

VALORIZACIÓN DEL SUERO DE QUESO. UN DESAFÍO PARA LA CROMATOGRFÍA A ESCALA INDUSTRIAL

Nicolás URTASUN^{1,2}, Daniela B. HIRSCH^{1,2}, María F. BAIELI^{1,2}, María V. MIRANDA^{1,2}, Osvaldo CASCONE^{1,2} & Federico J. WOLMAN^{1,2,*}

¹ Cátedra de Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina.

² Instituto de Nanobiotecnología (NANOBIOTEC), CONICET-Universidad de Buenos Aires, Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: fwolman@ffyb.uba.ar

RESUMEN	47
SUMMARY.	48
INTRODUCCIÓN	48
PURIFICACIÓN INDUSTRIAL DE PROTEÍNAS DEL SUERO DE QUESO	52
PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DEL SUERO DE QUESO. PROCESOS USADOS EN LA INDUSTRIA	55
NUEVAS ESTRATEGIAS Y DESARROLLOS RECIENTES	57
CONCLUSIONES	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

RESUMEN

El suero de queso o lactosuero es un subproducto de la fabricación del queso cuya producción mundial anual ronda los 200 millones de toneladas. Su contenido proteico es de 0,6 %, lo que significa 1,2 millones de toneladas de proteínas anuales. Este subproducto industrial contiene proteínas de alto valor comercial todavía no recuperadas eficientemente en nuestro país y en muchos lugares del mundo, siendo su mayor valorización la producción de suero en polvo, lactosa o concentrados proteicos totales. En este artículo se muestra la gran cantidad de proteínas y otras moléculas que pueden ser recuperadas a partir del lactosuero y se describen los métodos utilizados para su purificación. Dentro de las proteínas de alto valor se encuentran lactoferrina, lactoperoxidasa y osteopontina, además de las de valor intermedio como β -lactoglobulina, α -lactalbúmina, caseinomacropéptido e inmunoglobulinas. La purificación de estas proteínas haría rentable la manufactura de un desecho industrial altamente contaminante.

PALABRAS CLAVE: lactosuero, proteínas valorización.

SUMMARY

Valorization of cheese whey. A challenge for the industrial-scale chromatography

The lactoserum or cheese whey is a by-product of the manufacture of cheese whose annual world production around 200 million tons. Its protein content is 0.6%, which means 1.2 million tons of annual protein. This industrial by-product contains proteins of high commercial value not yet recovered efficiently in our country and in many parts of the world, being the production of whey powder, lactose, or total protein concentrates its higher valuation. This article shows the large number of proteins and other molecules that can be recovered from whey and describes the methods for its purification. Within high-value proteins are lactoferrin, lactoperoxidase and osteopontin, in addition to those of intermediate value such as the β -lactoglobulin and α -lactalbumin, caseinomacropeptide and immunoglobulins. The purification of these proteins would make cost-effective the manufacture of this industrial waste.

KEY WORDS: lactoserum, proteins, valorization.

INTRODUCCIÓN

El suero de queso o lactosuero, es un subproducto derivado de la fabricación del queso luego de precipitar la caseína. Dependiendo del método empleado para coagular las caseínas, proteínas mayoritarias de la leche, se obtienen diferentes suspensiones líquidas sobrenadantes que varían en sus características y composición. Cuando la precipitación de la caseína se lleva a cabo empleando enzimas coagulantes - quimosina o diferentes reninas- se obtiene el suero dulce, con un valor de pH que oscila entre 5,9 y 6,6. Cuando la precipitación se realiza por acidificación de la leche -empleando bacterias productoras de ácido láctico o por agregado de ácidos orgánicos o minerales- se obtiene el suero ácido, cuyo valor de pH oscila entre 4,3 y 4,6. En ambos casos, el suero representa un 80-90% del volumen de leche procesado y en él permanecen el 50% de los nutrientes de la leche original, como ser: proteínas solubles, lactosa, minerales, vitaminas (Bylund, 1995). La composición del suero puede variar en función de distintos factores: fuente de la leche (bovina, caprina, ovina, etc.), condiciones de cría y estado del animal, momento del año y tipo y calidad de procesamiento empleado (Ganju & Gogate, 2017; Mollea *et al.*, 2013).

En términos generales, la producción mundial anual de suero ronda los 200 millones de toneladas y el mercado global para sus proteínas se estima en 9.000 millones de dólares para el año 2022. Aproximadamente el 60% del suero generado mundialmente es industrializado, mientras que el suero remanente se dispone para alimentación animal, para uso como fertilizante o directamente es descargado al ambiente como desperdicio (Ganju & Gogate, 2017; Mollea *et al.*, 2013; Baldasso *et al.*, 2011). El suero de queso es considerado uno de los productos que genera mayor contaminación, con una demanda biológica de oxígeno superior a las 35.000 ppm, lo que representa un serio problema medioambiental. Esto es particularmente importante en países en desarrollo en los que el suero no es completamente industrializado y no hay regulaciones gubernamentales que limiten o restrinjan su disposición (Baldasso *et al.*, 2011; Smithers, 2008). El suero descargado a las napas reduce el nivel de oxígeno disuelto en agua, dificulta la biodegradabilidad e implica un riesgo para el medioambiente y la salud humana (Ghaly *et al.*, 2007).

En Argentina, según datos oficiales del INTI y del Ministerio de Industria, hay una producción de 4.600 millones de litros de suero de queso por año, de los cuales sólo el 40-45% es industrializado por 7 u 8 empresas (González, 2013; Castells & Schmidt, 2013). Durante mucho tiempo, las proteínas del suero de queso sirvieron de alimento para porcinos o el suero fue eliminado por las cloacas o por los ríos, o dispersado sobre el campo, provocando contaminación del medioambiente. El efecto contaminante de 400.000 litros de suero de queso (el producido diariamente por una planta de porte mediano) es equivalente al de una ciudad de 1.250.000 habitantes.

