

Influencia de las Sales en las Nanoestructuras de CMP

María E. Farías^{1,2} y Ana M.R. Pilosof¹

¹ Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Ciudad Universitaria, (1428) Buenos Aires, Argentina.

² Departamento de Tecnología, Universidad Nacional de Luján,
Rutas 5 y 7, CP 6700, Luján, Argentina. E-mail: efarias@di.fcen.uba.ar

Resumen - El caseinomacropéptido (CMP) es un péptido bioactivo obtenido durante la elaboración del queso. El objetivo de este trabajo fue analizar la influencia de las sales (NaCl y CaCl₂) en la formación de nanoestructuras de CMP por Dispersión Dinámica de Luz.

A $\text{pH} \geq 6,5$ el CMP se encuentra en forma monomérica debido a la elevada repulsión electrostática. Sin embargo la presencia de sales (NaCl, CaCl₂) permitió su autoensamblaje para formar dímeros, tetrámeros, hexámeros o formas más asociadas dependiendo del tipo de sal y de su concentración. Estas formas asociadas se autoensamblaron a $\text{pH} < 4,5$ con el tiempo por uniones electrostáticas. Elevadas concentraciones de sales disminuyeron la velocidad de autoensamblaje o la suprimieron, posiblemente por una excesiva neutralización de las cargas del CMP. La presencia de sales impactó en la primera etapa del autoensamblaje del CMP por la formación de tetrámeros mediante uniones hidrofóbicas.

Palabras Claves: caseinomacropéptido, autoensamblaje, sales

Salts Influence in Nano-structures of CMP

Abstract - Caseinomacropéptide (CMP) is a bioactive peptide obtained during the cheese-making. The aim of this work was to analyze the influence of salts (NaCl and CaCl₂) in the formation of CMP nano-structures by Dynamic Light Scattering (DLS).

Due to high electrostatic repulsion, at $\text{pH} \geq 6.5$ CMP is found in the monomeric form. However, the presence of salts (NaCl, CaCl₂) promoted CMP self-assembly to form dimers, tetramers, hexamers or more associated forms, depending on the type and concentration of salt. These associated forms self-assembled over time by electrostatic bond at $\text{pH} < 4.5$. The rate of CMP self-assembly was decreased or even was deleted with increasing salt concentration, maybe by an excessive neutralization of CMP charge. The presence of salts impacted on the first stage of CMP self-assembly of by the formation of tetramers linked by hydrophobic bonds.

Keywords: caseinomacropéptide, self-assembly, salts

INTRODUCCIÓN

El caseinomacropéptido (CMP) es un péptido bioactivo de 64 aminoácidos proveniente de la k-caseína y se obtiene durante la elaboración del queso. El CMP, que es altamente soluble en agua, difunde rápidamente en

el suero mientras que el resto de la molécula, la para-k-caseína, forma parte del coágulo. El CMP es de gran interés por sus propiedades bioactivas y tecnológicas (Kreuz et al., 2008). La molécula de CMP, por ser glicosilada, tiene un alto grado de heterogeneidad. Estas glicofomas difieren en su ubicación en la cadena peptídica, número y estructura (Daali et al., 2001). Las cadenas de carbohidratos contienen principalmente ácido siálico (Saito e Itoh, 1992). Con respecto a la glicosilación, el CMP puede clasificarse en dos fracciones: las formas glicosiladas (gCMP) y la no-glicosiladas (aCMP) (Kreuz et al., 2008). El CMP comercialmente disponible es una mezcla de fracciones glicosiladas y no glicosiladas. La relación entre ambas depende tanto del procedimiento como de la fuente de obtención. En un trabajo reciente (Fariás et al., 2010) hemos reportado que el CMP por debajo de pH 4,5 se autoensambla a temperatura ambiente con el tiempo conduciendo finalmente a un gel y hemos propuesto un modelo de autoensamblaje y gelificación del CMP estudiando las nanoestructuras del CMP por medio de la técnica de Dispersión de Luz Láser. Cuando el pH decrece debajo de 6,0 las cargas negativas de las moléculas de CMP comienzan a decrecer permitiendo que sus pocos sitios hidrofóbicos interactúen para formar dímeros, los cuales son estables a posteriores cambios de pH (primera etapa del autoensamblado). Por debajo de pH 4,5 ocurre la segunda etapa del autoensamblado por interacciones electrostáticas entre los dímeros de aCMP con carga neta positiva y los dímeros de gCMP con carga neta negativa. El pI del aCMP es 4.15 y, en contraste, el pI del gCMP es 3.15 (Kreuz et al., 2009); sin embargo, por el bajo pKa del ácido siálico cargas negativas se pueden localizar aún a pH 2,2 y pueden interactuar con cargas positivas de la cadena peptídica. Así el autoensamblaje del CMP por vía electrostática puede darse en un rango de pH entre 2.0 y 4.5.

