

Determinación de condiciones operativas que contribuyen a minimizar la aparición de sabor amargo en hidrolizados de WPC

C.L. Fenoglio; G.A. Sihufe; A.C. Rubiolo y E.J. Mammarella*
INTEC (UNL – CONICET). Santa Fe, Argentina. *ejoma@intec.unl.edu.ar

Trabajo presentado en el Congreso CyTAL 2011, organizado por la Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios en el Centro de Convenciones de la UCA del 19 al 21 de octubre de 2011



En el presente trabajo se estudio el efecto de las condiciones de reacción utilizadas (concentración de sustrato, relación enzima/sustrato, tiempo de incubación, pH y temperatura) sobre el tipo de péptidos producidos a través del estudio de los perfiles cromatográficos de los hidrolizados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Empleando para la hidrólisis enzimática la enzima alcalasa AF 2.4L, se desarrollaron 36 experiencias diferentes acomodadas al azar. El análisis de la distribución de tamaño de los péptidos en los hidrolizados producidos se realizó por RP-HPLC. Como resultado de este estudio, se observó que las condiciones de reacción ejercen una marcada influencia sobre las constantes cinéticas, ya que en los cromatogramas obtenidos no se observaron diferencias sustanciales en el perfil de degradación desarrollado por la enzima, observándose las mayores diferencias en las concentraciones de las distintas fracciones obtenidas. La aparición de picos hidrofóbicos, y por ende el desarrollo de sabor amargo, se vio fuertemente influenciado por la temperatura y el tiempo de reacción. Para el rango de condiciones ensayadas, se propone operar a temperaturas entre 40°C y 50°C; pH entre 8 y 9 y tiempos de 75 a 90 minutos para minimizar este efecto.

Palabras clave: lactoproteínas, suero de quesería, hidrólisis enzimática, RP-HPLC.

Introducción

Las proteínas del lactosuero no constituyen la fracción más abundante, pero si la más interesante en los terrenos económico y nutricional (Jelen, 2003). Esta fracción representa una rica y variada mezcla de proteínas que poseen amplio rango de propiedades químicas, físicas y funcionales, y constituyen alrededor del 20% de las proteínas de la leche de vaca (Baro y col., 2001). Sus principales componentes son la β -lactoglobulina (β -Lg) y la α -lactoalbumina (α -La), las cuales representan aproximadamente un 10% y un 4% de toda la proteína láctea, respectivamente (Hinrichs, 2001). Se encuentra además presencia de lactoferrina, lactoperoxidasa, inmunoglobulinas y glicomacropéptidos (Baro y col., 2001). A su vez, las proteínas del lactosuero constituyen una rica y balanceada fuente de aminoácidos esenciales, cercana al 26% (Ha y Zemel, 2003; Ibrahim y col., 2005), siendo las de más alto valor biológico por su contenido en leucina, triptofano, lisina y aminoácidos azufrados, y no son deficientes en ningún aminoácido.

La alternativa más explorada en los últimos años para la recuperación de estas proteínas ha sido la aplicación de procesos de membrana y su posterior secado en polvo, hallándose en el mercado suero entero deshidratado, suero desmineralizado, concentrados proteicos (WPC) y aislados proteicos (WPI) (Morr y Ha, 1993; Byrne y Fitzpatrick, 2002).

El mayor problema para el aprovechamiento de estos concentrados proteicos de elevado valor biológico -que confieren propiedades de hidratación, emulsificación, textura y consistencia, formación de espuma y gelificación (Spellman y col., 2009; Nicorescu y col., 2009)- al ser utilizados en la formulación y/o fortificación de alimentos, es su importante grado de alergenicidad para personas con fallas congénitas en el metabolismo de proteínas (Otani y col., 1990). Los principales alérgenos del WPC son mayormente la α -lactoalbumina y la β -lactoglobulina, y en menor cantidad las immuno-

globulinas (en particular IgG) y la seroalbumina. En general, los problemas de alergenicidad pueden reducirse o eliminarse por hidrólisis de las diferentes fracciones que componen la proteína del WPC, transformándolas en péptidos, al mismo tiempo que se aumenta su digestibilidad (Tolkach y Kulozik, 2005; Guadix y col., 2006). Debido a la hidrólisis, las propiedades moleculares de las proteínas cambian, produciéndose la disminución del peso molecular, el aumento de la carga y la liberación de grupos hidrofóbicos, entre otros fenómenos.

