para evaluar la capacidad acarreadora de iones metálicos, se pesaron 500 mg de suero lácteo liofilizado y se resuspendieron en 10 mL de solución que contenía los iones metálicos individuales, a las diferentes concentraciones evaluadas, las cuales se muestran en la Tabla 3. Se consideraron las siguientes concentraciones de Ingesta Diaria Recomendable (IDR), en base a ello se propuso un rango, siendo la media la IDR reportada por la FAO/OMS (García et al., 2017).

Tabla 3. Diferentes sistemas evaluados de iones metálicos a diferentes concentraciones.

Sistema	Ion metálico	Concentración, mgL ⁻¹
1	Ca(II)	700
2		800
3		900
4	Fe(II)	10
5		15
6		20
7	Mg(II)	250
8		350
9		450

4.5.1. Calcio

Para la determinación de calcio libre se utilizó la metodología modificada propuesta por Brown y Rydvist (1981), en la cual el calcio reacciona con el arsenazo III (ácido 1,8-dihidroxi-3,6-disulfo-2,7-naftalenen-bis (azo)-dibenzenarsónico) formando un complejo de calcio-arsenazo en medio neutro, de color azul, cuya absorbancia a 650 nm es directamente proporcional a la cantidad de calcio existente en una muestra.

Los sistemas 1-3 se prepararon por triplicado y la mezcla se mantuvo en agitación por cinco horas a temperatura ambiente. Para evaluar el tiempo de máxima fijación, cada hora se tomó una alícuota de 50 μL , incluyendo el inicio ($t=0$). La alícuota se diluyó 1:10 con solución amortiguadora de fosfatos (1 mol L^{-1} a pH 8).

Se tomaron 10 μL de la muestra diluida, se adicionó 1 mL de arsenazo III (SPINREACT) y se midió la absorbancia a 650 nm contra un blanco de agua desionizada. La cuantificación se realizó mediante una calibración directa en el intervalo de 0 a 50 mgL^{-1} de Ca(II) .

4.5.2. Hierro

Para determinar la cantidad de hierro que es fijado por los péptidos obtenidos del suero lácteo se utilizó la metodología reportada por Hwang y colaboradores (2001) con modificaciones. En esta metodología se utiliza la ferrocina (ácido 4,4-[3-(2-piridinil)-1,2,4-triazina-5,6-diil]bis bencensulfónico, sal monosódica), un reactivo que permite cuantificar la cantidad de hierro en solución, formando un complejo de color magenta que puede ser fácilmente determinado a una $\lambda=562\text{ nm}$.

Los sistemas 4-6 se prepararon por triplicado y la mezcla se mantuvo en agitación por cinco horas a temperatura ambiente. Para evaluar el tiempo de máxima fijación, cada hora se tomó una alícuota 500 μL , incluyendo el inicio ($t=0$).

La alícuota se le añadieron 100 μL de hidroxilamina 1.4 M (en HCl), la mezcla se agito y se dejó reaccionar por 10 min a temperatura ambiente, finalmente se agregó 100 μL de ferrocina (pH 9.5) y se midió la absorbancia a 562 nm contra un blanco de agua desionizada. La cuantificación se realizó mediante una calibración directa en un intervalo de 0 a 2 mgL^{-1} de Fe(II).

4.5.3. Magnesio

La determinación de magnesio presenta interferencia con el calcio, por lo que se determinó por separado bajo las mismas condiciones ensayadas con el calcio.

El magnesio forma un complejo coloreado al reaccionar con Magon sulfonado en solución alcalina. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de magnesio en la muestra.

Los sistemas 7-9 se prepararon por triplicado y la mezcla se mantuvo en agitación por cinco horas a temperatura ambiente. Para evaluar el tiempo de máxima fijación, cada hora se tomó una alícuota de 50 μL , incluyendo el inicio ($t=0$). La alícuota se diluyó 1:10 con buffer Britton-Robinson (0.4molL^{-1} a pH 11.2).

Se tomaron 10 μL de la muestra diluida, se mezclaron con 1 mL del reactivo xilidil (SPINREACT) y se midió la absorbancia a 546 nm contra un blanco de agua desionizada. La cuantificación se realizó mediante una calibración directa en el intervalo de 0 a 50 mg/L de Mg(II).

4.6. Separación de péptidos por electroforesis en gel de poliacrilamida Tris-Tricina SDS-PAGE

Una alícuota de 40 μL de las muestras estandarizadas de sólido resuspendido al 5% en soluciones de CaCl_2 (800 mgL^{-1}), FeCl_2 (20 mg L^{-1}) y MgCl_2 (350 mgL^{-1}), se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL, adicionando 20 μL de buffer colorante y 3 μL de β -mercaptoetanol. Posteriormente, se incubaron a 40°C por 30 min e inyectaron en los carriles formados por el gel de concentración.

Las muestras y el estándar de péptidos se prepararon después de que transcurrió el tiempo de polimerización de los geles de electroforesis, tal como se describe en la sección de anexos.

Transcurrido el tiempo de polimerización se retiraron los peines y los cristales se instalaron en la cámara de electroforesis, donde también se adicionaron 300 mL de buffer de corrida (BIORAD) (1X) pH=8.25 evitando fugas del sistema.

Después, se inyectaron 15 μ L de las muestras acondicionadas con los iones metálicos [Ca(II), Fe(II) y Mg(II)] en cada uno de los carriles, además de incluir la muestra sin adición de iones (muestra control) y el estándar de péptidos. A continuación, se llevaron a la cámara de electroforesis donde se adicionaron otros 300 mL del buffer de corrida y se procedió a conectar la fuente para dar comienzo a la electroforesis.

La corrida se inició a 30 V hasta que las muestras cruzaron el gel de separación, seguido de un cambio de voltaje a 95 V durante la separación de los péptidos, que duró entre 7 y 8 h para culminar la migración de éstos. Todo el proceso se llevó en un baño de hielo para disminuir el calor generado por la corriente eléctrica.

Para fijar los péptidos al término de la corrida, los geles se colocaron en una solución de ácido acético al 7.5% (v/v) durante una hora con agitación mecánica suave. Sucesivamente, los geles se colocaron en una solución de azul de Comassie G-250, durante un tiempo de 10 h con agitación mecánica suave. Para desteñir los geles, se sumergieron en una solución de ácido acético al 7% (v/v) con 10% (v/v) de metanol por espacio de 4 h y con agitación mecánica suave.

Finalmente, los geles se enjuagaron con agua desionizada y se obtuvo la imagen de éstos para ser analizados mediante el software, determinándose los pesos moleculares de acuerdo con el estándar de polipéptidos (BIORAD) utilizado.

4.7. Determinación de actividad antioxidante por el método de FRAP

El método determina la capacidad antioxidante de forma indirecta. Se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} que es menos antioxidante. El complejo férrico-2,4,6-tripiril-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado.

El reactivo FRAP se preparó a partir de un buffer de acetatos 300 mM a pH 3.6, cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 20 mM y TPTZ (4,6-tripiridyl-s-triazina) 10 mM, Las 3 soluciones se mezclaron en proporciones 10:1:1.

Los péptidos del suero lácteo se sometieron bajo las mejores condiciones de complejación de cada ion divalente [$\text{Ca}(\text{II})$, $\text{Fe}(\text{II})$ y $\text{Mg}(\text{II})$] y posterior a su liofilización, se resuspendieron al 5% en agua desionizada. Posteriormente, se tomaron 250 μL de cada una de las mezclas, se agregó 1 mL de reactivo FRAP, se aforó a 10 mL con agua desionizada y se llevó a baño maría durante 10 min a 37°C y finalmente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm.

5. Resultados y discusión

5.1. Extracción y caracterización del suero lácteo

Para extraer el lactosuero fue necesario un análisis previo a la leche descremada y pasteurizada. De la evaluación organoléptica se obtuvieron las siguientes características: color blanco opalescente, ligeramente cremoso, sabor dulce y olor característico. Los resultados de los parámetros fisicoquímicos fueron: 2.9% de grasa, 1.0335 g/mL de densidad y 19°D de acidez. De acuerdo con el porcentaje de grasa, se trata de una leche parcialmente descremada (NOM-155-SCFI-2012), teniendo una densidad ligeramente mayor a la que dicta la norma, además, la acidez es superior a lo máximo permitido en la normativa vigente.

A pesar de que los parámetros de densidad y de acidez resultaron superiores a lo permitido por la NOM-155-SCFI-2012, no impidieron obtener el suero lácteo, ya que el objetivo del presente proyecto no era evaluar el queso obtenido, ni su rendimiento. A partir de 8 L de leche se obtuvo 995 g de queso panela y 6 L de suero dulce.

Al suero obtenido se le realizó un análisis fisicoquímico, los resultados se muestran en la Tabla 4. El agua es el componente que representa el mayor porcentaje (87.09 %), seguido de lactosa (3.33 %) y proteína (2.33 %). La composición nutricional del lactosuero puede variar considerablemente dependiendo de las características de la leche utilizada para elaborar queso, el tipo de queso que se produce y el proceso utilizado para su elaboración (Poveda, 2013).

Se obtuvo 0.42% de grasa, Callejas et al. (2012) reportaron un rango de 0-0.5% en materia grasa para suero dulce y ácido.

La lactosa es un disacárido compuesto por una molécula de galactosa y una de glucosa, el cual representa el 4.99% en el suero según Álvarez (2013). Callejas et al. (2012) consideran un rango de 4-5% de lactosa en suero dulce y ácido, de esta manera se determina la carencia mínima de lactosa en el suero analizado, siendo este del 3.33%.