El objetivo de este trabajo fue explicar la influencia de las sales NaCl y CaCl₂ en la formación de nanoestructuras de CMP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizó caseinomacropéptido, BioPURE-GMP® de Davisco Foods International, Inc. (Le Sueur, Minnesota, USA). Su pureza, según el proveedor, fue (en base seca): $90,0 \pm 3,0\%$ (p/p) de CMP (N x 7,07).

Los minerales fueron determinados mediante espectrofotometría de absorción atómica previa calcinación en mufla a 500 °C. La composición de minerales fue la siguiente (mg/100 g de muestra): 950% Na; 125% K y 540% Ca.

El contenido de ácido siálico fue 7% (p/p) (Fernando y Woonton, 2010).

La muestra de polvo al 5% (p/p) se disolvió en agua Milli-Q, con diferentes contenidos de NaCl (0; 0,01 y 0,2 M) y CaCl₂ (0; 0,01; 0,04; 0,06 y 0,2 M). Las soluciones se almacenaron en la heladera al menos 24 h antes de su uso.

El pH se ajustó a 3,5 con HCl o a 7,0 con NaOH de alta normalidad para evitar dilución. Las soluciones se preservaron con 0,02% p/p de azida sódica.

Autoensamblaje del CMP

La muestra fue filtrada (0,45; 0,2 y 0,02 μm) y se vertió en una cubeta de poliestireno descartable. El autoensamblaje o “self-assembly” del CMP fue determinado por dispersión de luz láser (DLS) a temperatura ambiente con un equipo Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments (Malvern, UK) provisto de un laser He-Ne (633 nm) y un correlador digital (modelo ZEN3600) a un ángulo de dispersión fijo de 173°. La técnica de DLS consiste en iluminar la cubeta por un rayo láser y registrar la intensidad de la luz dispersada por las partículas de la muestra. La intensidad de luz dispersada por las partículas fluctúa debido al movimiento browniano: las partículas grandes se mueven lentamente y las partículas pequeñas rápidamente. El diámetro de la partícula se relaciona con su difusividad mediante la ecuación de Stokes-Einstein (1):

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (1)$$

donde, $d(H)$ es el diámetro hidrodinámico (nm), D el coeficiente de difusión translacional ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), k la constante de Boltzmann ($1,28 \times 10^{-23} \text{ N} \cdot \text{m} \cdot \text{K}^{-1}$), T la temperatura absoluta (K) y η la viscosidad del solvente ($\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$).

Para analizar los resultados se utilizaron dos aproximaciones:

(1) El algoritmo CONTIN para clasificar los datos de intensidad de las partículas/agregados en percentiles. El resultado obtenido se conoce como distribución de intensidad por tamaño de partículas. A través de la teoría de Mie es posible convertir la distribución por intensidad en distribución por volumen y número de partículas.

(2) El método de cumulante para calcular el diámetro promedio de la distribución de intensidad o Z-average y además conocer el índice de polidispersidad que es un indicador del grado de agregación.