Si bien en los hidrolizados de proteína se potencian propiedades nutricionales o funcionales (solubilidad, poder emulsificante, capacidad espumante), durante el proceso de hidrólisis se produce un efecto secundario negativo importante: la liberación de péptidos con sabor más amargo que la proteína nativa, generalmente relacionado con la presencia y posición de aminoácidos hidrofóbicos en los péptidos del hidrolizado (Foegeding y Luck, 2002). Por lo tanto, el control del proceso de reacción y la caracterización de los hidrolizados en base al tamaño de los péptidos son objetivos importantes en la hidrólisis de proteínas.

Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de las condiciones de reacción utilizadas: concentración de sustrato, relación enzima/sustrato, tiempo de incubación, pH y temperatura sobre el tipo de péptidos producidos.

Materiales y métodos

Materiales

El concentrado proteico de lactosuero (WPC) al 35% fue provisto por la empresa Milkaut S.A. (Franck, Santa Fe, Argentina). A partir del mismo se prepararon las diferentes disoluciones tamponadas que se utilizaron en el estudio. La concentración de proteínas del WPC fue corroborada mediante la determinación de nitrógeno en un equipo Kjeldhal Buchi 342 con unidad de destilación y titulador automático.

La enzima utilizada fue Alcalasa AF 2.4L (Novozymes Corp., Dinamarca), una preparación comercial de una serina endopeptidasa bacteriana (EC 3.4.21.14) de *Bacillus licheniformis*.

Las disoluciones de WPC se realizaron sobre soluciones buffer fosfato 40 mM para los pH 8.0, 8.5 y 9.0 y soluciones buffer carbonato 40 mM para los pH 9.5 y 10.0.

Todos los reactivos necesarios para esta tarea y para el análisis de los péptidos obtenidos fueron de calidad analítica o superior (Cicarelli, Argentina).

Condiciones de ensayo

Teniendo en cuenta los rangos de condiciones de utilización sugeridos por el proveedor de la preparación enzimática, para el diseño de las experiencias que posibiliten el análisis del efecto de las condiciones de reacción se recurrió a un diseño central compuesto, rotacional y ortogonal, de cuatro factores: temperatura, pH, concen-

tración inicial de sustrato y tiempo de reacción. La decisión de trabajar a concentraciones iniciales de sustrato variable, manteniendo constante la cantidad de enzima empleada, permitió incorporar indirectamente al análisis el efecto de la relación concentración inicial de sustrato – cantidad de enzima empleada, utilizando en todos los casos pequeñas cantidades de enzima.

De esta manera, para ensayar las condiciones experimentales en los niveles determinados por el modelo (Tabla 1) se planificaron 36 experiencias diferentes que fueron acomodadas al azar de manera de minimizar los efectos de variabilidad en la respuesta observada. Como variable de respuesta para este estudio se seleccionó el Tenor de Picos Hidrofóbicos. Las gráficas de superficie de respuesta y el análisis estadístico para cada respuesta se realizaron con el software Minitab® 15 (Minitab Inc., State Collage, PA, USA).

Tabla 1: Valores de las variables del proceso utilizados en el estudio

Parámetro	Nivel				
	- α	-1	0	1	α
Temp. (°C)	30	40	50	60	70
pH	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0
S (% p/v)	1	4	7	10	13
Tiempo (min)	3.1	10	31.6	100	316