En este momento la valorización más eficiente en la Argentina (sólo un 20% del total producido) es la obtención de concentrados proteicos (WPC, *whey protein concentrate*) para uso alimentario por filtración por membranas de microfiltración (MF), ultrafiltración (UF) y nanofiltración (NF), con porcentajes de proteínas con respecto a sólidos totales de 35 a 85%. Debido al costo de los sistemas de membranas esta valorización está limitada principalmente a empresas que generan más de 250.000 litros diarios de suero (González, 2013). Es importante destacar que el proceso de MF y UF no desnaturaliza las proteínas del suero, por lo que en los WPC sus propiedades funcionales permanecen intactas. Este tipo de valorización involucra una gran inversión de capital por parte de la empresa en tecnología de membranas de filtración siendo imposible afrontar dichos montos por empresas con pequeñas producciones (generadoras de hasta 50.000 litros diarios de suero). En estos últimos casos, la utilización del suero de queso para alimentación del ganado o el desecho directo al medioambiente son los destinos elegidos (González, 2013).

A partir de los últimos años y en concordancia con el advenimiento del concepto de “alimentación funcional”, hay un creciente interés en la comercialización de diferentes productos derivados del suero de queso bovino debido fundamentalmente a las funciones, propiedades y potenciales aplicaciones reportadas, como ser: antioxidante, antiinflamatorio, antiviral, antibacterial, antitumor/anticáncer, antiobesidad, antidiabético, actividad antihipertensiva, protección cardiovascular, inmunomodulación y prevención de osteoporosis, entre otras (Marshall, 2004; Patel, 2015). Más aún, las proteínas del suero de queso, poseen elevado valor nutricional debido a su alto contenido en aminoácidos esenciales así como propiedades fisicoquímicas ideales para su uso en alimentos (Gunasekaran *et al.*, 2007; González Siso, 1996).

Existe una gran variedad de productos, con diferentes niveles de valor agregado, que pueden obtenerse del suero, como se muestra en la **Figura 1**. Los avances logrados en la tecnología de membranas filtrantes, -especialmente en ultrafiltración, microfiltración y ósmosis reversa-, posibilitaron el tratamiento del suero para separar sus componentes fundamentales como proteínas, lactosa y minerales. Esto dio lugar, a su vez, a la comercialización de productos de valor agregado medio como es el caso de los concentrados de proteínas séricas (WPC, del inglés *whey protein concentrates*), con concentraciones de proteína que varían del 35 al 85% en base seca; proteínas aisladas del suero (WPI, del inglés *whey protein isolates*) con contenidos proteicos del 90-98% y niveles muy reducidos de lactosa y grasas; suero reducido en lactosa; suero desmineralizado así como proteínas de suero hidrolizadas (WPH, del inglés *whey protein hydrolysate*) (Ganju & Gogate, 2017; Mollea *et al.*, 2013). Más aún, el suero de queso como tal, o la lactosa permeada en el proceso de ultrafiltrado, pueden ser usados como sustratos por varios microorganismos o procesos enzimáticos para obtener distintos tipos de productos como alimento animal, nuevas proteínas, probióticos, ácidos orgánicos, enzimas, carotenoides, bio-preservantes, gomas de origen biológico, polisacáridos y bioplásticos (Prazeres *et al.*, 2012; Yadav *et al.*, 2015).