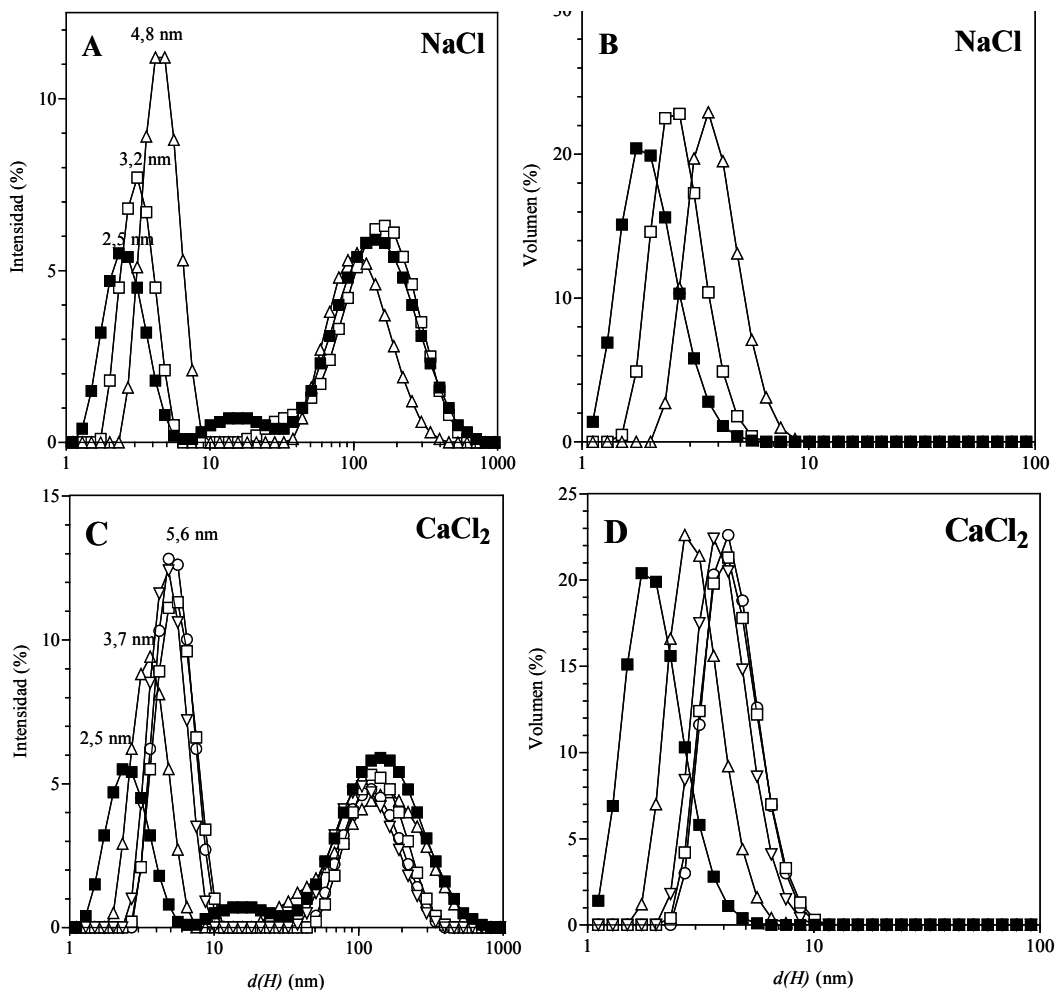


Figura 1 - Distribuciones de tamaños de partículas a pH 7,0 para soluciones de CMP al 5% (p/p) por A) y C) intensidad y B) y D) volumen a 25°C. A) y B) Sin sales (■) y en presencia de 0,01 M (□) y 0,2 M de NaCl (Δ). C) y D) Sin sales (■) y en presencia de 0,01 M (Δ); 0,04 M (□); 0,06 M (□) y 0,2 M CaCl_2 (□). El pH fue ajustado con HCl.

El valor del Z-average es adecuado para obtener un valor medio con un propósito de comparación pero no lo es para dar una completa descripción de los resultados para sistemas polidispersos.

Los valores que se informan son el promedio de tres repeticiones.

Se graficó el log del z-average en función del tiempo para obtener las velocidades de autoensamblaje, como la pendiente de las rectas obtenidas.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows. Se realizó la prueba de Tukey para determinar diferencias significativas a $P < 0,05$.

RESULTADOS

Asociación del CMP en presencia de NaCl a pH 7.0

En la Fig. 1A se presentan las distribuciones de tamaño de partícula por intensidad de soluciones de CMP solo (5% p/p) y en presencia de 0,01 y 0,2 M de NaCl que corresponden a las relaciones de 0,2 y 4 milimoles de NaCl/g de CMP respectivamente. Las mediciones se realizaron inmediatamente después de ajustar el pH a 7,0. El CMP en presencia de NaCl presentó una distribución bimodal aunque el primer pico fue predominante como puede observarse en la distribución por volumen (Fig. 1B).

