

EL CASEINOMACROPÉPTIDO QUE SE OBTIENE DEL DESECHO DE LA QUESERÍA PODRÍA PREVENIR LA DEFICIENCIA DE CALCIO

Loria, Karina G.^{1,2*}; Pilosof, Ana M.R.^{3,4} y Farías, María E.^{2,3,5}

¹ Becaria de Estudio de la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires.

² Departamento de Tecnología, Universidad Nacional de Luján, Rutas 5 y 7 (6700), Luján, Argentina.

³ Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina.

⁴ ITAPROQ-CONICET. Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina.

⁵ Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC).

e-mail: efarias@unlu.edu.ar

Resumen

La población mundial presenta una grave deficiencia en calcio e incrementar la ingesta en la población y biodisponibilidad del calcio en los alimentos es fundamental. Dada la abundancia de los subproductos de quesería, este trabajo plantea al péptido bioactivo caseinomacropéptido como un ingrediente funcional con alto valor agregado. El propósito de este trabajo fue evaluar la capacidad ligante de calcio del CMP a través de la utilización de un electrodo selectivo a condiciones de pH comunes en el medio intestinal. Asimismo, investigar el posible modo de interacción del CMP con calcio a través de espectros de absorción en el infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR). Los resultados obtenidos permitieron concluir que, en condiciones de bajo calcio libre (sitio de alta afinidad) un mol de CMP une 1 mol de calcio, independientemente del pH. Este sitio estaría relacionado con el grupo fosfato del residuo de Ser 44. En las condiciones de alto calcio libre (sitios de baja afinidad), el CMP une más moles de calcio al aumentar el pH de 7 a 9, con un valor mínimo de 7 moles a pH 7 y máximo de 12 moles a pH 9, por mol de CMP. Los espectros FTIR confirmaron que los grupos carboxílicos de los residuos de glutamato y aspartato estarían involucrados en la unión del calcio de la forma bidentada.

Introducción

El suero lácteo es considerado un desecho altamente contaminante para el medio ambiente debido a su elevada carga orgánica. Según el Código Alimentario Argentino (CAA, 2016), “se entiende por suero de lechería a los líquidos formados por parte de los

componentes de la leche, que resultan de diversos procesos de elaboración de productos lácteos”. Es la fracción de la leche que no precipita por la acción del cuajo o los ácidos y está compuesta por proteínas solubles, lactosa, vitaminas y sales minerales. El suero se clasifica según su procedencia en “dulce”, si proviene de la elaboración de queso y “ácido” si proviene de la coagulación de la leche por ácido para elaborar Ricotta, por ejemplo. Según datos del INTA (Taberna, 2014), cada año en Argentina el 34% de la producción de leche se destina a la elaboración de queso y como resultado de dicha actividad se generan 450 mil toneladas anuales de suero líquido. El destino del suero obtenido se puede dividir en 5% para la producción de suero en polvo, el 33% a elaboración de derivados proteicos y a la obtención de lactosa, y el resto (aproximadamente unas 270 mil toneladas) se destina para alimentación animal o se desecha. Actualmente, existe una necesidad de conversión del suero de queso en productos de valor agregado debido fundamentalmente a la disminución de su impacto ambiental, al aprovechamiento de los nutrientes que el suero posee, a la necesidad de satisfacer la demanda de sus subproductos y aportar al desarrollo regional y nacional. Lo más interesante que se plantea hoy es que cada uno de los péptidos y proteínas del suero es más valioso por separado que como suero seco. El suero dulce contiene aproximadamente 50% de β -lactoglobulina, 15% de α -lactalbúmina, 20% de caseinomacropéptido (CMP) y pequeñas cantidades de seroalbúmina bovina, lactoferrina e inmunoglobulinas. El CMP presenta valiosas propiedades bioactivas que lo hacen un ingrediente particularmente útil para aumentar la calidad de diversos productos alimenticios (Tolkach & Kulozik, 2005).