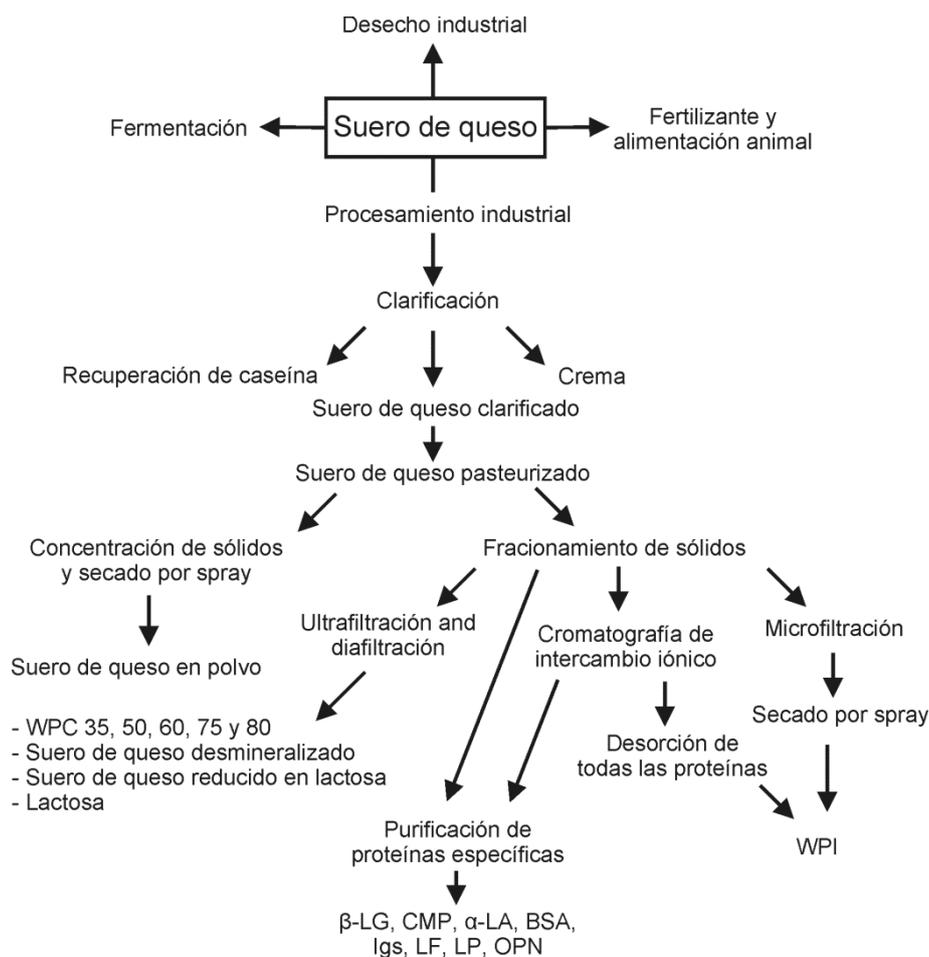


Figura 1. Algunos productos que pueden ser obtenidos del suero del queso. WPC: *whey protein concentrate*, WPI: *whey protein isolate*, β-LG: β-lactoglobulina, CMP: caseinmacropéptido, α-LA: α-lactalbúmina, BSA: seroalbúminabovina, Igs: inmunoglobulinas, LF: lactoferrina, LP: lactoperoxidasa, OPN: osteopontina. Tomado de Urtasun *et al.* (2018)

PROTEÍNAS DEL SUERO DE QUESO

De las diferentes posibilidades de procesamiento del suero de queso mostradas en la **Figura 1**, la purificación y producción de las diferentes proteínas individuales resulta ser la que genera mayor valor agregado. Sin embargo, debido a la naturaleza del suero de queso y a los muy elevados volúmenes que es necesario procesar, la recuperación y purificación de las distintas proteínas representa un importante desafío, tanto en términos tecnológicos, como monetarios.

Las principales proteínas presentes en el suero poseen propiedades y características únicas tanto a nivel biológico como nutricional, y cada una tiene por tanto aplicaciones comerciales específicas.

En la **Tabla 1** se muestran las características y funciones de las diferentes proteínas presentes en el suero de queso. De ellas, las mayoritarias son β-lactoglobulina (β-LG), caseinmacropéptido (CMP), α-lactalbúmina (α-LA), seroalbúmina bovina (BSA) e inmunoglobulinas (Igs), representando un 45%, 20%, 15%, 5% y 10% del total de las proteínas del suero, respectivamente. Además, el suero contiene otras proteínas minoritarias como lactoferrina (LF), lactoperoxidasa (LP) y otras aún más minoritarias como la osteopontina (OPN), lisozima (LZ) y factores de crecimiento. Los principales factores que afectan a la concentración de cada una de estas proteínas son el tipo de suero (dulce o ácido) y el tipo de procesamiento a que fue sometido.

Proteína	MW (kDa) y pl	Conc. (g/L)	Funciones	Referencias
β-LG	18 (5,4)	3,20	- Fuente de aminoácidos esenciales y ramificados - Unión y transporte de retinol, vitamin D, colesterol y ácido palmítico - Unión a ácidos grasos libres y promoción de su absorción en el neonato - Inmunidad pasiva - Metabolismo del fósforo - Antihipertensivo, anticanceroso, hipocolesterolémico	(Chatterton <i>et al.</i> , 2006; Marshall, 2004; Mollea <i>et al.</i> , 2013; Santos <i>et al.</i> , 2012)
CMP	7-9 (3,8)	1,50	- Fuente de aminoácidos ramificados - Ingrediente dietario para pacientes con fenilcetonuria - Función digestiva	(Marshall, 2004; McIntosh <i>et al.</i> , 1998)
α-LA	14 (4,4)	1,20	- Fuente de aminoácidos esenciales y ramificados - Unión y adsorción de calcio - Actividad opioide, antihipertensivo - Inmunomodulador - Actividad antibacteriana y antitumoral	(Greene <i>et al.</i> , 1999; Imafidon <i>et al.</i> , 1997; Marshall, 2004; Mollea <i>et al.</i> , 2013)
BSA	66.4 (5,1)	0,40	- Fuente de aminoácidos esenciales - Protección contra radicales libres - Transporte, metabolismo y distribución de ligandos	(Marshall, 2004; Santos <i>et al.</i> , 2012)
Igs	150-600 (5,0- 8,0)	0,70	- Inmunomodulador - Inmunidad pasiva	(Mollea <i>et al.</i> , 2013; Smithers, 2008)
LF	78 (7,9)	0,10	- Actividad antioxidante, anti-inflamatoria, antibacteriana, antiviral y anti-fúngica - Promotora del crecimiento de la flora intestinal beneficiosa - Transporte y regulación del hierro - Inmunomodulador	(Marshall, 2004; McIntosh <i>et al.</i> , 1998)
LP	79 (9,6)	0,03	- Antibacteriana - Prevención del cáncer de colon y piel	(Boots & Floris, 2006; Marshall, 2004; McIntosh <i>et al.</i> , 1998; Smithers, 2008)
OPN	29 (4,2)	0,02	- Inhibición de la calcificación ectópica - Remodelado del hueso - Exacerbación de la fagocitosis por los macrófagos - Inducción de la respuesta inmune TH1	(Christensen & Sorensen, 2016)
LZ	14 (11,0)	> 0,001	- Antibacteriana	(Chandan <i>et al.</i> , 1968; Fox & Kelly, 2006)
Factores de crecimiento	variable	< 6.10 ⁻⁵	- Crecimiento y diferenciación celular - Protección y reparación de células intestinales - Reparación de heridas	(McIntosh <i>et al.</i> , 1998; Smithers, 2008)

Tabla 1. Características y funciones de las proteínas más importantes del suero del queso.

β-LG: β-lactoglobulina, CMP: caseinomacropéptido, α-LA: α-lactalbúmina, BSA: seroalbuminabovina, Igs: inmunoglobulinas, LF: lactoferrina, LP: lactoperoxidasa, OPN: osteopontina, LZ: lisozima. MW: peso molecular, pl: punto isoeléctrico.