El lactosuero presentó 0.57% de sólidos, los cuales incluyen a algunos minerales como fósforo, sodio, calcio y magnesio, principalmente, y vitaminas, tales como tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, cobalamina y ácido ascórbico (Guerrero et al., 2011).

Callejas y colaboradores (2012) realizaron una caracterización fisicoquímica del lactosuero dulce y ácido, de acuerdo con las muestras analizadas consideraron un rango de 0.4% a 0.6% y 6% a 8% de sólidos respectivamente. Asimismo, Panesar (2007) y Callejas (2012) obtuvieron 0.42% a 0.51% de sólidos en suero dulce, asumiendo la presencia de calcio, fósforo, potasio y cloruros.

Tabla 4. Composición fisicoquímica del lactosuero.

Componente	Promedio*	%DER
Grasa (%)	0.42±0.02	4.92
Sólidos no grasos (%)	6.26±0.05	0.79
Densidad (g/mL)	1.02±0.00	0.02
Lactosa (%)	3.33±0.03	0.87
Sólidos (%)	0.57±0.01	1.02
Proteína (%)	2.33±0.02	0.99
Temperatura de la muestra (°C)	13.15±0.64	4.84
Punto crioscópico (°C)	-0.37±0.00	0.93
pH	6.12±0.03	0.41
Conductividad (mS/cm)	3.61±0.02	0.42
Agua (%)	87.09±0.09	0.11

*Los valores son promedio de 3 réplicas. ± desviación estándar. %DER: porcentaje de desviación estándar relativa.

Las proteínas no constituyen la fracción más abundante, sin embargo, contienen cuatro proteínas principales: β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, seroalbúmina e inmunoglobulinas. Entre los componentes proteicos minoritarios se encuentran: la lactoferrina, enzimas como la plasmina y lactoperoxidasa (Jovanovic et al., 2015).

El subproducto obtenido durante la elaboración de quesos depende del tratamiento que recibe la leche, de ahí deriva la clasificación del suero, siendo dulce o ácido, Pintado (2012) considera un suero dulce aquel que su pH entra dentro de un rango de pH=5.8 a pH=6.6, el resultado obtenido en el LactoScan fue de pH=6.12, de esta manera el suero analizado cumple con el requerimiento de ser dulce.

El punto de congelación obtenido fue de -0.37°C , esto debido a la menor cantidad de sólidos (lactosa), lo cual indica que se encuentra mayor cantidad de agua en el suero, es por ello por lo que, la congelación es más rápida. Amador y colaboradores (2019) realizaron la caracterización de un suero antes y después de una hidrólisis de la lactosa, lo cual provocó la disminución del punto crioscópico, esto debido a que se origina ruptura del disacárido en azúcares simples, lo cual provoca aumento en la concentración de sólidos, que está ligado con el punto de congelación del suero.

Se obtuvo una conductividad de 3.61 mS/cm, a diferencia de otros autores que obtuvieron un valor más elevado como es el caso de Callejas et al. (2012) que durante su análisis arrojaron un valor de 8.76 mS/cm. Todo esto está asociado a los contenidos de sólidos totales en el lactosuero.

5.2. Purificación y concentración de los péptidos del suero lácteo

Para la precipitación de las proteínas del suero lácteo se utilizaron soluciones de ácido tricloroacético (al 24%) y de ácido perclórico (al 15%). El sobrenadante del suero lácteo precipitado con HClO_4 , no pudo utilizarse para evaluar la capacidad acarreadora de metales, debido a que después de liofilizar la muestra, se oxidó por la concentración de percloratos remanentes. En la Figura 3 se presenta el sobrenadante liofilizado, el cual muestra una apariencia grisácea que puede estar relacionada con un proceso de oxidación.



Figura 3. Apariencia del suero lácteo oxidado por presencia de percloratos, posterior a un liofilizado.

La precipitación de las proteínas del suero lácteo con CCl_3COOH permitió obtener un 9% de precipitado (grasa, proteína y sólidos no grasos) y 91 % de sobrenadante (agua, lactosa y sólidos). El sobrenadante se dializó, hasta obtener una conductividad cercana o igual a la del agua desionizada ($0.09 \mu\text{S cm}^{-1}$) y que ésta se mantuviese constante.

La diálisis es una forma de filtración molecular. Es un proceso que separa moléculas de acuerdo con su tamaño, mediante el empleo de membranas semipermeables que contienen poros de dimensiones inferiores a las macromoleculares. Estos poros permiten que moléculas pequeñas, tales como las de los disolventes, sales y metabolitos pequeños, se difundan a través de la membrana, pero bloqueen el tránsito de moléculas mayores. Las moléculas pequeñas pasan a través de la membrana al fluido externo hasta que se alcanza el equilibrio, las macromoléculas permanecerán en el interior del saco de diálisis. El proceso se repite varias veces hasta que la conductividad del agua desionizada permanezca constante (Amorós et al., 2013).

Posteriormente, el remanente se liofilizó y se obtuvo un rendimiento de sólidos del 0.45%. Entre estos sólidos se encuentran presentes moléculas de pesos moleculares medianamente altos (14 kDa), esto debido a que el tamaño de los poros del acetato de celulosa no permite el paso de moléculas cuyo peso molecular sea igual o superior a 10 kDa, lo cual significa que las moléculas pequeñas, como los iones de sales y metabolitos (lactosa, aminoácidos, vitaminas hidrosolubles) pueden atravesar membranas semipermeables para diálisis comunes, separándose de manera diferencial de macromoléculas, tales como péptidos (Roca et al., 2003). Smacchi y Gobbetti (2000) reportaron la existencia de fracciones peptídicas en el yogurt de hasta 10 kDa que presentaban actividades biológicas.

5.3. Evaluación de la capacidad acarreadora

El calcio, el hierro y el magnesio están disponibles en su forma orgánica e inorgánica, lo que influye en su absorción y biodisponibilidad. La inhibición o el incremento de la biodisponibilidad de estos minerales se puede deber a muchos factores dietéticos (Walters et al., 2018). Los fitatos, los oxalatos y los polifenoles son ejemplo de algunos inhibidores, ya que son agentes quelantes de iones divalentes como el Fe(II), el Ca(II) o el Mg (II) (Guéguen & Pointillart, 2000; Thankachan et al., 2008).

Debido a la importancia fisiológica que tienen estos minerales, se han buscado estrategias que permitan el incremento de su absorción, por lo que el uso de péptidos como quelantes metálicos es una buena alternativa.

Las concentraciones evaluadas para los tres iones metálicos (Ca^{2+} , Fe^{2+} y Mg^{2+}) se eligieron tomando en cuenta la ingesta diaria recomendada. Los experimentos se realizaron durante 5 horas para favorecer la complejación de los iones metálicos con los péptidos presentes en el sólido liofilizado. En los tres casos se evaluó la complejación del ion metálico con los péptidos a partir de la determinación de cada uno de los iones libres en solución, por diferencia se obtuvo el porcentaje de ion retenido por los péptidos acarreadores de minerales.

5.3.1. Evaluación de la capacidad acarreadora con calcio

Se realizó una Prueba Tukey ($p=0.05$) y la complejación Ca^{2+} -péptido no mostró diferencias significativas entre las diferentes concentraciones trabajadas; además, en los tres casos se muestran porcentajes de Ca^{2+} retenido $>95\%$ (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de calcio retenido en los péptidos.

Tiempo(h)	[Ca ²⁺]					
	700 mg/L		800 mg/L		900 mg/L	
	%Ca _{retenido}	%DER	%Ca _{retenido}	%DER	%Ca _{retenido}	%DER
1	96.96±0.13	0.13	95.35±0.04	0.04	95.73±0.08	0.08
2	97.96±0.12	0.12	98.82±0.08	0.09	96.50±0.12	0.12
3	99.36±0.00	0.00	99.15±0.06	0.06	97.64±0.08	0.08
4	99.36±0.00	0.00	99.31±0.06	0.06	98.69±0.01	0.08
5	99.36±0.00	0.00	99.58±0.06	0.06	99.11±0.01	0.08

*Los valores son promedio de 3 réplicas. ± desviación estándar. %DER: porcentaje de desviación estándar relativa.

En la Figura 4(A) es posible observar el comportamiento de esta complejación de acuerdo con el tiempo y bajo diferentes concentraciones de Ca^{2+} , sin embargo, se considera que se obtuvieron las mejores condiciones a una concentración de 800 mg/L, esto debido a que en la segunda hora se logró una complejación de 98.8% y conforme pasaba el tiempo el Ca^{2+} se mantenía retenido. La Figura 4(B) muestra un gráfico con el cambio de porcentaje de retención de Ca^{2+} , en el que se puede observar que se obtiene la mayor pendiente en la segunda hora.