Análisis de los hidrolizados obtenidos mediante HPLC

Para el análisis cromatográfico de las muestras obtenidas se utilizó una metodología similar a la propuesta por Penas y col. (2006). Se trabajó con un cromatógrafo con programador de gradiente modelo 2360 y un detector de absorbancia de longitud de onda variable V4® (Isco Inc., Lincoln, NE, U.S.A.). Se utilizó una columna para RP-HPLC C18 de 250 x 4.6 mm y 300 Å de tamaño de poro. Las corridas se llevaron a cabo a una temperatura uniforme de 30°C, con un caudal de 1 ml min⁻¹, fijando la longitud de onda del detector en 214 nm. Para las separaciones se utilizó como solvente A 0.1% TFA en agua y como solvente B 0.1% TFA en acetonitrilo, siendo el gradiente empleado el siguiente: 5 min. de fase A 100%, luego un gradiente lineal hasta 50% de B en 45 min., le sigue una fase isocrática en 50% B durante 5 min., luego gradiente lineal hasta 70% B durante 5 min., y 5 min. finales en condición isocrática con 70% de B. Los datos se recogieron con una interfase Chem Research Data System Program®, versión 3.0.2. (Isco Inc., Lincoln, NE, U.S.A.). En las condiciones de trabajo adoptadas, además de identificar las diferentes fracciones proteicas que componen el lactosuero (cuyos tamaños moleculares oscilan entre 14.4 y 1000 kDa), se puede seguir el producto de la hidrólisis hasta péptidos de alrededor de 1000 Da.

Por otra parte, en la literatura se reportan numerosas escalas de hidrofobicidad de aminoácidos basadas

en diferentes principios, tales como la energía libre de Gibbs necesaria para que un aminoácido pase desde una fase a otra, coeficientes de retención en HPLC de péptido formados por un solo tipo de aminoácido, nivel de escondimiento de aminoácidos en proteínas modelo, presencia de aminoácidos en regiones antigénicas de proteínas modelo, energía de contacto entre aminoácidos adyacentes entre proteínas, y otras, clasificadas como mixtas, basadas en escalas desarrolladas previamente (Lesser y col., 1987). A pesar de la dificultad de encontrar una definición única de hidrofobicidad de péptidos, en el presente trabajo se ha utilizado una metodología basada en el tiempo de retención de los péptidos más hidrofóbicos, considerando que la absorción de los péptidos en la columna de C18 de RP-HPLC es un fenómeno superficial donde interactúan los grupos hidrofóbicos de la matriz y aquellos de la superficie de la proteína. Así, si bien las interacciones hidrofóbicas son en general bastante débiles, son también a menudo muy numerosas y para eluir las moléculas hidrofóbicas se debe disminuir la polaridad del disolvente, sustituyendo en este caso el agua de la fase móvil con acetonitrilo, cuya concentración se va aumentando gradualmente en el gradiente utilizado.

En las condiciones de elución utilizadas en el presente trabajo, los péptidos más hidrofóbicos que podrían relacionarse con la producción de sabor amargo en el hidrolizado comenzarían a eluirse a partir del último tercio de la corrida. Por tal motivo, como variable de control del desarrollo de hidrofobicidad en los hidrolizados, se adoptó el concepto de Tenor de Picos Hidrofóbicos (TPH), definido como la relación entre el área correspondiente a todos los picos cromatográficos eluidos a partir de los 44 minutos y el área total de cada cromatograma.

Análisis estadístico de los resultados

Todas las experiencias fueron realizadas por duplicado. Para la evaluación de las diferencias entre los promedios de los tenores de picos hidrofóbicos se realizó un análisis de variancia (ANOVA) factorial. Asimismo, para determinar la significancia de cada variable, se recurrió al pvalue ($p < 0.05$), que es el menor valor de significación para rechazar la hipótesis nula con un intervalo de confianza del 95.0%.

Resultados y discusión

El análisis de regresión múltiple para la variable respuesta fue realizado mediante el empleo del software Minitab 15. El ajuste del modelo se verificó mediante el coeficiente R^2 , que indica el porcentaje de la variabilidad en la respuesta que puede explicarse mediante el modelo representado por la siguiente ecuación (Ec. 2):

$$\text{Respuesta} = C_1 + C_2.S + C_3.p + C_4.T + C_5.t + C_6.S_2 + C_7.S.p + C_8.S.T + C_9.S.t + C_{10}.p_2 + C_{11}.p.T + C_{12}.p.t + C_{13}.T_2 + C_{14}.T.t + C_{15}.t_2$$

Donde S representa la concentración inicial de sustrato, p el pH del medio de reacción, T la temperatura de reacción, t el tiempo de reacción y Ci refiere a los diferentes coeficientes constantes a determinarse a través del ajuste estadístico de los datos obtenidos experimentalmente.