La mayoría de las proteínas listadas presentan actividades biológicas y efectos fisiológicos tales que son consideradas compuestos con propiedades funcionales, debido a que ejercen un rol beneficioso (o preventivo de enfermedad crónica) sobre el estado de salud y bienestar (Krissansen, 2007). Más aún, muchas de ellas, una vez que son parcialmente digeridas por distintas enzimas, dan lugar a péptidos bioactivos con mejores y nuevas actividades fisiológicas. Estas características brindan a la industria láctea y al mercado de ingredientes nuevas posibilidades basadas en el desarrollo de nuevos productos direccionados al creciente sector de la alimentación funcional (McIntosh *et al.*, 1998). Asimismo, la mayoría de las proteínas al estado puro muestran mejores propiedades funcionales respecto de las evidenciadas en el suero inicial o en mezclas con otras proteínas, de allí se deduce el gran interés por el desarrollo de tecnologías que posibiliten la recuperación de proteínas puras de manera eficiente tanto técnica como comercialmente (Huffman & Harper, 1999; Imafidon *et al.*, 1997).

PURIFICACIÓN INDUSTRIAL DE PROTEÍNAS DEL SUERO DE QUESO

Como ya fue mencionado, varias proteínas específicas con valor comercial se hallan presentes en el suero de queso. En términos generales, las pequeñas compañías producen un volumen medio de suero de 5.000 litros por día mientras que las grandes compañías generan al menos 250.000 litros diarios. De esto se deduce la importante inversión de capital que demanda el procesamiento del suero de queso para producir proteínas al estado puro a partir de esta fuente, situación que sólo puede ser afrontada por compañías de gran porte.

La purificación de proteínas específicas en el marco de la industria láctea implica el manejo y conocimiento profundo de la tecnología de filtración con sistemas de membranas -ultra y microfiltración, ósmosis reversa-. A estas escalas industriales, varias proteínas, fundamentalmente las mayoritarias presentes en el suero, pueden ser parcialmente purificadas empleando diferentes estrategias de precipitación.

En el caso de las proteínas minoritarias, su purificación demanda otros tipos de tecnología, como aquellas basadas en fenómenos adsortivos. Estos procesos implican la captura y separación -con mayor o menor grado de selectividad- de estas proteínas, separándolas del resto de los componentes del suero. Originalmente, estas estrategias fueron desarrolladas para la purificación de proteínas en el marco de las industrias biofarmacéuticas y biotecnológicas fundamentalmente, y forman parte de lo que se conoce como operaciones de “recuperación y purificación” de bioproductos. Los soportes empleados para la adsorción de estas proteínas, las matrices cromatográficas, pueden ser de diferentes materiales -desde polímeros naturales a plásticos sintéticos-, y las mayormente empleadas en la industria son elaboradas a base de agarosa modificada mediante el acoplamiento de diferentes “ligandos” a través de los cuales establecerán distintos tipos de interacción con las proteínas. Es así, que ligandos hidrofóbicos interactuarán con parches hidrofóbicos superficiales de las proteínas, mientras que los ligandos/matrices con grupos iónicos intercambiables interactuarán con los aminoácidos -u otros grupos- con carga opuesta de las proteínas. Existen también los ligandos de afinidad, con una mayor especificidad en la interacción, así como con una mayor “fuerza de atracción”. En este tipo de procesos adsortivos existen interacciones simultáneas involucrando uniones hidrofóbicas, electrostáticas, Van der Waals y/o puente de hidrógeno, entre la matriz de afinidad y la proteína.

La estrategia adsorptiva más ampliamente utilizada para la purificación de las proteínas del suero de queso es la cromatografía de intercambio iónico. Dependiendo de su punto isoeléctrico (pI) y el pH del medio, una proteína puede presentar una carga neta positiva o negativa, por lo tanto, el procesamiento del suero de queso mediante cromatografía de intercambio aniónico o catiónico puede ser empleado para la purificación de proteínas individuales o grupos de proteínas. En estos procesos, las proteínas son adsorbidas sobre el material cromatográfico mediante fuerzas electrostáticas y luego de sucesivos lavados -en los que son removidos los componentes del suero que no interactúan con la matriz- se procede a la desorción o elución de las proteínas mediante el incremento en la fuerza iónica o bien mediante el cambio del pH de la solución buffer empleada para este paso.

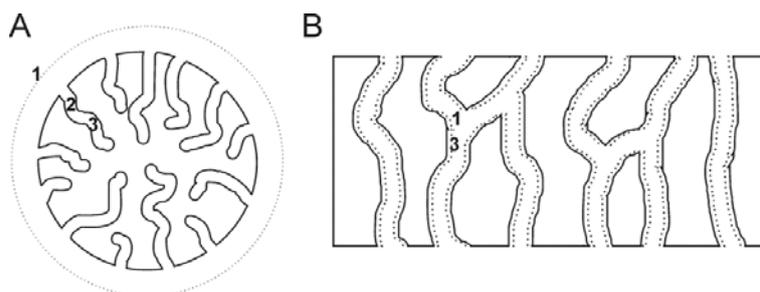


Figura 2. Comparación entre cromatografía basada en partículas o en membranas. A) Sistema basado en partículas. B) Sistema basado en membranas. 1. Difusión en el film, 2. Difusión en el poro, 3. Cinética de unión.