El calcio es un mineral esencial para la correcta salud ósea, ya que su depósito se realiza principalmente en los huesos y dientes que depende de varios factores como la ingesta dietética, la absorción intestinal, la excreción renal y el remodelamiento óseo. El requerimiento de calcio está afectado por diversos factores como edad, sexo, embarazo, lactancia o enfermedades como la insuficiencia renal, por ejemplo. En Argentina, el requerimiento recomendado de calcio para la edad entre los 19 y 50 años es de 1000 mg por día (FAO, 2001). El calcio que está presente en los alimentos que ingerimos se encuentra en forma de sales o combinado con otros nutrientes y necesita de la presencia del HCl del estómago para ser ionizado a Ca^{2+} soluble. El 90% de la absorción del calcio tiene lugar en el intestino delgado (Wasserman, 2004) a través de su forma ionizada (Ca^{2+}) o unido a una molécula orgánica soluble (Gueguen & Pointillart, 2000). Pero el nivel de absorción de calcio en el intestino es bajo, por varios factores: principalmente porque el calcio interacciona con los demás componentes de la dieta formando complejos

insolubles, porque es difícil la absorción de cationes divalentes (como el calcio o el magnesio) por la mucosa intestinal y porque las sales de calcio en las condiciones del intestino (pH 7 a 8,5) son insolubles (Eckert, Bamdad & Chen, 2014).

La potencialidad de los péptidos para unir metales está asociada a la secuencia de aminoácidos y a su peso molecular. Para incrementar la ingesta y biodisponibilidad del calcio en la población es importante analizar la afinidad del CMP por el calcio, dando especial importancia a su alta abundancia por ser un subproducto de la industria. Se pueden observar variaciones en las posiciones de los picos de los carboxilatos y amidas en los espectros de absorción FTIR cuando un metal interactúa con los residuos de aminoácidos de un péptido (Peng, Hou, Zhang & Li, 2017). En la literatura fue descrito por primera vez el espectro de absorción FTIR del CMP por Burgardt, Züge, de Bonna Sartor, Waszczyński, Silveira & Haminiuk (2015), sin embargo no se ha explorado aún su interacción con el calcio.

El propósito de este trabajo fue evaluar la capacidad ligante de calcio del CMP a través de la utilización de un electrodo selectivo a condiciones de pH comunes en el medio intestinal. Asimismo, investigar el posible modo de interacción del CMP con calcio. Estos resultados tendrían mucha significancia en la utilización de este péptido bioactivo, valorizando así aún más el suero de queso.

Materiales y Métodos

Se utilizó caseinomacropéptido, BioPURE-GMP® de DaviscoFoods International (USA). Su composición (base seca) fue (AOAC, 1984): $79,9 \pm 2,7\%$ de proteínas (N x 7,07, método de Kjeldahl), $6,16 \pm 0,01\%$ de cenizas y $7,78 \pm 0,01\%$ de humedad. El contenido de grasa fue despreciable (método de Soxhlet). El porcentaje de los carbohidratos fue 6,1% y se obtuvo por diferencia entre 100 y la suma de los otros componentes. Los minerales fueron determinados mediante espectrometría de absorción atómica previa calcinación en mufla a 500 °C con un espectrómetro Analyst 200 Perkin Elmer (USA). La composición de minerales fue la siguiente (100 g de muestra): 950 mg de Na; 125 mg de K y 682 mg de Ca. Se utilizó CaCl₂ anhidro (Merck, Alemania). El agua utilizada fue Milli-Q ($2,3 \pm 0,1 \mu\text{S/cm}$). Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente.

Determinación de calcio libre

El calcio ligado se determinó por el método de Berrocal et al. (1989). Se titularon 50 mL de una solución de 2 g/L de CMP en agua ultrapura a la cual se le adicionó 0,705

mL de 3,5 M KCl para ajustar la fuerza iónica. Los ensayos se realizaron por triplicado. La calibración del electrodo se realizó paralelamente a las titulaciones en agua ultrapura la misma condición de pH y fuerza iónica. Para el tratamiento de los datos se verificó que la respuesta del electrodo sea lineal. El calcio libre se midió con electrodo de ión selectivo modelo HI4104 conectado a un pHmetro modelo HI98191 (Hanna Instruments, USA) después de la adición sucesiva de 50 μ L de CaCl_2 0,2 M a la solución. El volumen máximo agregado fue de 2 mL. El calcio ligado se obtuvo restando al calcio total presente en la solución, el calcio libre determinado (*Caf*). El pH se mantuvo en todo momento a 7, 8 y 9 con el agregado de NaOH de alta normalidad. Los valores de pH (7, 8 y 9) fueron seleccionados por favorecer la unión de calcio tanto a los grupos fosfatos como carboxilatos (Mekmene & Gaucheron, 2011). Los ensayos se realizaron por cuadruplicado.