Para la solución de CMP con una concentración de 0,01 M de NaCl el pico predominante tuvo una amplitud entre 1,7 y 5,6 nm y para 0,2 M entre 2,7 y 8,7 nm. Por lo tanto, puede apreciarse que la presencia de NaCl desplazó al valor máximo de $d(H)$ del primer pico desde 2,3 nm (solución de CMP sin NaCl) hasta 4,8 nm (solución con 0,2 M de NaCl) (Fig. 1A).

Las soluciones de CMP sin NaCl a pH 7,0 se caracterizaron por el predominio de la forma monomérica (2,5 nm) debido a las fuertes cargas negativas de la molécula de CMP. Una estimación de la masa molecular del CMP obtenida en presencia de NaCl con el software del Zetasizer Nano-Zs indicó que el $d(H)$ de 3,2 nm corresponde a la forma dimérica del CMP y 4,8 nm a la tetramérica. Por lo tanto la presencia de NaCl indujo la asociación del CMP. Un efecto similar de interacción entre las moléculas fue reportado para el caseinato de sodio en presencia de NaCl a pH 6,7 por HadjSadok, Pitkowski, Nicolai, Benyahia y Moulai-Mostefa (2008). El caseinato en condiciones de baja fuerza iónica (3 mM) está presente como moléculas individuales pero forma estructuras asociadas (superiores a 100 nm) en condiciones de alta fuerza iónica. Al aumentar la fuerza iónica ocurre un apantallamiento de las cargas de las proteínas. La disminución en la repulsión eléctrica favorecería la asociación desde monómeros a dímeros y tetrámeros dependiendo de la concentración de NaCl.

Asociación del CMP en presencia de CaCl₂ a pH 7.0

La adición de CaCl₂ sólido a las soluciones de CMP produjo un ligero decrecimiento del pH desde 6,6 (pH original del CMP) hasta 6,1 (concentración final de CaCl₂ en la solución 0,2 M). Este mismo efecto fue encontrado por Pitkowski, Nicolai y Durand (2009) para soluciones neutras de caseinato de sodio a la que se le agregó CaCl₂. La disminución del pH implicaría la liberación de protones por la unión del calcio a la proteína (Pitkowski et al., 2009).

En la Fig. 1C se muestran las distribuciones de tamaños de partículas por intensidad de las soluciones de CMP sólo al 5% (p/p) y en presencia de CaCl₂ (0,01 - 0,2 M) inmediatamente después de ajustado el pH a 7,0.

Todas las soluciones de CMP en presencia de CaCl_2 presentaron distribuciones de intensidad bimodales pero sólo el primer pico fue el predominante como puede apreciarse en la distribución en volumen de la Fig. 1D. El valor máximo del primer pico para las soluciones con 0,01 M de CaCl_2 (0,2 milimoles de CaCl_2/g de CMP) fue 3,7 nm y su amplitud estuvo entre 2,0 – 6,5 nm. Para soluciones con concentraciones iguales o superiores a 0,06 M de CaCl_2 (1,2 milimoles moles de CaCl_2/g de CMP) el pico predominante tuvo un valor máximo en 5,6 nm y su amplitud entre 2,7 y 10 nm. La presencia de CaCl_2 desplazó al valor máximo del pico predominante hacia $d(H)$ mayores evidenciando la ausencia de la forma monomérica del CMP (2,5 nm) cuando la concentración de CaCl_2 fue superior a 0,04 M (0,8 milimoles de CaCl_2/g de CMP).

El estado de asociación predominante se puede observar más claramente en la Fig. 2 que muestra la evolución del valor máximo de $d(H)$ del primer pico de la distribución de intensidad de tamaños de partículas (de la Fig. 1C) en función de la relación milimoles de CaCl_2/g de CMP. A medida que aumenta la cantidad de CaCl_2 en la solución de CMP las formas predominantes son dímeros, tetrámeros y por encima de 1,2 milimoles de CaCl_2/g de CMP la forma predominante es la hexamérica.