Las condiciones óptimas para minimizar la aparición de picos hidrofóbicos, y por ende el desarrollo de sabor amargo, se estudiaron manipulando cuatro factores en las condiciones de hidrólisis: pH, temperatura, tiempo y concentración inicial de sustrato. En la Tabla 2 se muestran los valores del análisis de variancia para la respuesta TPH, obteniéndose un valor de 0.635 para el coeficiente R^2 , lo que indica que el 63.5% de la variabilidad en la respuesta puede ser explicado por el modelo de la Ec. (2). Si bien el coeficiente R^2 puede resultar bajo, el valor obtenido en el presente estudio resultó superior a los presentados en la mayoría de los trabajos similares al presente que han sido informados en la literatura, considerándose aceptables debido a la dificultad de determinar la hidrofobicidad de péptidos en muestras complejas. Como puede observarse en este caso, sólo tres efectos presentan valores $p < 0.05$, indicando que en el tenor de péptidos hidrofóbicos, dentro del rango de condiciones experimentales ensayadas, tienen preponderancia la temperatura, el tiempo y la interacción tiempo-tiempo.

Tabla 2: ANOVA para la respuesta TPH

Efecto	F-ratio	P
Sustrato	0.09	0.761
pH	3.23	0.085
Temperatura	5.25	0.031
Tiempo	11.78	0.002
Sustrato*Sustrato	0.00	0.963
Sustrato*pH	0.01	0.938
Sustrato*Temperatura	0.13	0.719
Sustrato*Tiempo	0.03	0.857
pH*pH	0.34	0.562
pH*Temperatura	0.01	0.932
pH*Tiempo	1.00	0.328
Temperatura*Temperatura	1.54	0.226
Temperatura*Tiempo	0.90	0.351
Tiempo*Tiempo	4.95	0.003

De acuerdo con estos resultados, el efecto del cambio en la selectividad de la enzima para diferentes condiciones de reacción estaría muy influenciado por el tiempo y la temperatura en que se produzca la hidrólisis deseada.

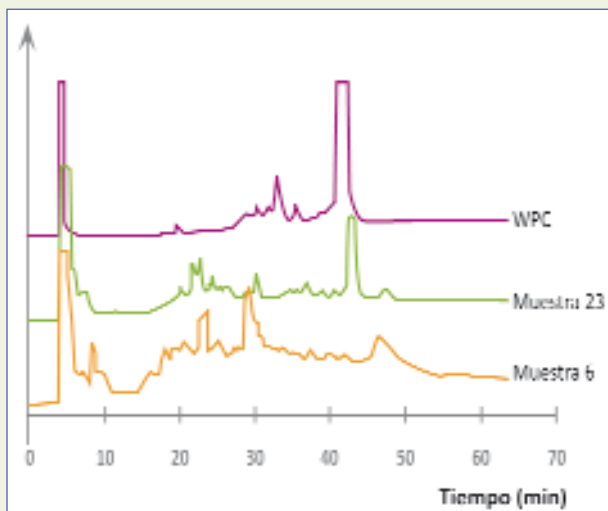


Fig 1. Perfiles cromatográficos obtenidos para disoluciones de WPC y los hidrolizados correspondientes a las experiencias n° 6 (10% WPC, pH 9.5, T 60°C, t 10 min) y 23 (10% WPC, pH 8.5, T 40°C, t 10 min) del diseño experimental utilizado.

Esta variabilidad puede observarse claramente a través del análisis de los perfiles péptidicos obtenidos en los diferentes cromatogramas.

En la figura 1 se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos para disoluciones de WPC y algunos de los hidrolizados realizados en el estudio. Como puede observarse, a medida que transcurre la hidrólisis, los picos característicos de las diferentes fracciones proteicas que componen el WPC se van reduciendo, apareciendo nuevos picos a menores y mayores tiempos de retención que los correspondientes a las fracciones originales. En las condiciones de elución utilizadas en el presente trabajo, se considera que los péptidos más hidrofóbicos que podrían relacionarse con la producción de sabor amargo en el hidrolizado se corresponden con los picos que aparecen a partir de los 44 minutos. Por tal motivo, las condiciones óptimas de hidrólisis no sólo deben garantizar alcanzar al menos un DH del 8% en el menor tiempo y con el menor costo posible, sino además, producir hidrolizados que presenten perfiles cromatográficos con escaso o nulo desarrollo de picos a partir de los 44 minutos.