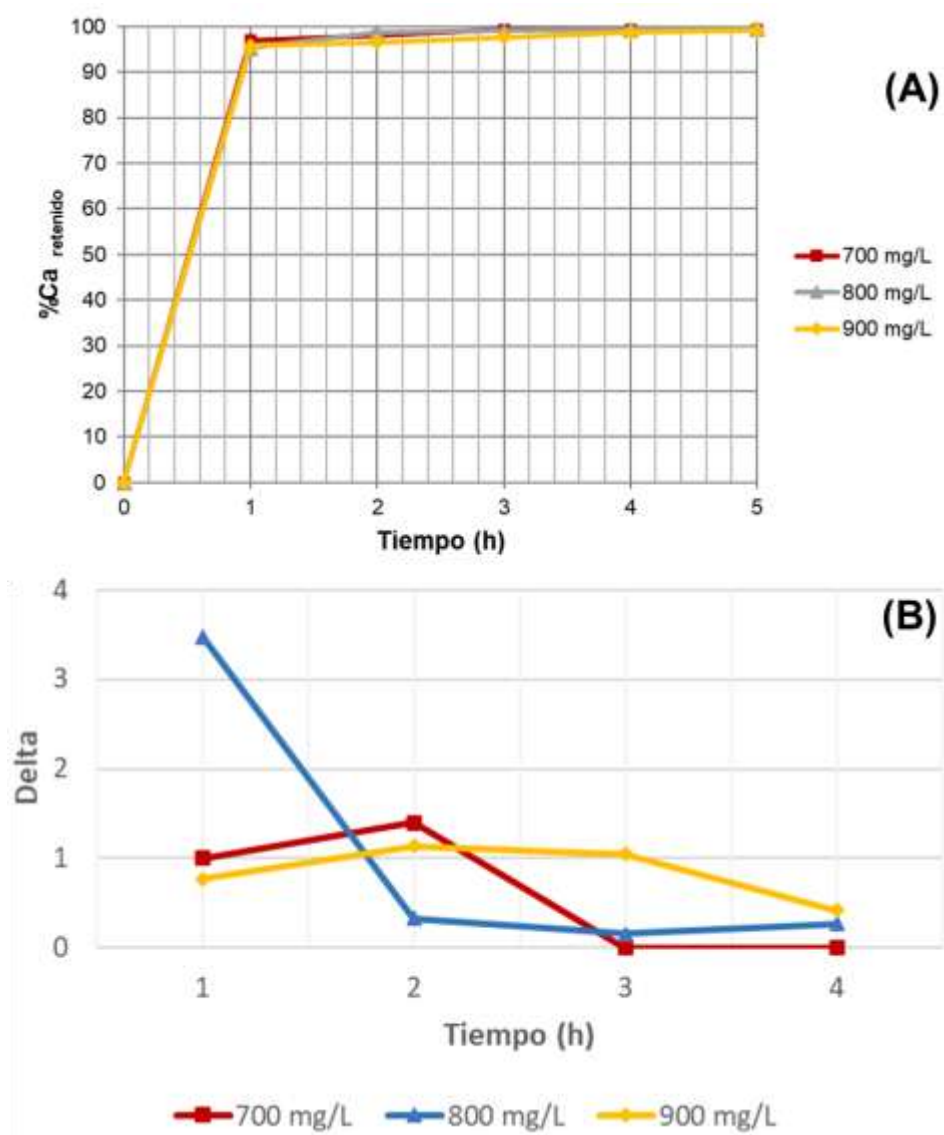


Figura 4. (A) Porcentaje de Ca^{2+} fijado en los péptidos con relación al tiempo, (B) Cambios en el porcentaje de Ca^{2+} fijado.

De acuerdo con los datos obtenidos es posible deducir que los sólidos presentes en el suero lácteo liofilizado, siendo esto el caso de posibles péptidos, presentan la capacidad de complejarse con el calcio, esto debido a la fuente de iones que provee el calcio para complejarse con péptidos provenientes de la caseína que contienen fosfato que está unido covalentemente vía uniones monoéster a los residuos de serina (Torres et al., 2005).

El calcio tiene gran afinidad a unirse a fracciones proteicas, ya que inicialmente este ion se encontraba unido a las micelas con la función de estabilizarla, debido a los diferentes tratamientos realizados en esta investigación como la coagulación, la micela se desestabilizó (García et al., 2004).

5.3.2. Evaluación de la capacidad acarreadora con hierro

Como se muestra en la Tabla 6, el Fe(II) (a concentración de 15 mg/L) mostró menor poder complejante, durante la cinética de complejación. Para evaluar diferencias significativas entre las tres condiciones, se realizó una Prueba Tukey ($p=0.05$), mediante la cual se encontró que la concentración intermedia (15 mg/L) es precisamente la que se diferencia de las demás.

Tabla 6. Porcentaje de hierro retenido en los péptidos.

Tiempo(h)	[Fe ²⁺]					
	10 mg/L		15 mg/L		20 mg/L	
	%Fe _{retenido}	%DER	%Fe _{retenido}	%DER	%Fe _{retenido}	%DER
1	95.99±0.07 ^a	0.07	93.80±0.06 ^b	0.07	95.58±0.01 ^a	0.01
2	96.66±0.12 ^a	0.13	93.88±0.05 ^b	0.06	99.02±0.06 ^a	0.06
3	96.85±0.14 ^a	0.14	93.90±0.02 ^b	0.03	99.11±0.01 ^a	0.01
4	96.81±0.09 ^a	0.09	94.18±0.05 ^b	0.05	98.34±0.00 ^a	0.00
5	99.19±0.01 ^a	0.01	94.40±0.03 ^b	0.03	98.34±0.00 ^a	0.00

*Los valores son promedio de 3 réplicas. ± desviación estándar. %DER: porcentaje de desviación estándar relativa. Diferentes literales entre columnas indican diferencias significativas (Tukey ≤ 0.05).

El comportamiento del Fe(II) fijado en los péptidos se muestra en la Figura 5(A), en la que se observa que este ion metálico tiene menor poder de complejarse a los péptidos, a diferencia del calcio. Esto también se atribuye a la diferencia de concentraciones de ambos iones, ya que en el caso del Ca(II) fueron hasta 45 veces más altas. Vegarud et al. (2000) encontraron que los fosfopéptidos han mostrado diferencia significativa en su afinidad por la unión de calcio y hierro.

Adicionalmente, a 20 mg/L se obtuvo un mejor resultado, debido a que el hierro fijado en la fracción proteica aumentó hasta obtener un porcentaje de 99.1%, esto en las primeras tres horas (Figura 5A). La desventaja se mostró en el tiempo posterior, debido a una disminución de 0.77%, lo cual se comprueba en el gráfico de deltas (cambios en los porcentajes de retención) que se construyó (Figura 5B).

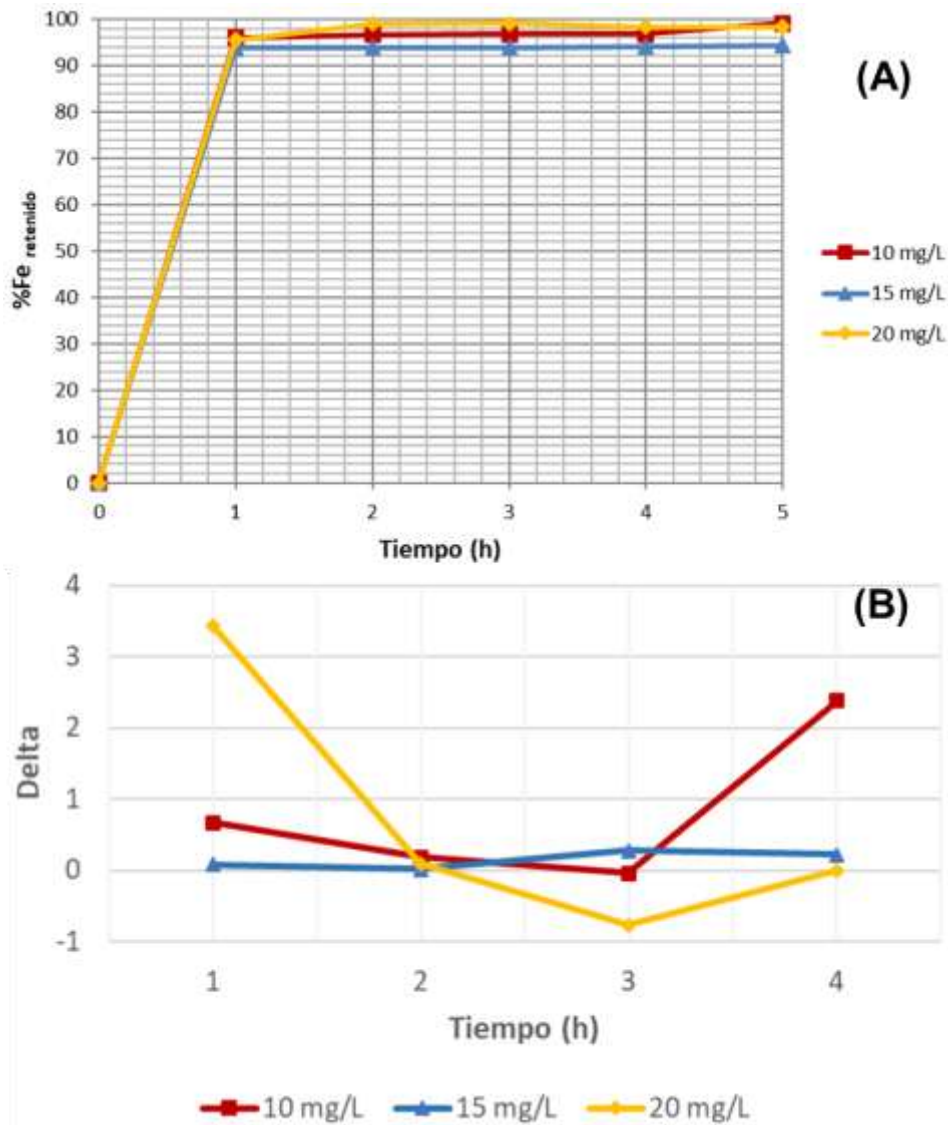


Figura 5. (A) Porcentaje de Fe^{2+} fijado en los péptidos con relación al tiempo, (B) Cambios en el porcentaje de Fe^{2+} fijado.