Tratamiento de los datos experimentales

La constante de asociación aparente y el número de sitios unidos al calcio se determinaron a través de un ajuste de los datos experimentales a un modelo teórico (Berrocal et al., 1989). El calcio unido por mg de CMP (*r*) fue obtenido dividiendo la concentración de calcio unido (mM) por la concentración de CMP. Los datos obtenidos fueron representados en una gráfica de Klotz (Lee, Veis & Glonek, 1977) para obtener la constante de asociación aparente (K_{ap}) y el máximo calcio unido por mg de CMP (n_i).

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{n_i K_{ap} Caf} + \frac{1}{n_i} \quad (1)$$

Se consideró que un mol de CMP tiene una masa molecular promedio de 7500 Da.

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPadPrims v7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Preparación de espectros de FTIR

Se prepararon soluciones de CMP al 20% con 0,024 M de CaCl_2 (relación $1,2 \cdot 10^{-3}$ moles de Ca^{2+} /g CMP obtenida en trabajos previos como óptima), ambas a pH 7,0. Se utilizó 1 mg de cada una de las muestras liofilizadas (CMP y CMP-Ca) con aproximadamente 100 mg de KBr. Los espectros de absorción con transformadas de Fourier (FTIR) se realizaron en un equipo Affinity-1S IR (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Cada pico fue calculado por el software LabSolution IR.

Resultados

La **Figura 1** muestra los gráficos de Klotz obtenidos al graficar el calcio unido vs calcio libre según la **Ecuación 1**. El ajuste de los datos fue realizado con diferentes rectas, evidenciando sitios de unión no definidos en la molécula de CMP (Berrocal et al., 1989). Los ajustes de las curvas fueron altos (superiores a 0,917). Las constantes obtenidas del ajuste matemático de los datos en la condición de bajo calcio libre (altos valores de 1/Caf) están mostrados en la **Tabla 1**.