En la figura 2 se observan los perfiles de elución de los hidrolizados de WPC obtenidos a diferentes pH, manteniendo las otras condiciones en: concentración inicial de sustrato WPC 7%; 31.6 minutos y 50°C. Puede observarse que existen cambios cuantitativos en los picos hidrofóbicos, que eluyen a partir de los 44 minutos, observándose un perfil con mayor área correspondiente a péptidos hidrofóbicos cuando se trabaja a pH =10.

En la figura 3 se observan los perfiles de elución de los hidrolizados de WPC obtenidos a diferentes temperaturas, manteniendo las otras condiciones en: concentración inicial de sustrato WPC 7%; 31.6 minutos y pH 9. Como puede observarse en este caso, los perfiles presentan una disminución de picos hidrofóbicos a medida que aumenta la temperatura de reacción.

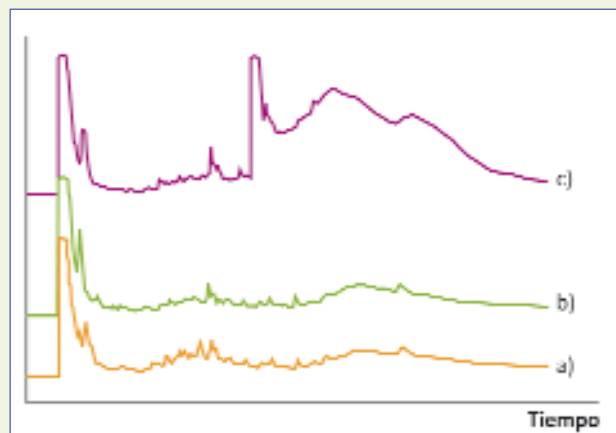


Fig 2. Perfiles cromatográficos obtenidos para ensayos realizados en las mismas condiciones pero con diferentes pH. a) pH 8; b) pH 9; c) pH 10.

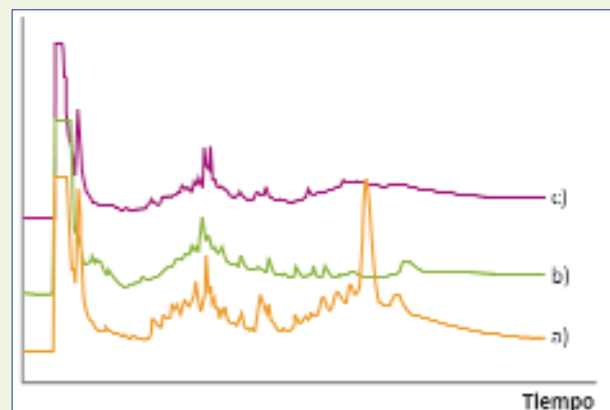


Fig 3. Perfiles cromatográficos obtenidos para ensayos realizados en las mismas condiciones pero con diferentes temperaturas. a) 30°C; b) 50°C; c) 70°C.

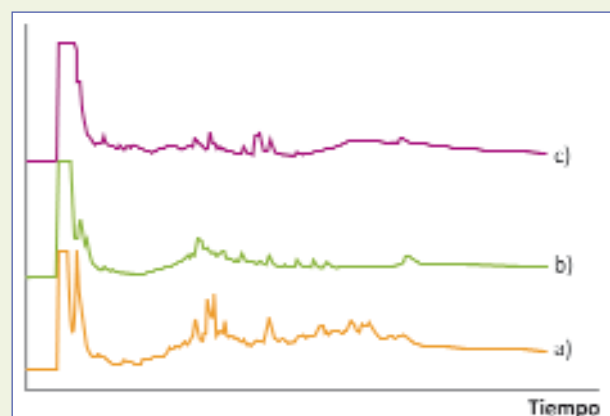


Fig 4. Perfiles cromatográficos obtenidos para ensayos realizados en las mismas condiciones pero con diferentes tiempos. a) 3.1 minutos; b) 31.6 minutos; c) 316 minutos.