Kibangou et al. (2005) consideran que no todas las fracciones proteicas son iguales en su interacción con $Fe(II)$, esto debido a su composición de aminoácidos y a su vez su electronegatividad. Los derivados de β -caseína presentan mayor afinidad al Fe^{2+} .

5.3.3. Evaluación de la capacidad acarreadora con magnesio

Se realizó una Prueba Tukey ($p=0.05$) y la complejación Mg^{2+} -péptido no mostró diferencias significativas entre las diferentes concentraciones trabajadas; además, en los tres casos se muestran porcentajes de Mg^{2+} retenido $>94\%$ (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de magnesio retenido en los péptidos.

Tiempo(h)	[Mg ²⁺]					
	250 mg/L		350 mg/L		450 mg/L	
	%Mg _{retenido}	%DER	%Mg _{retenido}	%DER	%Mg _{retenido}	%DER
1	97.91±0.00	0.00	98.51±0.000	0.00	94.21±0.67	0.72
2	97.91±0.00	0.00	98.51±0.000	0.00	94.54±0.00	0.00
3	97.91±0.00	0.00	98.51±0.000	0.00	97.13±1.56	1.60
4	97.91±0.00	0.00	98.51±0.000	0.00	98.84±0.00	0.00
5	97.91±0.00	0.00	98.51±0.000	0.00	98.84±0.00	0.00

*Los valores son promedio de 3 réplicas. ± desviación estándar. %DER: porcentaje de desviación estándar relativa.

El Mg^{2+} presentó mayor retención a mayor concentración (450 mg/L), lo cual se puede apreciar en la Figura 6(A). Pero, a diferencia de los otros iones (Ca^{2+} y Fe^{2+}), la retención en estas condiciones aumentó (Figura 6B).

Las caseínas han sido las principales proteínas estudiadas, desde el punto de vista de capacidad acarreadora de magnesio. Vegarud y colaboradores (2000) encontraron que las proteínas del suero también dan lugar a péptidos con capacidad de unión mineral, demostrando que es posible complejar el catión divalente a fracciones proteicas provenientes del suero lácteo.

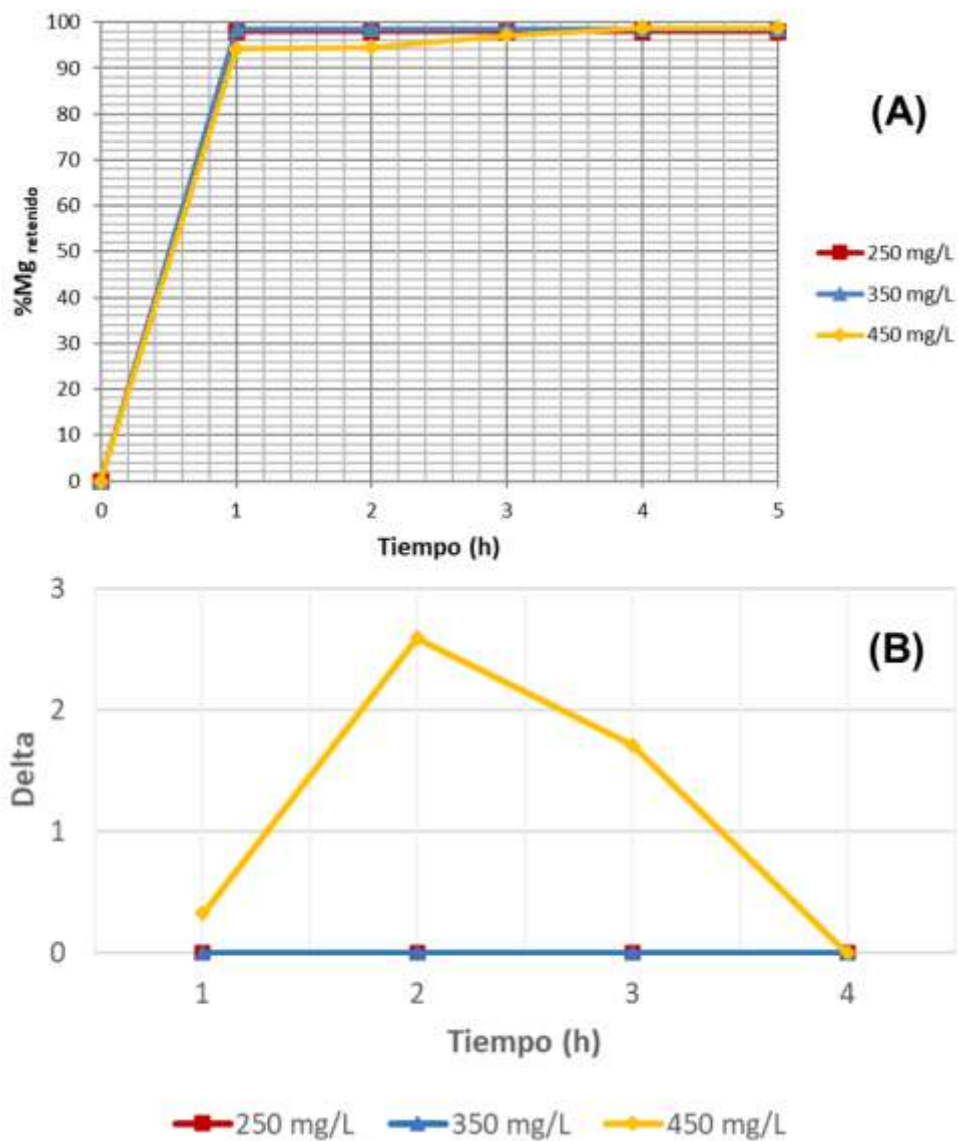


Figura 6. (A) Porcentaje de Mg^{2+} fijado en los péptidos con relación al tiempo, (B) Cambios en el porcentaje de Mg^{2+} fijado.

5.3.4. Comparación de la capacidad acarreadora

Al realizar la comparación de los resultados obtenidos de la complejación de los péptidos con los tres iones metálicos (Mg^{2+} , Fe^{3+} y Ca^{2+}), se puede observar que el comportamiento de complejación varía debido a la afinidad que existe con los péptidos presentes, así como de la capacidad que tiene cada uno de los iones de coordinarse con los grupos amino (principalmente) de los péptidos. Además, se

ha estudiado que la afinidad de estos iones metálicos depende de su fuerza iónica (Vegarud et al., 2000).

La capacidad de las especies minerales para quelarse con péptidos derivados del suero lácteo depende también de la naturaleza del péptido. Onwulata y Huth (2008) reportaron que los hidrolizados de α -LA tienen la habilidad de complejar al calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo y zinc; mientras que los hidrolizados de β -LG tienen afinidad por calcio, cadmio, cobre, hierro, magnesio, manganeso y zinc.

En la Figura 7(A) se muestra la comparación de los resultados obtenidos para la quelación de los tres iones metálicos estudiados, en los que se puede ver que el comportamiento es similar entre los tres iones, lo que indica la alta afinidad que presentan con los péptidos presentes. Sin embargo, cuando se obtienen los cambios en los porcentajes de retención (Figura 7B), es muy notorio que el ion Mg^{2+} se comporta diferente, esto se puede deber a que la capacidad de coordinarse con los péptidos presentes es menor.