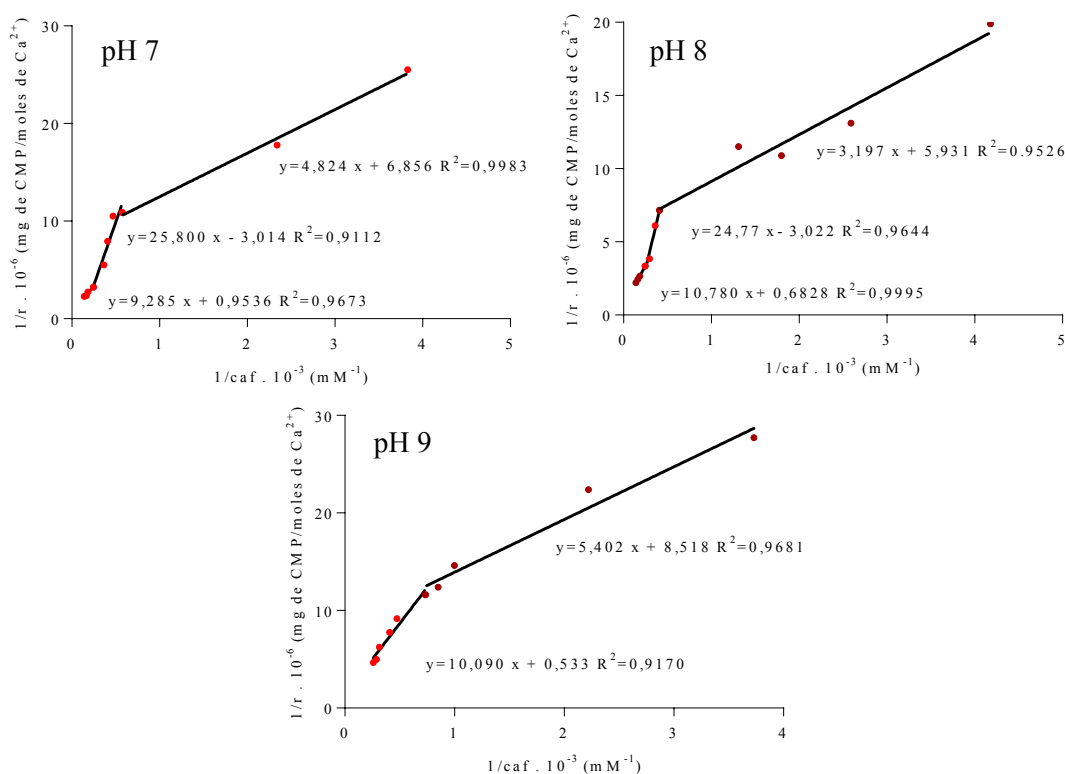


Figura 1: Gráficos de Klotz para CMP a pH 7,0; 8,0 y 9,0 con una fuerza iónica de 0,05 M de KCl

Tabla 1: Constantes de asociación aparente y máximo calcio unido por mol de CMP en condiciones de bajo calcio libre. Se asumió una masa molecular para el CMP de 7500 Da.

pH	7	8	9
$K_{ap} (M^{-1})$	2040 ± 300^a	1840 ± 460^a	1650 ± 50^a
(moles de Ca^{2+} / n_i /mol de CMP)	$1,3 \pm 0,5^a$	$1,0 \pm 0,2^a$	$1,1 \pm 0,3^a$

La cantidad obtenida de calcio unido fue independiente del pH, siendo este valor cercano a 1 mol de Ca^{2+} por mol de CMP, que correspondería a un sitio de alta afinidad con el calcio, relacionado con el contenido de fósforo de la molécula (Berrocal et al., 1989). En el caso del CMP, el residuo de Ser en posición 44 se encuentra siempre fosforilado (Mercier & Gaye, 1982).

Tabla 2: Constantes de asociación aparente y máximo calcio unido por mol de CMP en condiciones de alto calcio libre. Se asumió una masa molecular para el CMP de 7500 Da.

pH	7	8	9
K_{ap} (M^{-1})	133 ± 30^a	63 ± 1^b	40 ± 13^b
n_i (moles de Ca^{2+} /mol de CMP)	$7,3 \pm 1,2^b$	$11,1 \pm 0,1^{a,b}$	$12,0 \pm 2,3^a$

En las zonas intermedias (entre baja y alta concentración de calcio libre), el modelo matemático planteado no tuvo sentido mostrando una ordenada al origen negativa (Figura 1 pH 7 y 8). En condiciones de alto calcio libre (bajo $1/\text{Ca}^2$), se encontró que la cantidad máxima de calcio unido aumentó con el crecimiento del pH desde 7 a 12 (Tabla 2). La dependencia con el pH del número de calcio unido también fue encontrada por Ellegård, Gammegård-Larsen, Sørensen & Fedosov (1999) para caseinofosfopéptidos. La K_{ap} disminuyó con el pH desde 133 (pH 7) a 40 M^{-1} (pH 9). Estos valores fueron inferiores a aquellos encontrados en la bibliografía para caseinofosfopéptidos. Mekmene & Gaucheron (2011) determinaron una K_{ap} de 191 M^{-1} y Berrocal et al. (1989) una K_{ap} de 189 M^{-1} para caseinofosfopéptidos de aproximadamente 2000 Da.