A la forma dimérica y hexamérica del CMP corresponden pesos moleculares aproximados entre 15 y 45 kDa. Kawasaki, Kawakami, Tanimoto, Dosako, Tomizawa, Kotake y Nakajima (1993), en uno de los primeros trabajos publicados sobre la purificación del CMP, hallaron un peso molecular entre 20 y 50 kDa para el CMP a pH neutro. Esto se debería posiblemente a la presencia de importantes cantidades de Ca^{2+} en el CMP donde se hicieron esos estudios (2600 mg/100 g de muestra).

A pH neutro en ausencia de sales o en presencia de NaCl prevaleció la forma monomérica del péptido y las soluciones de CMP fueron totalmente transparentes y estables en el tiempo. Sin embargo el comportamiento de las soluciones de CMP en presencia de CaCl_2 en concentraciones superiores a 0,06 M (1,2 milimoles de CaCl_2/g de CMP) fue totalmente diferente: se observó un enturbiamiento y aumento de la viscosidad con el transcurso de las semanas. Kawasaki et al. (1993) también observaron el enturbiamiento de las soluciones de CMP obtenido a partir de concentrado proteico de suero a pH neutro a 25°C.

Los sitios de unión principales para el calcio en las caseínas son los residuos de fosfoserina y los residuos de glutámico y aspártico de la cadena peptídica (Meisel y Olieman, 1998). Estos últimos presentan menor importancia a medida que el pH desciende (Kitts, 2006). Además se necesita menor concentración de iones divalentes que de iones monovalentes porque es más efectivo el apantallamiento de los iones divalentes por su habilidad de formar puentes (Bryant y McClements, 1998). Las formas glicosiladas de la k-caseína contienen entre 0–5 moles de ácido siálico por mol, por lo tanto el fragmento C-terminal, el CMP, contiene la misma relación (Mikkelsen et al., 2005). El ácido siálico es conocido por su habilidad para quelar calcio preferentemente a pH 7,0 (Jaques et al., 1977). Por lo tanto son tres las posibles maneras de unión del calcio con el CMP: a través de los residuos de aminoácidos ácidos, por las serinas fosforiladas y por los residuos de ácido siálico.

Autoensamblaje del CMP en el tiempo en presencia de NaCl a pH 3,5

Inmediatamente después de ajustar el pH a 3,5 se observó que las distribuciones de tamaños de partícula por intensidad y volumen de soluciones de CMP en presencia de NaCl fueron similares a las obtenidas para CMP solo. A pH menor a 4,5, con el tiempo, disminuyó la intensidad del primer y predominante pico y simultáneamente aumentó la intensidad de los picos correspondientes a las formas asociadas de tamaño superior a 200 nm.

El valor máximo del pico predominante de todas las distribuciones de tamaños por intensidad fue aproximadamente 6,6 nm y las grandes estructuras correspondientes al pico de mayor tamaño (≈ 100 nm) fueron despreciables en cantidad (datos no mostrados). Sin embargo las distribuciones de tamaños de partículas por volumen muestran que en las soluciones de CMP la presencia de NaCl desplazó ligeramente al pico hacia mayores diámetros hidrodinámicos (datos no mostrados).

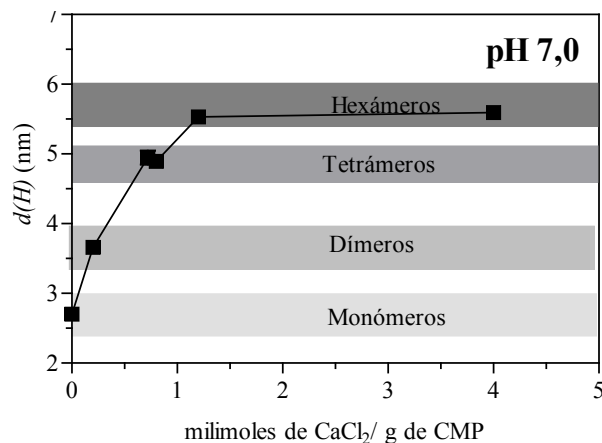


Figura 2 - Valor máximo de $d(H)$ del primer pico de la distribución de intensidades de la Fig. 1C en función de los milimoles de CaCl_2 por g de CMP (pH 7,0). Temperatura 25°C. Se indica el estado de asociación predominante estimado mediante el software del Zetasizer Nano-Zs

Con el transcurso del tiempo las soluciones de CMP en presencia de NaCl (0,01 M y 0,2 M) presentaron autoensamblaje de la misma forma que el CMP solo que se manifestó como la disminución de la intensidad del primer pico de la distribución tamaños de partículas y el aumento simultáneo de la intensidad correspondiente a los picos de mayores tamaños (aproximadamente 100 nm) (datos no mostrados).