Los soportes cromatográficos comerciales tradicionalmente empleados en cromatografía de intercambio iónico están basados en partículas esféricas con grupos iónicos cargados negativa o positivamente. Se comercializan con diferentes tamaños de partícula, que varía de los 15 a los 300 μm , y generalmente presentan una gran superficie interna por tratarse de materiales porosos (**Figura 2A**). Este tipo de sistemas puede emplearse en la modalidad de tanque agitado (*batch*) o en la modalidad de lecho empacado, en la que la muestra es forzada a fluir a través del material cromatográfico adecuadamente empacado. En estos sistemas basados en adsorbentes particulados, la adsorción de las proteínas está afectada y limitada por los fenómenos de difusión. La proteína debe difundir del seno de la solución a la capa de hidratación alrededor de las partículas y de allí al interior del poro que es donde se halla la mayor densidad de ligandos capaces de establecer las interacciones específicas con ellas, siendo este último aspecto afectado por las respectivas cinéticas de adsorción cada proteína-ligando. Cuanto mayor sea el tiempo requerido por la proteína para difundir al interior del poro de la partícula cromatográfica, mayor será el tiempo requerido para el procesamiento y por lo tanto menor será la productividad del sistema empleado. De este modo, al emplear partículas más pequeñas, se reducen los tiempos afectados a la difusión, pero surgen otros inconvenientes, como es el aumento en la contrapresión del sistema pudiendo llegar incluso a la oclusión del mismo en el caso del lecho empacado, o bien se puede dificultar la separación del material cromatográfico del medio del que se pretende capturar la proteína en el sistema *batch*, puesto que cuanto más pequeña sea la partícula, menor será su coeficiente de sedimentación.

En el caso particular del suero de queso, por tratarse de un material crudo que puede contener tanto partículas suspendidas con componentes grasos como una elevada carga de solutos, los sistemas cromatográficos basados en partículas presentan limitaciones. El pretratamiento del suero en estos casos es necesario para mejorar su procesabilidad y evitar por ejemplo la oclusión de la columna cromatográfica

al trabajar en condiciones de lecho empacado. Además, con el objeto de mejorar la eficacia de los procesos cromatográficos, muchas veces el suero debe ser pre-concentrado previo a la purificación de proteínas presentes en bajas concentraciones, reduciéndose también el volumen a procesar del material de partida. En relación con este último aspecto, los enormes volúmenes que son necesarios procesar para producir cantidades industrialmente significativas de sus proteínas con mayor valor comercial –debido a su baja concentración- representa también un importante desafío. Los aspectos asociados a la difusión de las proteínas hacia el interior del poro de las partículas cromatográficas, limitan la velocidad del procesamiento del suero de queso.

Con el objeto de salvar las dificultades antes mencionadas, existe un desarrollo continuo de nuevos soportes cromatográficos y sus modos de empleo. En relación a los sistemas basados en columnas cromatográficas de lecho empacado, se han desarrollado partículas con diámetros mayores a los convencionales ($\geq 300 \mu\text{m}$), lo que evita el incremento en la contrapresión del sistema y el bloqueo de la columna, sin que se vea afectada la *performance* de los procesos de purificación, sobre todo en relación a los rendimientos (Etzel, 2004; Fee & Chand, 2006; Kussendrager *et al.*, 1997; Liang *et al.*, 2011). En este sentido, se han desarrollado mini esferas de quitosano de alta porosidad (90%) derivatizadas con diferentes ligandos para purificar diferentes proteínas minoritarias del suero en modo *batch* y sin la necesidad de pre-acondicionamiento del material de partida (Baieli *et al.*, 2014 y 2017). Este tipo de sistemas podría ser implementado por compañías de porte pequeño y mediano con una menor inversión de capital respecto de los procesos convencionales.

Los sistemas cromatográficos basados en membranas adsorptivas implican el empleo de membranas –fundamentalmente de microfiltración- sobre las que se inmovilizan diferentes ligandos en las paredes internas de sus poros, pudiendo de esta forma establecer interacciones específicas con proteínas (**Figura 2B**). En estos sistemas, los fenómenos de transporte de masa están principalmente gobernados por fenómenos de convección más que de difusión. El mismo flujo convectivo transporta a las proteínas a la superficie interna de los poros de las membranas, y desaparece por tanto el fenómeno de difusión hacia el interior del poro, que es el principal limitante de la velocidad de estos procesos cromatográficos (Thöemmes & Kula, 1995). Los sistemas convectivos permiten el procesamiento a elevadas velocidades sin que se vea afectada la capacidad de adsorción de las proteínas. Más aún, el uso de las membranas adsorptivas en combinación con procesos de filtración tangencial, como es el caso de los sistemas basados en membranas de fibra hueca, posibilita el procesamiento de grandes volúmenes de muestras -que pueden incluso contener material particulado- en cortos períodos de tiempo en comparación a otros sistemas cromatográficos (Plate *et al.*, 2006; Voswinkel & Kulozik, 2014; Wolman *et al.*, 2007). Sin embargo, en la práctica industrial, las membranas adsorptivas no logran aún su inserción debido a sus relativamente bajas capacidades adsorptivas, a los problemas del taponamiento y a cierta complejidad operativa propia de estos sistemas (Saxena *et al.*, 2009; Steinhauer *et al.*, 2015a and 2015b).

En las siguientes secciones se discutirán algunos procesos industriales de purificación, fundamentalmente basados en precipitación y en sistemas cromatográficos particulados. Además de describirán nuevos desarrollos tecnológicos para afrontar problemas inherentes a la procesabilidad del suero de queso.

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DEL SUERO DE QUESO. PROCESOS USADOS EN LA INDUSTRIA

En el suero de queso, algunas proteínas están presentes en baja proporción y sus propiedades funcionales específicas no se manifiestan en el suero crudo. Generalmente, las técnicas desarrolladas para el aislamiento de las proteínas se pueden dividir en dos categorías: las que apuntan a recuperar de forma no selectiva la masa total de proteínas del suero (procesos denominados “recuperación de proteínas del suero”) y las que apuntan a recuperar de forma selectiva una o un grupo específico de proteínas del suero para un propósito específico o una propiedad funcional en particular (procesos denominados “fraccionamiento de las proteínas del suero”)(Pearce, 1992).