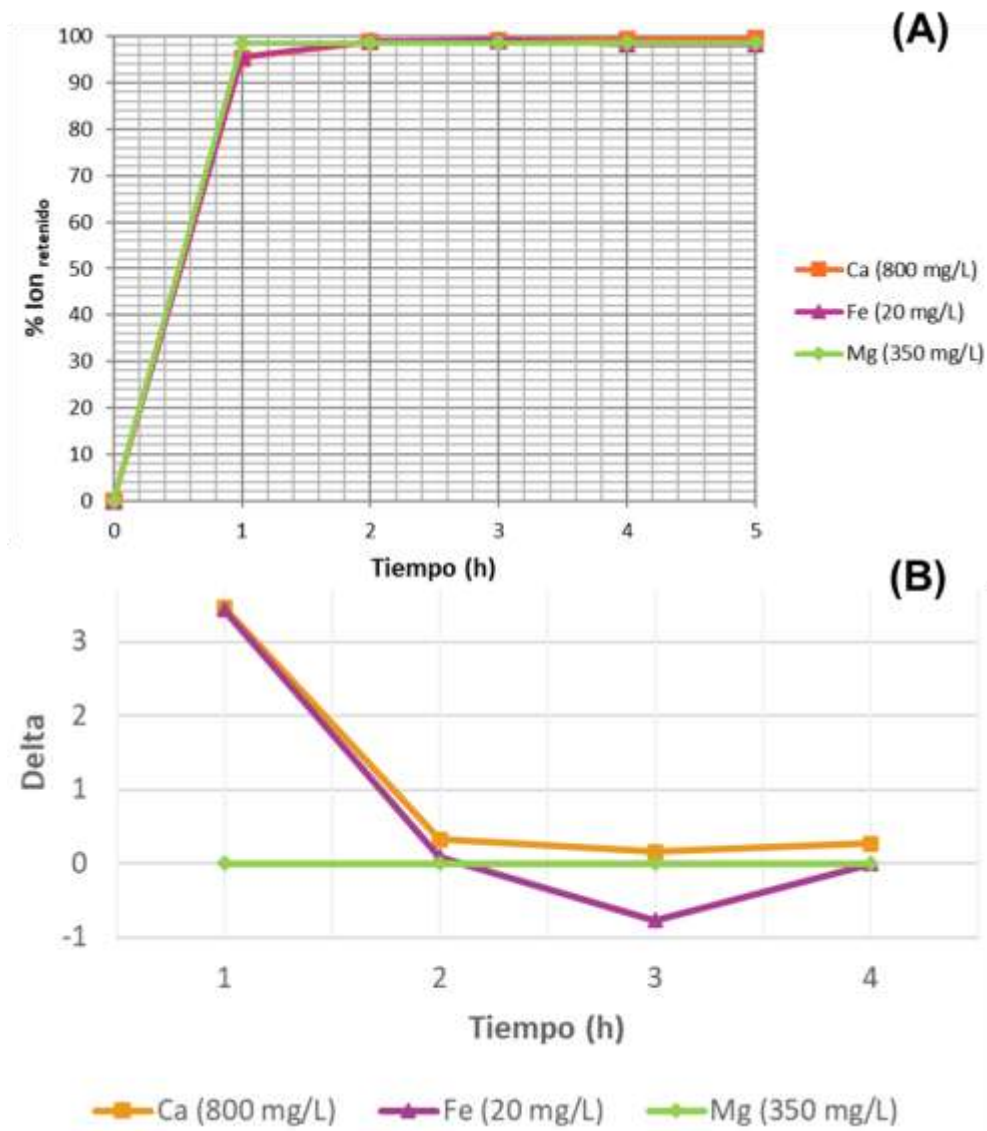


Figura 7. (A) Comparación de las tres reacciones de complejación de los péptidos presentes en el suero lácteo con Ca^{2+} , Fe^{2+} y Mg^{2+} . (B) Cambios en el porcentaje de ion fijado.

5.4. Separación de péptidos y efecto de los iones metálicos

El suero lácteo sin tratamiento, así como la solución de suero lácteo previamente liofilizado (resuspendido al 5% en agua) y sometido a las reacciones de complejación bajo las mejores condiciones (800 mg/L de Ca^{2+} , 20 mg/L de Fe^{2+} y 350 mg/L de Mg^{2+}) se analizaron mediante electroforesis en gel. En la Figura 8

se muestra el gel obtenido, en el que se puede observar que para el caso de Ca^{2+} (carril F) y Fe^{2+} (carril E), hay una disminución en los péptidos de bajo peso molecular (recuadro amarillo), y un ligero incremento en péptidos de mayor peso molecular, lo que no se observa para el Mg^{2+} (carril D).

Esto se puede deber a que las reacciones de complejación que se llevaron a cabo, permitieron la coordinación del ion metálico con los péptidos, y que, dependiendo del número de coordinación del ion metálico, da lugar a un incremento en el peso molecular.

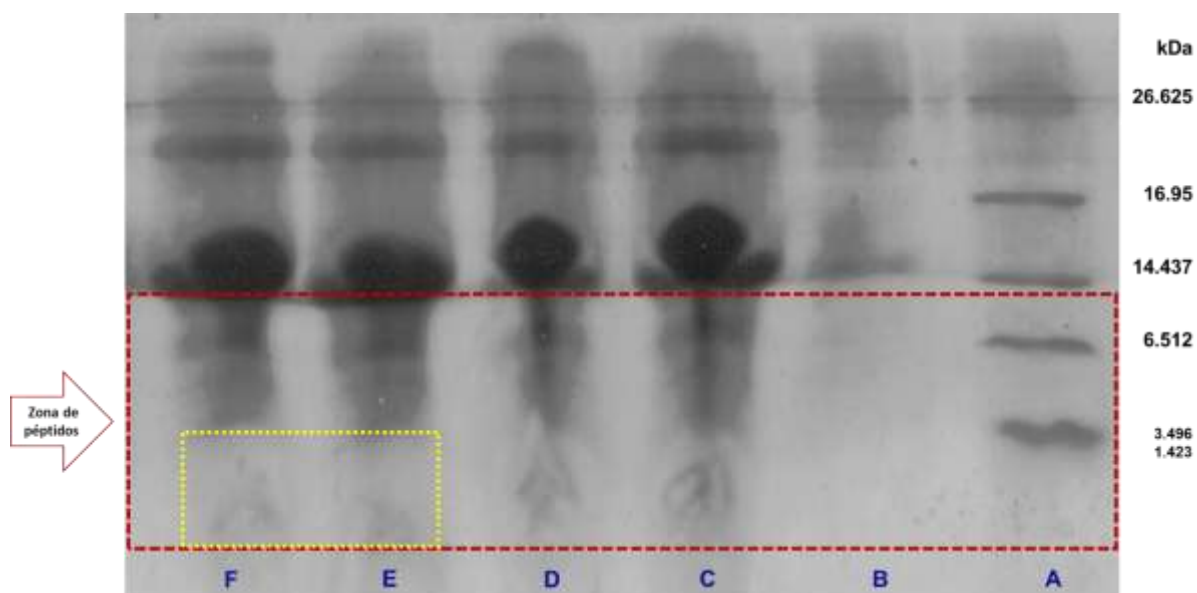


Figura 8. Separación de péptidos presentes en suero lácteo. (A) estándar de péptidos, (B) suero lácteo crudo, (C-F) suero lácteo liofilizado y resuspendido al 5% en agua desionizada: (C) sin tratamiento de complejación, (D) complejoado con Mg^{2+} (350 mg/L), (E) complejoado con Fe^{2+} (20 mg/L) y (F) complejoado con Ca^{2+} (800 mg/L).

La capacidad de los iones metálicos de quelarse con péptidos se ha asociado a la composición de los residuos de aminoácidos (Storcksdieck, 2007). La capacidad quelante para Ca(II) y Fe(II) se ha evaluado en péptidos derivados de los hidrolizados de proteínas del suero lácteo (Zhao et al., 2014a; Zhao et al., 2014b; Caetano-Silva et al., 2015) y en hidrolizados de caseína (Miao et al., 2019).

Para el calcio se han encontrado dos péptidos con mayor capacidad de quelación. El primero está conformado por la secuencia de glicina-tirosina (Gly-

Tyr) y los sitios de enlace incluyen los átomos de oxígeno, el grupo carbonilo y el nitrógeno de los grupos amino o imino (Zhao et al., 2014a); mientras que el segundo está compuesto de la secuencia fenilalanina-ácido aspártico (Phe-Asp), en el cual los átomos de oxígeno del grupo carboxilo y los de nitrógeno del grupo amido son los que pueden dar lugar a la formación de los enlaces de coordinación del calcio mediante la donación de pares de electrones (Zhao et al., 2014b).

Diversos estudios acerca de la quelación del hierro con péptidos han demostrado que los residuos de Glu, glutamina (Gln), prolina (Pro) y serina (Ser) juegan un papel muy importante en el proceso (Peres et al., 1999; Storcksdieck et al., 2007; Lee et al., 2009); así como, la secuencia de aminoácidos, el impedimento estérico y el largo de la cadena peptídica (Zhu et al., 2015; Cao et al., 2017). Las proteínas y los péptidos fosforilados se caracterizan por tener capacidades de complejación muy altas con hierro, debido a los enlaces iónico y de coordinación (Vegarud et al., 2000).

Caetano-Silva y colaboradores (2015) encontraron que los péptidos obtenidos de hidrolizados de proteínas del suero lácteo, y que contenían en su secuencia de aminoácidos ácido glutámico y/o ácido aspártico (Glu, Asp), mostraban mayor capacidad de complejación de hierro, debido a sus grupos carboxílicos. Por su parte, Miao et al. (2019) evaluaron la capacidad de quelación de hierro con péptidos obtenidos de la hidrólisis de caseína, encontrando cuatro péptidos que corresponden a α -S1-caseína (99-105), α -S2-caseína (40-47), β -caseína (121-128) y β -caseína (192-198), de peso molecular de 830.6120 Da, 1012.5280 Da, 873.4440 Da y 829.4570 Da, respectivamente, como los principales acarreadores de hierro, lo que está en concordancia con trabajos previos en los que se ha encontrado que los péptidos acarreadores de hierro tienen pesos moleculares por debajo de 3 kDa.

Cabe señalar que los trabajos reportados se enfocan al estudio de péptidos obtenidos de hidrolizados de proteínas del suero lácteo o de la caseína; sin embargo, en el presente proyecto se evaluaron péptidos contenidos en el suero lácteo, sin realizar una hidrólisis.

5.5. Actividad antioxidante de los péptidos complejados con iones metálicos

Los antioxidantes que se obtienen de la dieta ayudan al organismo a protegerse contra los radicales libres, por lo que reducen el estrés oxidativo. En los últimos años, las proteínas del suero lácteo han sido descritas como antioxidantes, y más aún, se han buscado alternativas que incrementen esa actividad antioxidante, entre las que destacan la hidrólisis (Corrochano et al., 2018).

La actividad antioxidante, mediante el ensayo FRAP fue mayor para los péptidos tratados con Fe(II), esto es debido a que la fijación de este ion permite el incremento del poder reductor de los péptidos contenidos en la muestra.