En la figura 4 se observan los perfiles de elución de los hidrolizados de WPC obtenidos a diferentes tiempos, manteniendo las otras condiciones en: concentración inicial de sustrato WPC 7%; 50°C y pH 9. En los perfiles se observa la disminución de los picos hidrofóbicos a medida que aumenta el tiempo de reacción, aunque

parecería tenerse un óptimo a tiempos medios (Figura 3b), ya que se observa la disminución de algunos de los picos observados en la temperatura más alta (Figura 3c) y su conversión en péptidos más hidrófilos.

Conjuntamente con el análisis estadístico, se obtuvieron los valores de las constantes correspondientes para cada una de las variables de significación en la respuesta, las que se muestran en la tabla 3.

Del estudio estadístico puede inferirse que la aparición de picos hidrofóbicos (y por ende, el desarrollo de sabor amargo) está fuertemente influenciada por la temperatura y el tiempo de reacción. En el rango de condiciones estudiadas, un aumento de la temperatura de reacción produce una disminución del TPH que puede deberse a que el conjunto de múltiples reacciones que se produce durante la hidrólisis de las diferentes fracciones proteicas esté gobernado por la movilidad molecular de las enzimas. Por su parte, el efecto del tiempo es más complejo, ya que si bien inicialmente favorece la formación de picos hidrofóbicos, se alcanza un valor a partir del cual el efecto se revierte. Por otra parte, basadas en la predicción del modelo, utilizando los valores presentados en la Tabla 3 para cada coeficiente de la Ec. (2), se pueden construir superficies tridimensionales para diferentes niveles de las variables en análisis (Figura 5).

Como se observa en la figura 5, si bien el pH no tiene significancia estadística para la respuesta en estudio, un aumento del mismo incrementa levemente el tenor de picos hidrofóbicos, efecto que se hace más pronunciado a mayores tiempos de hidrólisis. Este efecto puede deberse a que la hidrólisis de WPC con la enzima alcalasa es un proceso de reacciones múltiples, donde muchos de los productos de degradación obtenidos en los primeros tiempos de la hidrólisis pasan a ser sustratos en las etapas más avanzadas, presentando a su vez valores y efectos diferentes en cada uno de sus parámetros cinéticos, producto de las condiciones de reacción empleadas.

Con el conjunto de las diferentes superficies de respuesta pueden determinarse gráficamente las zonas de condiciones de operación que pueden llevar a reducir la liberación de péptidos con sabor amargo. En este caso, operando a temperaturas entre 40°C y 50°C; pH entre 8 y 9 y tiempos de entre 75 y 90 minutos se pueden obtener buenos grados de hidrólisis con escaso desarrollo de picos hidrofóbicos.

Tabla 3: Coeficientes de regresión del polinomio de segundo orden para las variables con significancia estadística.

Constante	TPH
C ₁	0.03308
C ₂	-----
C ₃	-----
C ₄	0.01409
C ₅	0.02587
C ₆	-----
C ₇	-----
C ₈	-----
C ₉	-----
C ₁₀	-----
C ₁₁	-----
C ₁₂	-----
C ₁₃	-----
C ₁₄	-----
C ₁₅	-0.02065

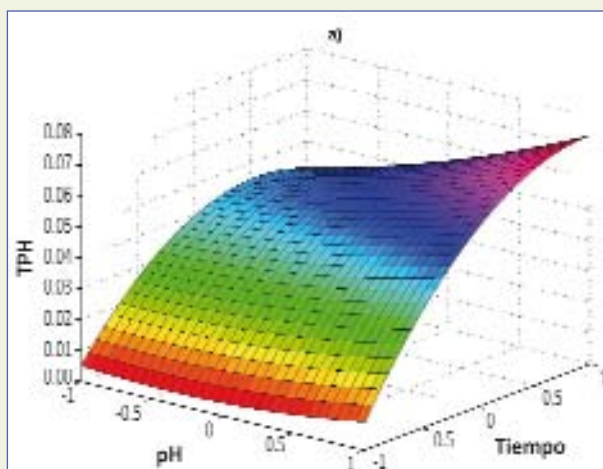


Fig 5. Superficie de respuesta predicha por el modelo para la variación de TPH para una temperatura de reacción de 40°C y una concentración inicial de sustrato de 7%.



Los Cantones S.A.