Como ya fue discutido, el empleo de la tecnología de filtración con membranas, posibilitó la recuperación de las proteínas del suero de queso para dar lugar a diferentes productos como los WPC, WPI, sueros reducidos en lactosa, sueros desmineralizados y WPH (Ganju & Gogate, 2017; Mollea *et al.*, 2013). Otra estrategia implementada en la recuperación de las proteínas del suero es el empleo de procesos de desnaturalización térmica y coagulación. La aplicación de temperaturas superiores a los 80°C da lugar a la desnaturalización proteica seguida de coagulación bajo condiciones específicas de pH y fuerza iónica (Pearce, 1992; Yadav *et al.*, 2015). El precipitado obtenido en estos casos es posteriormente lavado para remover excesos de sal y lactosa y sometido finalmente a un secado por spray, de esta forma el producto obtenido es comercializado como un WPI. Sin embargo, en este tipo de WPI las proteínas se encuentran desnaturalizadas y por tanto se pierden sus propiedades biológicas. Distintos WPH son obtenidos a partir de estos WPI empleando diferentes proteasas animales, bacterianas o fúngicas o combinaciones de estas enzimas. Estos hidrolizados proteicos presentan una mayor solubilidad que los WPI de partida en un amplio rango de valores de pH y los péptidos generados conservan muchas de las funciones atribuidas a las proteínas nativas (Brandelli *et al.*, 2015; Davis *et al.*, 2006).

Las proteínas mayoritarias del suero de queso también pueden ser precipitadas de manera selectiva. Cuanto más cercano al pI de una proteína sea el pH de la solución, menor será la solubilidad de esa proteína y mostrará una tendencia a la agregación en condiciones de baja fuerza iónica. Por ejemplo, la α -lactoalbúmina puede obtenerse por precipitación directa del suero ajustando el pH a 4,2 y calentando a 65°C. De esta forma se obtiene un sobrenadante depletado de α -lactoalbúmina y enriquecido en las proteínas remanentes como la β -lactoglobulina (de Wit & Bronts, 1995; Pearce, 1983; Yadav *et al.*, 2015). De modo similar, pueden obtenerse precipitados de esta última proteína a partir de sueros desmineralizados mediante el ajuste del pH a 4,65 sin necesidad de tratamiento térmico (Amundson *et al.*, 1982; de Wit & Bronts, 1995; Etzel, 2004; Pearce, 1992).

La aplicación de la cromatografía de intercambio iónico posibilita el fraccionamiento de las proteínas del suero del queso para la obtención de diferentes productos comerciales. Si se considera la aplicación a nivel alimenticio de estos productos, hay que tener en cuenta que las matrices cromatográficas empleadas deben cumplir con los requerimientos regulatorios exigidos por las autoridades competentes. El adsorbente debe ser física y químicamente estable, posibilitar operaciones en condiciones de elevado flujo operativo y ser mecánicamente estable en las condiciones de presión de trabajo del material (especialmente en los sistemas de lecho empacado) permitiendo su reutilización en múltiples ciclos sucesivos, debe ser estable a las condiciones de limpieza y sanitización, ser asequible y de bajo costo, tener una porosidad adecuada tal que asegure el ingreso de las moléculas proteicas y una capacidad adsorptiva suficientemente elevada, no debe ser tóxico y no deben desprenderse restos del material ni liberarse algún grupo químico en las condiciones de

uso a lo largo del tiempo. Estos últimos requerimientos son las principales características que deben satisfacer los soportes cromatográficos para ser considerados de “grado alimenticio” por las autoridades regulatorias de cada país.

En términos generales, la cromatografía en lecho empacado es elegida por sobre la cromatografía en *batch*. En esta última el suero de queso es agitado en un tanque o reactor junto con el material cromatográfico particulado. La adsorción tiene lugar por un período de tiempo, pudiendo el sistema evolucionar o no a la condición de equilibrio. Luego, la matriz cromatográfica es lavada y finalmente las proteínas adsorbidas son eluidas. Los procesos de purificación en modo *batch* son procesos de baja productividad en función del elevado tiempo de operación, puesto que cada etapa requiere la recuperación de la matriz cromatográfica, el vaciado y el posterior rellenado del tanque con las diferentes soluciones. La adsorción en *batch* se prefiere para la captura de proteínas a partir de muestras crudas y/o complejas como es el suero sin previa clarificación. Por otro lado, en el caso de los procesos en columna, las partículas cromatográficas son empacadas en una columna y las diferentes soluciones pasan a través del lecho empacado. Esto implica la previa clarificación y filtración del material de partida para prevenir la oclusión de la columna por partículas de tamaño mayor a los espacios inter-partículas del material cromatográfico. En ambos modos operativos, la captura de las proteínas sobre el material adsorbente facilita su concentración, ya que tanto el volumen del adsorbente como el volumen de la solución empleada para la elución, son muy inferiores al volumen de suero de queso procesado. La combinación de ambos modos operativos es también una alternativa viable, procediendo a la etapa de adsorción en *batch* y a las etapas subsiguientes en condición de lecho empacado.