La actividad antioxidante se ha evaluado sólo en las proteínas del suero lácteo y a sus hidrolizados (Brandelli et al., 2015), sin embargo, no hay estudios de péptidos complejados con iones metálicos. De hecho, se ha estudiado que las fracciones de suero lácteo con pesos moleculares debajo de 5 kDa tienen las mejores propiedades antioxidantes, comparadas con las fracciones de peso molecular mayor (Castro y Sato, 2014; Liu et al., 2014; O’Keeffe y FitzGerald, 2014).

Tabla 8. Resultados del ensayo FRAP para los péptidos complejados con iones metálicos.

Ion*	Promedio	%DER
Calcio [800 mg/L]	10.94±0.08	0.77
Hierro [20 mg/L]	18.92±0.06	0.34
Magnesio [350 mg/L]	11.70±0.08	0.72

*La complejación se realizó con las mejores condiciones (concentraciones) para cada ion, es decir, en las que se obtuvo mayor retención del ion. Ca(II) 800 mg/L, Fe(II) 20 mg/L y Mg (II) 350 mg/L.

6. Conclusiones

Las fracciones obtenidas mostraron buena capacidad de retención del suero lácteo. De los iones estudiados, el Ca^{2+} y el Fe^{2+} mostraron mejores retenciones en las fracciones de proteínas y péptidos analizadas.

La complejación de los péptidos de bajo peso molecular con los iones Ca^{2+} y Fe^{2+} produce un ligero incremento en la presencia de péptidos de peso molecular mayor. Por otra parte, el complejo con Fe^{2+} favoreció la actividad antioxidante de la fracción proteica.

Los péptidos presentes en el suero lácteo no sólo acarrean Ca^{2+} , sino que se pueden utilizar como quelantes de otros iones de interés, como el Fe^{2+} y el Mg^{2+} , lo que mejora su funcionalidad de estas moléculas de interés biológico.

7. Perspectivas

Entre las perspectivas futuras para el presente proyecto se pretende realizar el estudio termodinámico para evaluar la estabilidad de los complejos formados. Asimismo, es importante realizar la separación y secuenciación de los péptidos que tienen la actividad acarreadora de metales. También, es importante realizar la caracterización completa de los complejos formados, con el fin de plantear el uso tecnológico como aditivo alimentario.

Anexos

1. Preparación de soluciones

Ácido tricloroacético 24%

Se pesó 6 g de CCl_3COOH y se aforó en un matraz volumétrico de 25 mL.

Ácido perclórico 15%

Se midió 3.75 mL de HClO_4 y se aforó en un matraz volumétrico de 25 mL.

Cloruro de calcio 2000 mg/L

Se pesó 0.7336 g de CaCl_2 y se aforó en un matraz volumétrico de 100 mL con agua desionizada.

Buffer fosfatos (0.05M pH 8)

Se pesó 0.096 g de fosfato de potasio, se disolvió en agua desionizada y se aforó en un matraz volumétrico de 100 mL y se ajustó el pH con ácido fosfórico al 5%.

Cloruro ferroso tetrahidratado 100 mg/L

Se pesó 0.0358 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y se aforó en un matraz volumétrico de 100 mL con agua desionizada.

Hidroxilamina 1.4 M (en HCl 2M)

Se pesó 2.432 g de $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, se disolvió con una solución de HCl 2M y se aforó en un matraz volumétrico de 25 mL.

Ferrocina ($\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{NaO}_6\text{S}_2$) 10^{-2} M preparada en acetato de amonio 10^{-1} M

Se pesó 0.123 g de ferrocina y se disolvió en una solución de acetato de amonio 10^{-1} M y se aforó en un matraz volumétrico de 25 mL.

Cloruro de magnesio 1000 mg/L

Se pesó 0.8364 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y se aforó en un matraz volumétrico de 100 mL con agua desionizada.

Gel de poliacrilamida

Para generar el gel de separación se preparó una solución de acrilamida al 16.5%, a partir de una solución stock al 30% de acrilamida y se diluyó con buffer de separación de pH=8.45. Junto con esta solución se adicionaron 160 μL de SDS al 10%. Esta mezcla se desgasificó a vacío en un matraz kitazato de 25 mL por un intervalo de tiempo de 15 min y con agitación magnética suave.

Transcurrido el tiempo, se adicionó al matraz kitazato 35 μL de persulfato de amonio al 10% y 5 μL de trimetil-N-diamina (TEMED) BIORAD®, se agitó de forma manual para incorporar los reactivos y se trasladó rápidamente al equipo de electroforesis, llenando hasta 3/5 partes de los cristales.

Enseguida se agregaron 2 mL de agua desionizada para ayudar en el proceso de compactación del gel durante su polimerización, que duró alrededor de 6 h.

Al término de la polimerización del gel de separación, se procedió a preparar el gel de concentración al 4% de acrilamida a partir de la solución stock al 30%. La solución se preparó con buffer de separación $\text{pH}=8.45$. Se mezcló con 160 μL de SDS y se desgasificó bajo las mismas condiciones que el gel de separación.

Al finalizar el tiempo de desgasificación se añadieron 50 μL de persulfato de amonio al 10% y 5 μL de TEMED, homogenizando manualmente y colocando de forma inmediata sobre el gel de separación al cual se le había eliminado el agua desionizada previamente.

Posteriormente, se colocaron los peines sobre el gel de concentración y se cubrió con papel parafilm, completando la polimerización de ambos geles por 12 h en refrigeración.

Estándar (Polypeptide Standard BIORAD)

Se preparó adicionando 4 μL del mismo junto con 20 μL de buffer TRIS-HCL 0.05M $\text{pH}=6.8$, 20 μL de buffer colorante, 20 μL de agua desionizada y 3 μL de β -mercaptoetanol. El estándar se calentó a baño maría por 5 min a 90°C .

Buffer de separación pH 8.45

Se pesó 9.086 g de TRIS, se aforó en un matraz volumétrico de 25 mL con 0.3% SDS y se ajustó el pH con HCl 6N.

SDS 10%

Se pesó 0.1% de SDS y se disolvió con 1mL de agua desionizada.

Persulfato de amonio 10%

Se pesó 0.1g de persulfato de amonio y se disolvió con 1mL de buffer de separación $\text{pH}=8.45$.

Ácido acético 7.5%

Se midió 15mL de ácido acético y se disolvió con agua desionizada a 200mL.

Azul Comassie G-250

En un matraz Erlenmeyer de 1L se colocó 500mL de agua desionizada, 450mL de alcohol etílico 96%, 50mL de ácido acético glacial y 2.5g de azul de Comassie G-250, se mezclaron y se dejaron en agitación durante 12 hrs., posteriormente se filtra la solución para poder ser utilizada.

Ácido acético 7% con metanol 10%

Se midió 7mL de ácido acético se disolvió con agua desionizada y se mezcló con 10 mL de metanol, posteriormente la mezcla se ajustó a 100mL con agua desionizada.

Buffer acetatos 300mM a pH 3.6

Se pesó 0.1668 g de acetato de sodio y se tomó un volumen de 1.7102 mL de ácido acético, se mezclaron y se aforo en un matraz volumétrico de 100 mL con agua desionizada. Posteriormente se ajustó el pH hasta llegar a pH 3.6.

Reactivo FRAP

Se mezclaron 50mL de buffer acetatos pH=3.6, por cada 5mL de FeCl₃ 20mM y 5mL de TPTZ 10mM.

2. Curva de calibración del calcio (II)

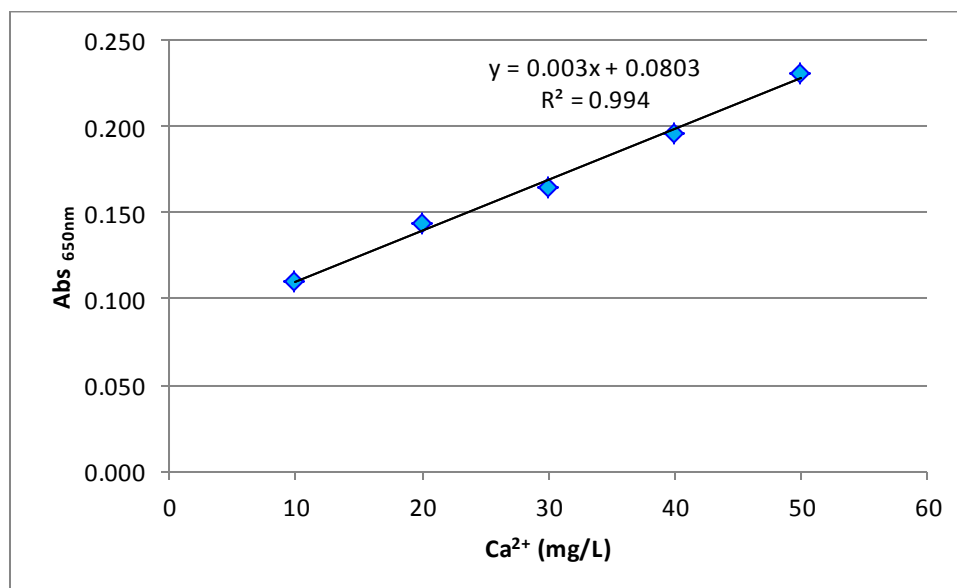


Figura 9. Curva de calibración del calcio (II).