El aumento de tamaño de las partículas en el tiempo se evidenció también por el incremento del Z-average. En la Fig. 3A se presentan la evolución del log de Z-average en el tiempo para soluciones de CMP solo y en presencia de diferentes cantidades de NaCl a pH 3,0 y 3,5. Las pendientes de las rectas obtenidas correspondieron a la velocidad de autoensamblado, k ($R^2 > 0,976$).

Un análisis de ANOVA en los valores de las pendientes determinó que a pH 3,5 la presencia de baja concentración de NaCl (0,01 M) no influyó en la velocidad de autoensamblaje que fue $0,037 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$ ($P > 0,05$) en comparación con la solución de CMP solo. En cambio la presencia de 0,2 M de NaCl la disminuyó significativamente ($P < 0,05$) a $0,017 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$.

Autoensamblaje del CMP en el tiempo en presencia de CaCl_2 a pH 3,5

A fin de cuantificar el efecto de la presencia de diferentes concentraciones de CaCl_2 sobre la cinética del autoensamblaje de CMP a temperatura ambiente a pH 3,5 se evaluó la evolución del log del Z-average en función del tiempo (Fig. 3B). De dichos gráficos se obtuvieron rectas con un coeficiente de correlación lineal R^2 superior a 0,980. Las pendientes de las rectas son una medida de la velocidad de autoensamblaje, k . A pH 3,5 k fue $0,039 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$ (CMP solo). La presencia de 0,04 M CaCl_2 en la solución de CMP prácticamente no cambió a k , $0,033 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$. Sin embargo una mayor concentración de CaCl_2 (0,06 M o superior) suprimió el autoensamblaje a temperatura ambiente al menos durante los 40 minutos que duró el ensayo.

Reversibilidad de las nanoestructuras de CMP

Las nanoestructuras de CMP formadas a pH 3,5 no fueron totalmente reversibles retornando a pH 7,0 porque los dímeros de CMP, una vez formados, no fueron revertidos a monómeros con un posterior cambio de pH (Fariás et al., 2010; Martínez et al., 2011).

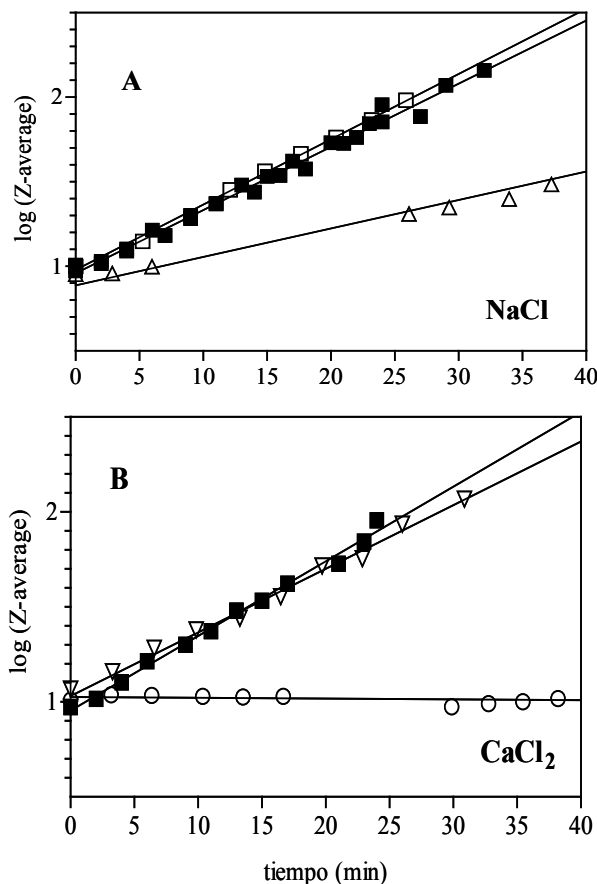


Figura 3 - Log (Z-average) en función del tiempo para soluciones de CMP al 5% (p/p) a pH 3,5. El pH fue ajustado con HCl. A) Sin NaCl (■) y en presencia de 0,01 M (□) y 0,2 M de NaCl (△). B) Sin CaCl₂ (■) y en presencia de 0,04 M (▽) y 0,06 M (○) de CaCl₂