En algunos casos, todas las proteínas presentes en la mezcla son adsorbidas en forma simultánea, los contaminantes lavados, y luego cada proteína es eluida en forma selectiva. Este es el caso de varias proteínas comerciales derivadas del suero de queso. Luego de una etapa de clarificación y remoción de lípidos, el pH del suero se ajusta a 4,0 y se hace fluir a través de una columna intercambiadora de cationes. En función del pI de las proteínas de suero (**Tabla 1**), en esa condición de pH la mayoría de las proteínas adquieren carga neta positiva y son por tanto capaces de interactuar con matrices cromatográficas con carga negativa, mientras que el CMP, la lactosa y los minerales, pasan a través de la columna sin ser retenidos. Luego de varios lavados para remover los contaminantes inespecíficamente adsorbidos, las proteínas pueden ser eluidas mediante un cambio de pH o un incremento de fuerza iónica de la solución empleada para la desorción. Una posibilidad es eluir todos los componentes proteicos juntos en un único paso, para obtener en este caso un WPI no desnaturalizado, libre de lactosa y minerales y parcialmente libre de CMP. Este WPI presenta mejores propiedades de solubilidad respecto del WPI obtenido por coagulación (Pearce, 1992). Otra posibilidad es la elución selectiva de la α -lactalbúmina (pI 4,4) empleando una solución de fuerza iónica moderada y luego eluir cuantitativamente el resto de las proteínas adsorbidas (Etzel, 2004). Este proceso da lugar a dos productos comerciales: α -lactalbúmina con pureza mayor al 80% y un WPI enriquecido en β -lactoglobulina con bajo contenido en α -lactalbúmina. En este caso, la mayor parte del CMP, la lactosa y los minerales pasan a través de la columna empacada con el intercambiador de cationes cuando el pH es de 4,0. A este valor de pH o a menores, el CMP se encuentra en la forma de monómero con un peso molecular de 9 kDa. Sin embargo a valores de pH de 5,0 o mayores, el CMP se encuentra en la forma de polímero y su peso molecular es de 45-50 kDa. De esta forma, al variar de 4,0 a 7,0 el pH del material que no interaccionó con la matriz cromatográfica, el CMP forma un agregado que puede separarse del resto de los contaminantes (lactosa y minerales) mediante el empleo de sistemas de membranas de ultrafiltración con valores de corte de 10 kDa y en condiciones de filtración tangencial. Esto da lugar a nuevos productos puros (CMP con pureza mayor al 90%) para su comercialización (Davis *et al.*, 2002; Kawasaki *et al.*, 1993).

Otras proteínas del suero de queso que se comercializan son la LF y la LP. Éstas son las proteínas con mayor pI (**Tabla 1**) y pueden interactuar con una matriz intercambiadora de cationes a valores de pH de 7,0 mientras que el resto de las proteínas del suero pasan sin interactuar a través del soporte cromatográfico. Debido a la baja concentración en que se encuentran estas proteínas, el suero usualmente debe ser previamente concentrado y acondicionado para mejorar la *performance* del proceso cromatográfico. Otra alternativa es la remoción previa de las proteínas mayoritarias para asegurar una adecuada y rápida adsorción de LF y LP a la matriz cromatográfica. Como ya se mencionó, para ser procesado en condición de lecho empacado, el suero debe ser previamente clarificado y desgrasado para evitar la oclusión y el incremento en la contrapresión del sistema (Fee & Chand, 2006; Fweja *et al.*, 2010; Okonogi *et al.*, 1988; Ye *et al.*, 2000).

NUEVAS ESTRATEGIAS Y DESARROLLOS RECIENTES

En los últimos 15 años, el sector lácteo-industrial ha empleado matrices cromatográficas de grado alimenticio para la purificación de proteínas del suero de queso con tamaños de partícula mayores a las empleadas tradicionalmente en las industrias biotecnológicas y biofarmacéuticas (~300 μm versus ~50 μm). En el caso de las operaciones en lecho empacado, el uso de mayores tamaños de partículas en el material adsorbente previene –como fue mencionado- tanto el aumento en la contrapresión del sistema como el taponamiento del mismo, y posibilita el procesamiento a mayores velocidades. Más aún, en el caso del modo *batch*, estas mayores partículas poseen un mayor coeficiente de sedimentación lo que facilita la separación de la matriz del sobrenadante (Etzel, 2004; Fee & Chand, 2006; Kussendrager *et al.*, 1997; Liang *et al.*, 2011). Sin embargo, aún utilizando tales matrices cromatográficas, el suero de queso debe ser acondicionado para su procesamiento. Por ejemplo, para una columna empacada con partículas cromatográficas de 200 μm de diámetro, el suero debe ser filtrado con filtros con poros de alrededor del 4% del diámetro de la partícula para prevenir el taponamiento de la columna. En este caso, la filtración del suero debería ser llevada a cabo con una malla con poro de 8 μm (Etzel, 2004). Por otro lado, para garantizar la rentabilidad favorable de los procesos y considerando al material cromatográfico como uno de los insumos de mayor costo, debe asegurarse su durabilidad y empleo en múltiples ciclos de utilización. En este sentido, el suero de queso tiende a atentar contra la vida útil de estos materiales al “envenenarlos” con material lipídico residual (Pearce, 1992). Por lo tanto, un pre-tratamiento de deslipidación es usualmente implementado para aumentar la vida útil del material cromatográfico y maximizar el rendimiento de los productos purificados. La reutilización del material cromatográfico resulta realmente determinante para asegurar procesos económicamente competitivos. En este sentido surgieron nuevos desarrollos cromatográficos tendientes a eliminar la necesidad de pre-tratamiento del suero para su procesamiento. Como ejemplo, pueden mencionarse mini esferas de quitosano de elevada porosidad y modificadas con diferentes ligandos, que han sido exitosamente empleadas en la escala de laboratorio para la purificación de diferentes proteínas a partir del suero de queso crudo en el modo operativo *batch*. Se utilizaron mini esferas de quitosano derivatizadas con el colorante triazínico Yellow HE-4R –colorante textil de bajo costo- para la purificación de LF- (Baieli *et al.*, 2014). En una única operación cromatográfica, se logró purificar LF con un nivel de pureza del 90% y con un rendimiento del 77%. Vale destacar la elevada pureza del producto alcanzada, que supera a la obtenida empleando los procesos cromatográficos de intercambio iónico actualmente utilizados industrialmente. En la **Figura 3** se muestra el análisis por SDS-PAGE de tres procesos consecutivos de purificación empleando estas matrices.