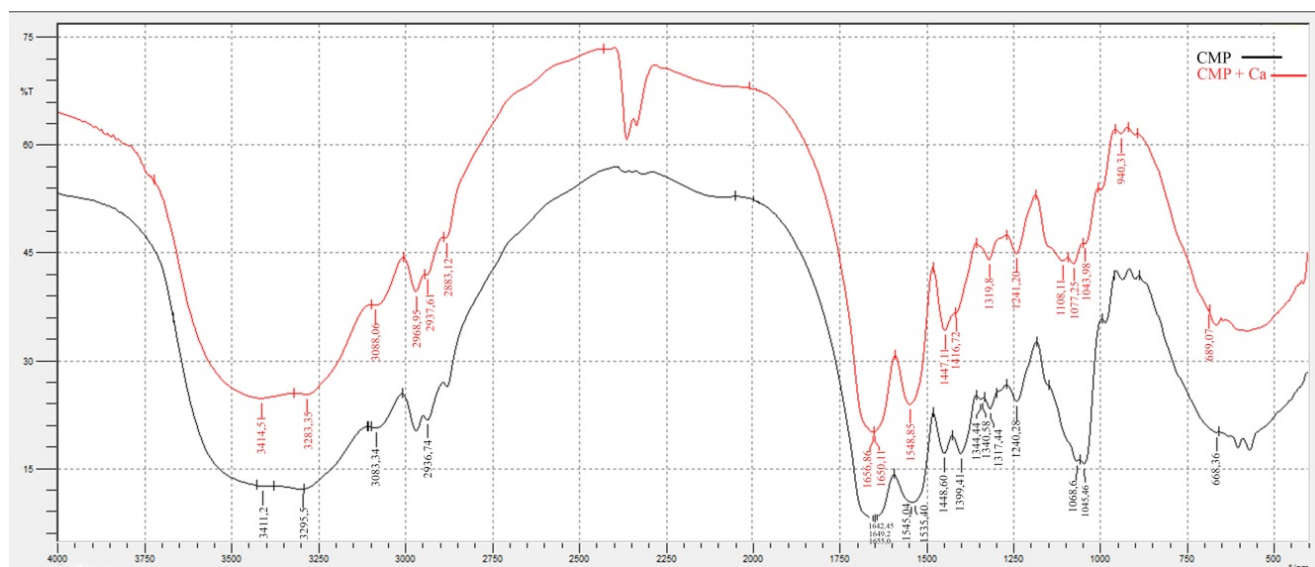


Figura 2. Espectro FTIR de CMP (negro) y CMP-Ca (rojo) entre longitudes de onda desde 4000 a 400 cm^{-1} .

Los espectros FTIR están conformados por dos porciones: una rica en grupos funcionales (4000-1300 cm^{-1}) y otra “fingerprint” que comprende longitudes de onda entre 1300 y 600 cm^{-1} . La región de grupos funcionales se usa para identificar tipo y cambio de los grupos y la “fingerprint” denota las características y estructura de las moléculas. Los espectros FTIR de CMP y CMP-Ca se muestran en la **Figura 2**. El espectro FTIR del CMP fue similar al obtenido por Burgardt et al. (2015), como era de esperar porque los grupos químicos básicos son los mismos. Cuando los iones metálicos se combinan con átomos ligandos (O; N y S), los típicos picos del espectro infrarrojo cambian debido a la vibración de las uniones coordinadas (Wang, Ding, Zhang, Li, Wang, Luo, Li, Li & Chen, 2018). El espectro del CMP mostró un solapamiento de las bandas correspondientes a los estiramientos –OH y a las amidas A en la región comprendida entre 3400 y 3300 cm^{-1} . La banda de absorción a 3295 cm^{-1} del CMP se desplazó hacia menores frecuencias en el espectro CMP-Ca (3284 cm^{-1}) esto sería indicativo de la participación de grupos NH en la formación de puentes hidrógeno luego de la quelación (Peng et al., 2017).