Acompañando a las Pymes en su constante crecimiento

Distribuidor para la Industria Láctea de productos



Suipacha 921 Piso 4 Dpto. B
(C1008AAS) C.A.B.A. - Argentina
Tel.: (54 11) 4893-1820
loscantones@sion.com - www.loscantones.com.ar

Como resultado de este estudio, se observa que las condiciones de reacción ejercen una marcada influencia sobre las constantes cinéticas, ya que si bien en los cromatogramas obtenidos para velocidades de hidrólisis equivalente no se observaron diferencias sustanciales en los perfiles de degradación desarrollados por la enzima, se obtuvieron diferencias significativas en las concentraciones de las distintas fracciones obtenidas.

Finalmente, a través del uso de la metodología de superficie de respuesta, se pudieron determinar diferentes condiciones de hidrólisis para lograr fracciones de péptidos de alta DH (>8%), evitando la aparición de los umbrales detectables de péptidos con sabor amargo.

Reconocimientos

Este trabajo ha sido realizado con el financiamiento de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Argentina). Los autores agradecen a Novozymes Latin America Ltda. y a Milkaut S.A. por la provisión de la enzima y del suero de quesería utilizados en este trabajo.

Referencias

Baro, L., J. Jimenez, A. Martinez & Bouza J. (2001). Peptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *Ars Pharmaceutica*, 42 (3-4): 135-145.

Byrne, E. & J. Fitzpatrick (2002). Investigation of how agitation during precipitation and subsequent processing affects the particle size distribution and separation of α -lactalbumin enriched whey protein precipitates. *Biochemical Engineering Journal*, 10: 17-25.

Foegeding, E. & Luck P. (2002). Whey protein products, pp 1957-1960. In: Caballero, B., L. Trugo, P. Finglas (eds.). *Encyclopedia of Foods Sciences and Nutrition*. Academic Press, New York.

Guadix, A.; Camacho, F. & E.M. Guadix (2006), Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor. *Journal of Food Engineering*, 74: 398-405.

Ha, E. & Zemel. M. (2003). Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. *J. of Nutritional Biochemistry*, 14(5):251-258.

Hinrichs, J. (2001). Incorporation of whey proteins in cheese. *Int Dairy J.* 11(4-7): 495-503.

Ibrahim, F., E. Babiker, N. Yousif & Tinay. A. (2005). Effect of fermentation on biochemical and sensory characteristics of sorghum flour supplemented with whey protein. *Food Chemistry*, 92(2): 285-292.

Jelen, P. (2003). Whey processing. Utilization and products, pp. 2739-2745. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox (eds.). Academic Press, London, UK.

Lesser, G.; Lee, R.; Zehfus, M. & G. Rose (1987). Hydrophobic interactions in proteins. *Protein Engineering*, 175-179.

Morr, C. V. & E.Y.W. Ha (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(6): 431-436.

Nakamura, T.; Sado, H. & Y. Syukunobe. (1993), Production of low antigenic whey protein hydrolysates by enzymatic hydrolysis and denaturation with high pressure. *Milchwissenschaft*, 48(3): 141-144.

Nicorescu, I., C. Loisel, A. Riaublanc, C. Vial, G. Djelveh, G. Cuvelier & Legrand J. (2009). Effect of dynamic heat treatment on the physical properties of whey protein foams. *Food Hydrocolloid* 23(4): 1209-1219.

Otani, H.; Dong, X. Y. & A. Hosono (1990). Preparation of low immunogenic peptide fragments from milk casein. *Milchwissenschaft*, 45(4): 217-220.

Penas, E.; Prestamo, G.; Baeza, M. L.; Martinez-Molero, M. I. & R. Gomez (2006). Effects of combined high pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins. *International Dairy Journal*, 16: 831-839.

Spellman, D., G. O'Cuinn & FitzGerald R. (2009). Bitterness in *Bacillus* proteinase hydrolysates of whey proteins. *Food Chemistry*, 114(2): 440-446.

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

SOLUCIONES PARA LOS PISOS DE LA INDUSTRIA LACTEA

J DULUC Y CIA S.R.L.



Pisos Sanitarios



J.Duluc y Cía S.R.L. - Lima 545 - Tel/Fax: 0341 4300723 - Rosario -luis_duluc@hotmail.com