Por lo tanto es necesario plantearse si las nanoestructuras formadas a pH 3,5 en presencia de CaCl₂ son reversibles con un cambio de pH, es decir regresándolo a pH 7,0. La Fig. 4A muestra las distribuciones por intensidad de una solución de CMP (5% p/p) y 0,04 M de CaCl₂ (relación 0,8 milimoles de CaCl₂/g de CMP) a pH 7,0 luego de haber sido llevada a pH 3,5 con HCl y regresada nuevamente a 7,0. En la Fig. 4A también se muestra a la solución de CMP original (5% p/p y 0,04 M de CaCl₂) a pH 7,0. Las distribuciones de tamaños por intensidad de la solución original y la que sufrió cambios de pH fueron similares demostrando que las soluciones fueron reversibles con el pH. El pico predominante tuvo un valor máximo de 4,8 nm que correspondería al tetrámero de CMP. Es decir, los tetrámeros formados en presencia de CaCl₂ a pH 7,0 serían estables a un cambio de pH posterior indicando que estarían posiblemente estabilizados por uniones hidrofóbicas.

CONCLUSIONES

Las sales alteran la interacción entre las proteínas dado que apantallan la repulsión debido a las cargas eléctricas y favorecen su asociación (Bryant y McClements, 1998). La presencia de sales (NaCl, CaCl₂) debido al apantallamiento de las cargas negativas que posee el CMP permiten su asociación por interacciones hidrofóbicas aún a pH neutro (6,5 - 7) pudiendo formarse dímeros, tetrámeros, hexámeros o formas más asociadas de CMP dependiendo del tipo de sal y de su concentración. Estas formas asociadas del CMP se autoensamblan

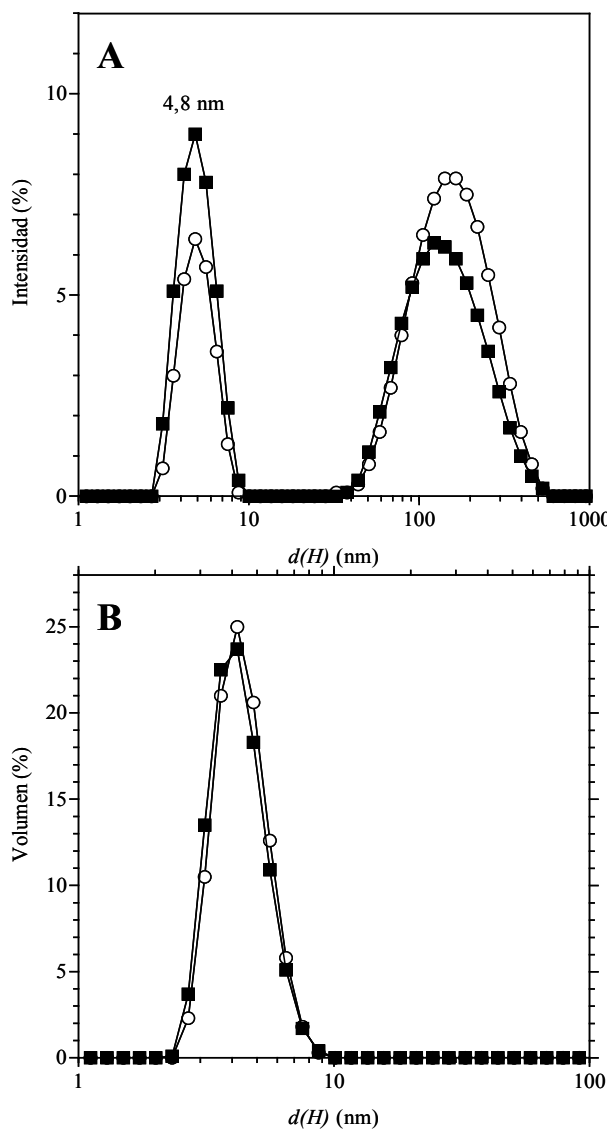


Figura 4 - Distribuciones de tamaños de partículas de soluciones de CMP (5% p/p) y 0,04 M CaCl_2 , por A) intensidad y B) volumen a 25°C. El pH fue ajustado con HCl. La solución fue sometida a los siguientes ajustes de pH: desde 7,0 a 3,5 para regresar a 7,0 (○). Para comparación se muestra la solución original a pH 7,0 (■)