3. Curva de calibración del hierro (II)

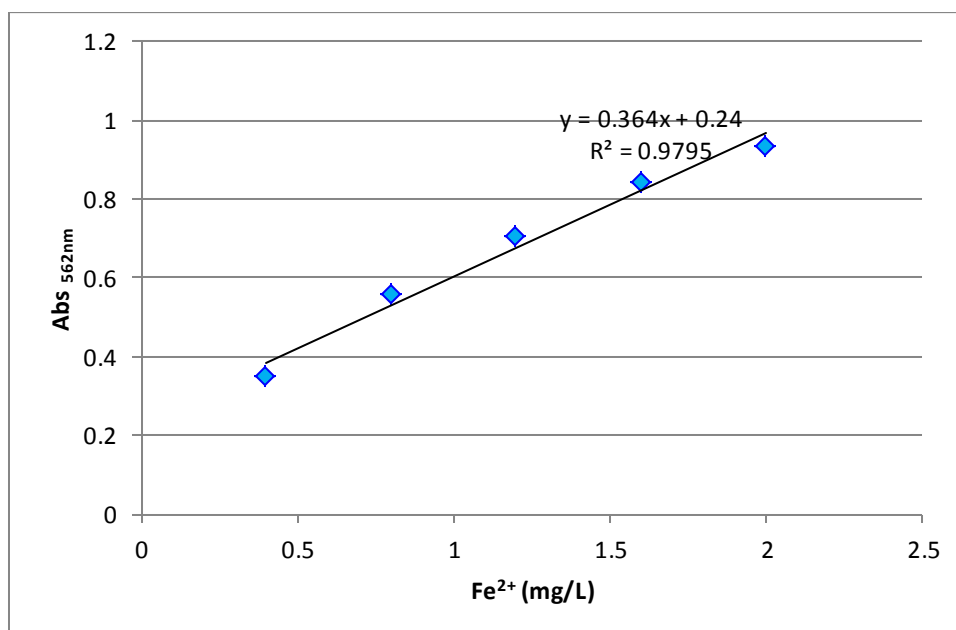


Figura 10. Curva de calibración del hierro (II).

4. Curva de calibración del magnesio (II)

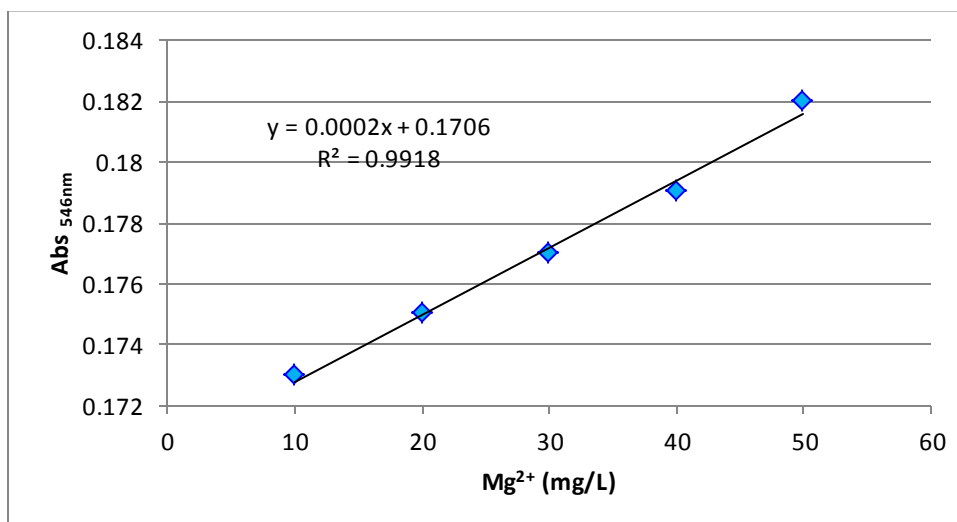


Figura 11. Curva de calibración del magnesio (II).

5. Curva de calibración FRAP

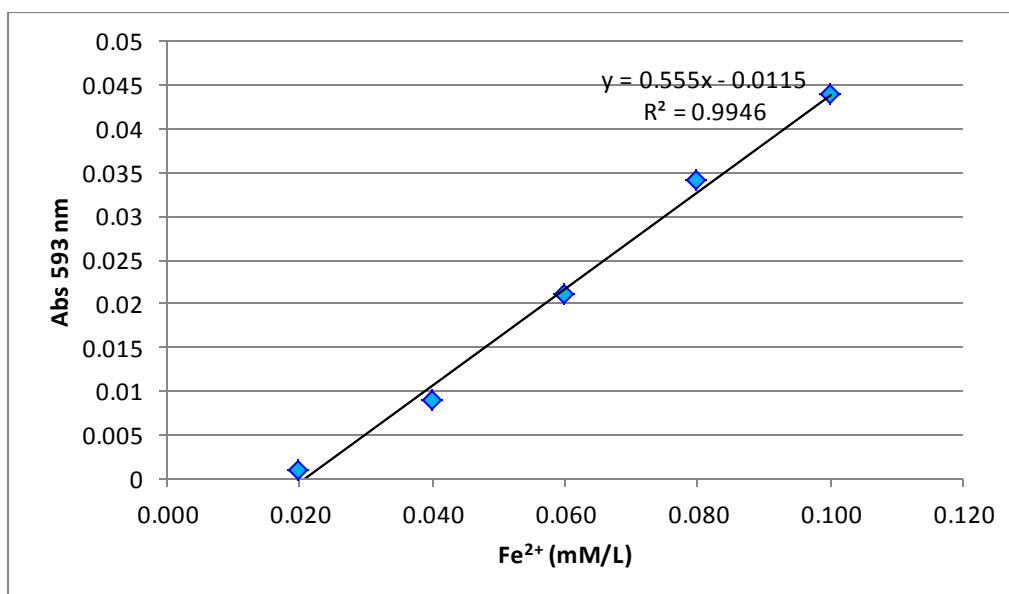


Figura 12. Curva de calibración del ensayo FRAP.

Referencias

- Aimutis W.R. (2004). Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticarcinogenesis. *Journal of Nutrition* 134, 989-995.
- Alvarado, C.C., & Guerra, M. (2010). Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *Anales Venezolanos de Nutrición* 23, 42-49.
- Álvarez, M.M.C (2013). Caracterización fisicoquímica de los diferentes tipos lactosueros producidos en la Cooperativa Colanta LTDA. Corporación Universitaria Lasallista.
- Amador, V.J.M., Andreu, G.A.A., Arredondo, M.C.A., Rendón, C.C.A., Barrera, B.E. & Jiménez, A.C. (2019). Estandarización de una bebida deslactosada a base de suero dulce de leche saborizado con pulpa de mora. *Encuentro Sennova del Oriente Antioqueño* 1, 33-44
- Amorós, L., Amaya, E., Errico, M., Lambertucci, M., Miers, J., Mogro, E., Quispe, L., Recalt, M. & Tocho, E. (2013). Bioquímica I.
- Artica, M.L. (2014). Métodos para el análisis fisicoquímico de la leche y derivados lácteos. 2da Edición. Ed. TEIA: Perú. pp. 21-33
- Barbosa, R.S., Fischer, V., Ribeiro, M.E.R., Zanela, M.B., Stumpf, M.T., Kolling, G.J., Júnior, J.S., Barros, L.E. & Egipto, A.S. 2012. Electrophoretic characterization of proteins and milk stability of cows submitted to feeding restriction. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 47, 621-628.
- Baro, L., J. Jiménez, A. Martínez & J. Bouza. (2001). Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *Pharmaceutica* 42, 135-145.
- Bauman, D., Mather, I., Wall, R., & Lock, A. (2006). Major advances associated with the biosynthesis of milk. *Journal of Dairy Science* 89, 1235-1243.
- Brandelli, A., Joner, D.D., & Folmer, C.A.P. (2015). Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Research International* 73, 149-161.

- Brown, M. & Rydqvist, B. (1981). Arsenazo III-Ca²⁺. Effect of pH, ionic strength and arsenazo III concentration on equilibrium binding evaluated with Ca²⁺ ion-sensitive electrodes and absorbance measurements. *Biophysical Journal* 36, 117-137.
- Callejas, H.J., Prieto, G.F., Reyes, C.V.E., Marmolejo, S.Y. & Méndez, M.M.A. (2012). Caracterización fisicoquímica de un lactosuero: potencialidad de recuperación de fosforo. *Acta Universitaria* 22, 11-18.
- Caetano, S.M.E., Bertoldo, P.M.T., Paes, L.A.F., & Netto, F.M. (2015). Iron-binding peptides from whey protein hydrolysates: Evaluation, isolation and sequencing by LC-MS/MS. *Food Research International* 71, 132-139.
- Cao, Y., Miao, J., Liu, G., Luo, Z., Xia, Z., Liu, F. & Xiao, H. (2017). Bioactive peptides isolated from casein phosphopeptides enhance calcium and magnesium uptake in caco-2 cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, 2307-2314.
- Carbajal, A. A. (2017). Manual de Nutrición y Dietética. Departamento de Nutrición. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- Castro, R.J.S. & Sato, H.H. (2014). Advantages of an acid protease from *Aspergillus oryzae* over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3, 58-65.
- Considine, T., Patel, H.A., Anema, S.G., Singh, H., & Creamer, L.K. (2007). Interaccion of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments-a review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8, 1-23.
- Corrochano, A. R., Buckin, V., Kelly, P. M., & Giblin, L. (2018). Invited review: Whey proteins as antioxidants and promoters of cellular antioxidant pathways. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 4747-4761. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13618>