La absorción de las bandas 1655 y 1535 cm^{-1} pueden atribuirse a las vibraciones de amida I (C=O, 1690-1630 cm^{-1}) y II (N-H y C-N, 1655-1590 cm^{-1}), respectivamente (Peng et al., 2017). En el espectro CMP-Ca, estas bandas se desplazan hacia 1650 y 1548 cm^{-1} . Según Wang, Gao, Chen, Zhang, Li & Chen (2017) un pico a 1550 cm^{-1} correspondería al C=O. El pico observado a 1399 cm^{-1} se desplazó a frecuencias más altas 1416 cm^{-1} , este efecto puede ser atribuido a la extensión de los grupos –COO⁻ que se combinan con Ca²⁺ para formar COO-Ca (Byler & Farrell, 1989; Wang et al., 2017). Según Nara, Morii & Tanokura (2013), hay cuatro posibles formas de coordinación para un metal divalente: unidentada (cuando el ión metálico interactúa con solamente un oxígeno del grupo carboxílico), bidentada o quelada (cuando el ión metálico interactúa con los dos oxígenos del grupo carboxílico), modo “puente” (cuando un ión metálico se une a uno de los oxígenos del grupo carboxílico y otro ión metálico se une al otro oxígeno) y modo “pseudopuente” (cuando una molécula de agua reemplaza a uno de los ligandos en el modo “puente”). Este tipo de quelación sería bidentada posiblemente porque el carbonilo tiene un par de electrones libre para quelar iones calcio (Wang et al., 2018). Byler & Farrell (1989) estudiaron la interacción del calcio en caseínas y propusieron la unión bidentada según el corrimiento de las bandas de los espectros, de resultados similares a los encontrados para el CMP.

Algunas transformaciones significativas ocurrieron en la zona "fingerprint" del CMP-Ca. La banda de máxima absorbancia del ácido siálico y N-acetilgalactosamina (principales glicósidos del CMP) se encuentran entre 1020 y 1040 cm^{-1} (Lewis, Lewis & Lewis, 2013). El pico de absorción a 1069 cm^{-1} en el espectro del CMP desapareció en CMP-Ca. Además, el pico a 1045 cm^{-1} se desplazó hacia 1044 cm^{-1} en el CMP-Ca. Estos resultados indicarían que los glicósidos también estarían involucrados en la interacción del CMP con calcio, para confirmar los resultados se deberían realizar nuevos estudios.

Los espectros, que difieren en intensidad y longitud de onda de los picos confirman que el CMP quela calcio. Se infiere entonces que los principales sitios de unión del CMP con Ca^{2+} son los residuos carboxílicos que corresponden a los residuos de Asp y Glu, como así también a los grupos glicosilados.

El CMP tiene ocho residuos de Glu correspondientes a las posiciones 13, 24, 32, 35, 42, 46, 49 y 53 y dos residuos de Asp en las posiciones 10 y 43 (Brody, 2000). El ácido siálico se encuentra en el CMP en cantidades variables, aproximadamente el 50% del CMP está glicosilado (Thöma-Worringer, Siegert & Kulozik, 2007), y se encuentra entre un 5 y 11% en peso del total de CMP, dependiendo del origen y modo de obtención del CMP (Fernando & Woonton, 2010). La masa molecular del ácido siálico es 309 g/mol, por consiguiente, se puede estimar que un mol de CMP contiene entre 1,2 y 2,7 moles de ácido siálico. Según Jaques, Brown, Barrett, Brey & Weltner (1977), el complejo formado por la unión entre siálico y calcio es 1:1. Los resultados obtenidos confirman que los grupos carboxilados (residuos de glutamato y aspártico) están involucrados en la interacción Ca^{2+} y el CMP, además del ácido siálico (Jaques et al., 1977) y el residuo fosforilado.

Conclusiones

Se concluye que en condiciones de bajo calcio libre (sitio de alta afinidad) un mol de CMP une 1 mol de calcio, independientemente del pH. Este sitio estaría relacionado con el grupo fosfato del residuo de Ser 44. En las condiciones de alto calcio libre (sitio de baja afinidad), el CMP une más moles de calcio al aumentar el pH de 7 a 9, con un valor mínimo de 7 moles a pH 7 y máximo de 12 moles a pH 9, por mol de CMP. Los espectros FTIR confirmaron que los grupos carboxílicos de los residuos de glutamato y aspartato estarían involucrados en la unión del calcio de la forma bidentada.

Agradecimientos

Al Departamento de Tecnología de la Universidad Nacional de Luján, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina (Proyecto PICT-2014-1402), a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) y al ITAPROQ-CONICET.