posteriormente electrostáticamente al acidificarse con HCl ($\text{pH} < 4,5$). Elevadas concentraciones de sales (por ejemplo una relación de 4 milimoles de NaCl/g de CMP o igual o superior a 1,2 milimoles de CaCl_2/g de CMP) producen una disminución de la velocidad de autoensamblaje del CMP o pueden suprimirla, posiblemente por excesiva neutralización de las cargas necesarias para que ocurran las interacciones electrostáticas. No obstante los ensayos de reversibilidad del autoensamblaje en presencia de CaCl_2 indican que el CMP se asocia hidrofóbicamente formando un tetrámero resistente a ulteriores cambios de pH.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a Cristina de Landeta, Andrés Pighín, María Julia Martinez, a la Universidad

de Buenos Aires, al Departamento de Tecnología de la Universidad Nacional de Luján, al CONICET y a la ANPYCT de la República Argentina.

REFERENCIAS

Kreuz, Krause y Kulozik, "Separation of a glycosylated and non-glycosylated fraction of caseinomacropeptide using different anion-exchange stationary phases". *Journal of Chromatography A* 1208, 126-132, (2008).

Daali, Cherkaoui y Veuthey, "Capillary electrophoresis and high-performance anion exchange chromatography for monitoring caseinoglycomacropeptide sialylation". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24, 849-856, (2001).

Saito e Itoh, "Variations and distributions of O-glycosidically linked sugar chains in bovine β -casein A". *Journal of Dairy Science* 75, 1768-1774, (1992).

Fariás, Martínez y Pilosof, "Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation". *International Dairy Journal*. 20, 79-88, (2010).

Fernando y Woonton, "Quantitation of N-acetylneuraminic (sialic) acid in bovine glycomacropeptide (GMP)". *Journal of Food Composition and Analysis* 23, 359-366, (2010).

Pitkowski, Nicolai y Durand, "Stability of caseinate solutions in the presence of calcium". *Food Hydrocolloids* 23, 1164-1168, (2009).

Kawasaki, Kawakami, Tanimoto, Dosako, Tomizawa, Kotake y Nakajima, "pH-Dependent molecular weight changes of β -casein glycomacropeptide and its preparation by ultrafiltration". *Milchwissenschaft* 48, 191-196, (1993).

Meisel y Olieman, "Estimation of calcium-binding constants of casein phosphopeptides by capillary zone electrophoresis". *Analytica Chimica Acta* 372, 291-297, (1998).

Kitts, "Chapter 2 Calcium binding peptides. *En Nutraceutical proteins and peptides in health and disease*". Mine, Yoshinori, Shahidi, Fereidoon (Ed.). CRC Press: 11-22, (2006).

Bryant y McClements, "Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat denatured whey". *Trends in Food Science and Technology* 9, 143-151, (1998).

Mikkelsen, Bakman, Sørensen, Barkholt y Frøkiær, "Sialic acid-containing milk proteins show differential immunomodulatory activities independent of sialic acid". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 7673-7680, (2005).

Jaques, Brown, Barrett, Brey y Weltner, "Sialic Acid: A calcium-binding carbohydrate". *The Journal of Biological Chemistry* 252, N° 13, 4533-4538, (1977).

Martínez, Fariás y Pilosof, "Casein glycomacropeptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating". *Food Hydrocolloids* 25, 860-867, (2011).

Hadjsadok, Pitkowski, Nicolai, Benyahia y Moulai-Mostefa, "Characterisation of sodium caseinate as a function of ionic strength, pH and temperature using static and dynamic light scattering". *Food Hydrocolloids* 22, 1460-1466, (2008).

Kreuz, Krause y Kulozik, "Influence of glycosylation on foaming properties of bovine caseinomacropeptide". *International Dairy Journal* 19, 715-720, (2009).