- Dalgleish, D.G. & Corredig, M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology* 3, 449-467.
- Farell, H.M., Jimenez, F.R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., Hicks, C.L., Hollar, C.M., Ng-Kwai-Hang, K.F., & Swaisgood, H.E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows milk-sixth revision. *Journal of Dairy Science* 87, 1641-164.
- Farell, H.M., Malin, E.L., Brown, E.M., & Qi, P.X. (2006). Casein micelle structure: what can be learned from milk synthesis and structural biology? *Current Opinion in Colloid Interface Science* 11, 135-147.
- Fernández, F.E., Martínez, H.J.A., Martínez, S.V., Moreno, V.J.M., Collado, Y.L.R., Hernández, C.M. & Morán, R.F.J. (2015). Importancia nutricional y metabólica de la leche. *Nutrición Hospitalaria*. 31(1), 92-101.
- Ferrandini, E., Castillo, M., López, M.B., & Laencina, J. (2006). Structural models for the casein micelle. *Anales de Veterinaria de Murcia* 22, 5-18.
- Figuroa, H.C., Cruz, G.A., Rodríguez, S., Gómez, R.L., García, G.M., y Jiménez, G.J. (2012). Producción de péptidos fijadores de calcio y hierro por *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NCFB 712. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11, 259-267.
- Fitzgerald R.J., & Meisel H. (2003). Milk protein hydrolysates and Bioactive peptides. *Advanced Dairy Chemistry*.
- Foegeding, E. & P. Luck. (2002). Whey protein products. *Encyclopedia of Foods Sciences and Nutrition*, 1957-1960.
- Foltz, M., Meynen, E.E., Bianco, V., Van Platerink, C., Koning, T.M. & Kloek, J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from a lactotriptide-enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation. *Journal of Nutrition* 137, 953-958.
- Forrellat, B.M., Défaix, G.H.G. & Fernández, D.N. (2000). Metabolismo del hierro. *Instituto de Hematología e Inmunología* 16, 149-160.

- Fox, P.F. (2003). Milk Proteins: general and historical aspects. *Advanced Dairy Chemistry*.
- Fox, P.F. & Kelly, A.L. (2004). The casein. *Proteins in Food Processing*.
- Galindo, L., Valbuena, E. & Rojas, E. (2006). Estandarización de la detección del glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración de leche. *FCV-LUZ* 16(3), 308-314.
- García, G.A. (2006). Ingesta de nutrientes: Conceptos y recomendaciones internacionales. *Nutrición Hospitalaria* 21, 291-299.
- García, G.A., Castellá, S.M. & Calleja, F.A. (2017). Ingesta de energía y nutrientes recomendadas en la Unión Europea: 2008-2016. *Nutrición Hospitalaria* 34(2).
- García, G.M., Quintero, R.R. & López, M.C.A. (2004). Biotecnología alimentaria. Ed. Limusa. México, D.F.
- Guéguen, L., & Pointillart, A. (2000). The bioavailability of dietary calcium. *Journal of the American College of Nutrition* 19, 119-136.
- Guerrero, J.R., Ramírez, A.L., & Puente, W. (2011). Caracterización del suero de queso blanco del combinado lácteo Santiago. *Tecnología Química* 31, 93-100.
- Hernández, L.B. (2002). Caracterización y bioactividad de péptidos obtenidos a partir de proteínas lácteas mediante hidrólisis enzimática y procesos fermentativos. Universidad Complutense de Madrid.
- Horne, D.S. (2006). Casein micelle structure: models and muddles. *Current Opinion in Colloid Interface Science* 11, 148-153.
- Hwang, J., Shue, Y., & Chang, H. (2001). Antioxidant activity of roasted and defatted peanut kernels. *Food Research International* 34, 639-647.
- Jelen, P. (2002). Whey processing. Utilization and Products. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2739-2745.

- Jovanovic, S., Barac., M., & Macej, O. (2015). Whey proteins-properties and possibility of application. *Mljekarstvo* 53, 215-233.
- Kibangou, I. B., Bouhallab, S., Henry, G., Bureau, F., Allouche, S., Blais, A., Guérin, P., Arhan, P., & Bouglé D. L. (2005). Milk proteins and iron absorption: Contrasting effects of different caseinophosphopeptides. *Pediatric Research* 58, 731-734.
- Kilara, A. & Panyam, D. (2003). Peptides from milk proteins and their properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43, 607-633.
- Kira, A. (2004). Whey proteins. *Proteins in food processing*, 72-99.
- Kitts, D.D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design* 9, 1309-1323.
- Lee, S.H., & Song, K.B. (2009). Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein. *Process Biochemistry* 44, 378-381.
- Liu, J., Wang, X., & Zhao, Z. (2014). Effect of whey protein hydrolysates with different molecular weight on fatigue induced by swimming exercise in mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94, 126-130.
- Londoño, M., J. Sepúlveda, A. Hernández & J. Parra. (2008). Bebida fermentada de suero de queso fresco inoculada con *Lactobacillus casei*. *Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín* 61, 4409-4421.
- Marshall, K. (2004). Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review* 9, 136-156.
- Meisel, H. (2001). Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers. *The Australian Journal of Dairy Technology* 56, 83-92.

- Miao, J., Liao, W., Pan, Z., Wang, Q., Duan, S., Xiao, S., Yang, Z., & Cao, Y. (2019). Isolation and identification of iron-chelating peptides from casein hydrolysates. *Food & Function* 10, 2372-2381.
- Muñi, A., G. Paez, J. Farías, J. Ferrer y E. Ramones. (2005). Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero. *Revista Científica* 15, 361-367.
- O'Keeffe, M. B. & FitzGerald, R.J. (2014). Antioxidant effects of enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate on cultured human endothelial cells. *International Dairy Journal* 36, 128-135.
- Onwulata, C., & Huth, P. (2008). Whey proteins and peptides in human health. *Whey Processing, Functionality and Health Benefits* 1, 285-343.
- Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi D., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry* 105, 1-14.
- Parra, R.A. (2009). Lactosuero: Importancia en la industria de alimentos. *Revista de la Facultad Nacional de Agricultura de Medellín* 62, 4967-4982.
- Pérez, V.L. & Martínez, A.C.O. (2011). Manual para la elaboración de productos derivados de la leche con valor agregado. Ed. Cedele: Sinaloa, México.
- Peso, E.P., Gonzáles, B.C.A., Vasallo, M.M.I., Santaella, P.M., Ros, B.G.F. Frontela, S.M.C. & Martínez., G.M.C. (2012). α -lactoalbúmina as an ingredient of infant formula. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 6, 6-14.
- Pintado, V. & Pamela, J. (2012). Elaboración de manjar utilizando suero de quesería a diferentes niveles como sustituto de la leche en el cantón Pastaza. Universidad Estatal Amazónica. Ecuador.
- Poveda, E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista Chilena de Nutrición* 40, 397-403.
- Reinhardt, T.A. & Lippolis, J.D. (2006). Bovine milk fat globule membrane proteome. *Journal of Dairy Research* 73, 406-416.

- Roca, P., Oliver, J. & Rodríguez, M.A. (2003). Bioquímica: técnicas y métodos. Ed. Hélice. Madrid. pp. 250.
- Schlimme, E. & Buchheim, W. (2002). Proteínas lácteas: caseínas, proteínas del suero y proteínas minoritarias en la leche y sus componentes. Propiedades químicas y físicas. Ed. Acribia. Zaragoza, pp. 33-75.
- Smacchi, E., & Gobbetti, M., (2000). Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology* 17, 129-141.
- Storcksdieck, S., Bonsmann, G., & Hurrell, R. F. (2007). Iron-binding properties, amino acid composition, and structure of muscle tissue peptides from in vitro digestion of different meat sources. *Journal of Food Science* 72, S019-S029.
- Swaigood, H.E. (2003). Protein composition of milk: identification, structure and chemical composition. *Springer Science* 3, 140-225.
- Teschemacher, H. (2003). Opioid receptor ligands derived from food proteins. *Current Pharmaceutical Desing* 9, 1331-1344.
- Thankachan, P., Walczyk, T., Muthayya, S., Kurpad, A. V., & Hurrell, R. F. (2008). Iron absorption in young Indian women: the interaction of iron status with the influence of tea and ascorbic acid. *The American Journal of Clinical Nutrition* 87, 881-886.
- Torres, L.M., Vallejo, C.B., & González, C.A. (2005). Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 55, 111-117.
- Vegarud, G. E., Langsrud, T., & Svenning C. (2000). Mineral-binding milk proteins and peptides: occurrence, biochemical and technological characteristics. *British Journal of Nutrition* 84, S91-S98.
- Wakabayashi, H., Yamauchi, K. & Takase, M. (2006). Lactoferrin research, technology and application. *International Dairy Journal* 16, 1241-1251.
- Young, W. & Park, P.D. (2009). Bioactive components in milk and dairy products. *Wiley*, 5.

- Zhao, L., Huang, Q., Huang, S., Lin, J., Wang, S., Huang, Y., Hong, J., & Rao, P. (2014). Novel peptide with a specific calcium-binding capacity from whey protein hydrolysate and the possible chelating mode. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 274–282.
- Zhao, L., Huang, S., Cai, X., Hong, J., & Wang, S. (2014). A specific peptide with calcium chelating capacity isolated from whey protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods* 10, 46–53.
- Zhu, K.X., Wang, X.P., & Guo, X.N. (2015). Isolation and characterization of zinc-chelating peptides from wheat germ protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods* 12, 23–32.