Bibliografía:

- Berrocal, R., Chanton, S., Juillerat, M.A., Favillare, B., Scherz, J.-C., Jost, R., 1989. Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium. *Journal of Dairy Research* 56, 335-341.
- Burgardt, V.C.F., Züge, L.C.B., de Bonna Sartor, G., Waszczynskyj, N., Silveira, J.L.M., Haminiuk, C.W.I., 2015. The addition of carboxymethylcellulose in caseinomacropeptide acid gels: Rheological, optical and microstructural characteristics. *Food Hydrocolloids* 49, 11-17.
- Byler, D.M., Farrell, H.M., Jr., 1989. Infrared Spectroscopic Evidence for Calcium Ion Interaction with Carboxylate Groups of Casein. *Journal of Dairy Science* 72, 1719-1723.
- CAA, 2016. "Código Alimentario Argentino http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp."
- Eckert, E., Bamdad, F., Chen, L., 2014. Metal solubility enhancing peptides derived from barley protein. *Food Chemistry* 159, 498-506.
- Ellegård, K.H., Gammelgård-Larsen, C., Sørensen, E.S., Fedosov, S., 1999. Process scale chromatographic isolation, characterization and identification of tryptic bioactive casein phosphopeptides. *International Dairy Journal* 9, 639-652.
- FAO, 2001. Human Vitamin and Mineral Requirements, Report 07a. Joint FAO/OMS Expert Consultation. Bangkok, Thailand,.
- Fernando, S.F., Woonton, B.W., 2010. Quantitation of N-acetylneuraminic (sialic) acid in bovine glycomacropeptide (GMP). *Journal of Food Composition and Analysis* 23, 359-366.
- Gueguen, L., Pointillart, A., 2000. The bioavailability of dietary calcium. *Journal of the American College of Nutrition* 19, 119S-136S.
- Jaques, L.W., Brown, E.B., Barrett, J.M., Brey, W.S., Weltner, W., 1977. Sialic Acid: A calcium-binding carbohydrate. *The Journal of Biological Chemistry* 252, Nº 13, 4533-4538.
- Lee, S.L., Veis, A., Glonek, T., 1977. Dentin phosphoprotein: an extracellular calcium-binding protein. *Biochemistry* 16, 2971-2979.
- Lewis, S.P., Lewis, A.T., Lewis, P.D., 2013. Prediction of glycoprotein secondary structure using ATR-FTIR. *Vibrational Spectroscopy* 69, 21-29.
- Mekmene, O., Gaucheron, F., 2011. Determination of calcium-binding constants of caseins, phosphoserine, citrate and pyrophosphate: A modelling approach using free calcium measurement. *Food Chemistry* 127, 676-682.
- Mercier, J.C., Gaye, P., 1982. Early Events in Secretion of Main Milk Proteins: Occurrence of Precursors. *Journal of Dairy Science* 65, 299-316.
- Peng, Z., Hou, H., Zhang, K., Li, B., 2017. Effect of calcium-binding peptide from Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) bone on calcium bioavailability in rats. *Food Chemistry* 221, 373-378.
- Taberna, M.Á., 2014. "Lactosuero: de desecho industrial a producto con valor agregado. <http://inta.gov.ar/noticias/lactosuero-de-desecho-industrial-a-producto-con-valor-agregado>."
- Thöma-Worringer, C., Siegert, N., Kulozik, U., 2007. Foaming properties of caseinomacropeptide - II. Impact of pH and ionic strength. 62, 253-255.

Tolkach, A., Kulozik, U., 2005. Fractionation of whey proteins and caseinomacropeptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. *Journal of Food Engineering* 67, 13-20.

Wang, L., Ding, Y., Zhang, X., Li, Y., Wang, R., Luo, X., Li, Y., Li, J., Chen, Z., 2018. Isolation of a novel calcium-binding peptide from wheat germ protein hydrolysates and the prediction for its mechanism of combination. *Food Chemistry* 239, 416-426.

Wang, X., Gao, A., Chen, Y., Zhang, X., Li, S., Chen, Y., 2017. Preparation of cucumber seed peptide-calcium chelate by liquid state fermentation and its characterization. *Food Chemistry* 229, 487-494.

Wasserman, R.H., 2004. Vitamin D and the Dual Processes of Intestinal Calcium Absorption. *The journal of Nutrition* 134, 3137-3139.