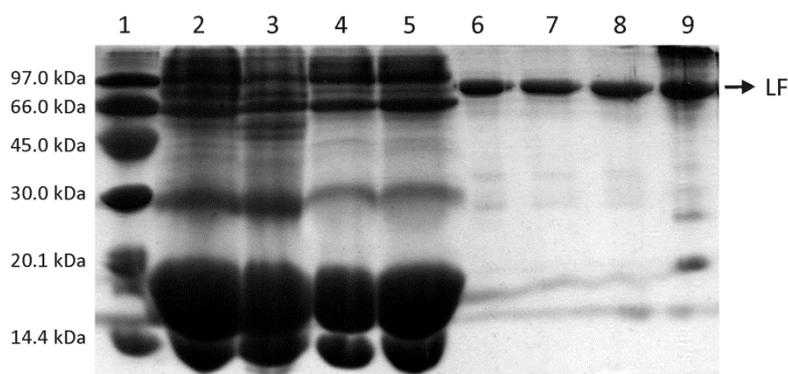


Figura 3. Proceso de purificación de LF usando mini-esferas de quitosano con el colorante triazínico Yellow HE-4R como ligando, analizado por SDS-PAGE 15%. Calles: 1, estándares de peso molecular; 2, suero del queso; 3, sobrenadante luego del primer ciclo de adsorción; 4, sobrenadante luego del segundo ciclo de adsorción; 5, sobrenadante luego del tercer ciclo de adsorción; 6, eluato del primer ciclo; 7, eluato del segundo ciclo; 8, eluato del tercer ciclo; 9, LF comercial (2 mg/mL).

De modo similar a la LF, la LP muestra afinidad por varios colorantes triazínicos (Urtasun *et al.*, 2017). En un único paso de purificación, empleando mini esferas de quitosano derivatizadas con el colorante Orange R-HE y procesando el suero de queso sin previo tratamiento, se logró purificar la proteína con rendimientos del 80%, aún cuando la concentración de la LP en el suero es muy baja (0,03 g/L, Tabla 1).

Desde la misma perspectiva, mini esferas de quitosano con lectina de germen de trigo (WGA) inmovilizada como ligando han sido empleadas en la purificación del CMP con niveles aceptables de rendimiento. Al emplear en modo *batch* estas matrices fue posible adsorber el 80% del CMP del suero sin ningún tipo de acondicionamiento del mismo. El CMP, además de carecer de aminoácidos aromáticos, posee elevados niveles de treonina, por lo que su remoción del suero, disminuye los niveles de este aminoácido generando un producto (suero con niveles reducidos de treonina) con mejores propiedades para la formulación de alimentos para lactantes, puesto que ha sido reportado que altos niveles de treonina en leches formuladas puede contribuir a un inadecuado desarrollo del cerebro en neonatos (Baielei *et al.*, 2017).

Otro desarrollo para la purificación de LF evaluado a escala de laboratorio implica el uso de membranas de microfiltración de fibra hueca sobre las que se inmovilizó covalentemente el colorante triazínico Red HE-3B. Estos sistemas fueron comparados con sistemas basados en partículas comerciales de *Sepharose*TM derivatizadas con el mismo colorante y en condición de lecho empacado. Si bien ambos sistemas mostraron niveles de pureza del producto y rendimientos similares, los sistemas de membranas lograron un incremento en la productividad del 200% debido a la naturaleza fundamentalmente convectiva de este tipo de soportes (Wolman *et al.*, 2007), que permite operar a flujos elevados sin que se modifique la resolución.

De modo similar, también han sido desarrolladas membranas planas de intercambio de cationes y aplicadas a la purificación de LF, LP y lactoferrina, un pequeño péptido derivado de la digestión proteolítica de la LF con mayores propiedades antimicrobianas (Plate *et al.*, 2006). Los sistemas de membranas han sido también empleados en procesos de cromatografía radial para el fraccionamiento de las proteínas del suero utilizando tanto intercambiadores de cationes como de aniones, con rendimientos comparables a los obtenidos por métodos cromatográficos convencionales para las proteínas mayoritarias del suero de queso (Voswinkel & Kulozik, 2014).

Otro desarrollo interesante ensayado a escala de laboratorio es el empleo de columnas monolíticas basadas en criogeles. En estos sistemas, a través de la trama de canales o poros interconectados –con tamaños que varían de 10 a 200 μm –, se ha hecho fluir leche entera y suero de queso a velocidades relativamente elevadas sin que ocurran fenómenos de oclusión del material cromatográfico. Los fenómenos de transporte de masa son fundamentalmente gobernados por convección más que por difusión y por tanto pueden lograrse buenos niveles de productividad. Empleando esta tecnología se logró la purificación de LF con buenos rendimientos, aunque la capacidad adsorptiva del material es relativamente baja (Billakanti & Fee, 2009) y el procesamiento del suero demanda de mucha cantidad de matriz cromatográfica. Existen nuevos desarrollos que combinan los monolitos a base de criogeles con pequeñas partículas macroporosas en su interior a modo de incrementar las capacidades de adsorción de proteínas de estos sistemas (Pan *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

Muchas de las proteínas individuales han mostrado poseer una mejor funcionalidad al estado puro que en la mezcla nativa, lo que abre nuevos mercados para la industria láctea y de ingredientes. Para ser tecnológicamente escalable y económicamente viable tanto el proceso de recuperación de las proteínas del suero como su fraccionamiento deben ser simples, operativamente sencillos y se debe considerar el costo así como el valor de mercado del producto final. Más aún, el éxito y la llegada al mercado de los productos proteicos obtenidos del suero de queso, depende también de ciertos requerimientos del sector alimenticio, respecto de las propiedades funcionales del producto, así como las organolépticas y nutricionales y la confiabilidad en el empleo de los mismos para su uso en distintas formulaciones.

La industria láctea debería ser capaz de disponer de una matriz productiva que le permita cambiar de forma dinámica apuntando a diferentes productos en función de las demandas variables del mercado. Una rápida y flexible respuesta a estas demandas mejora las oportunidades y la competitividad de las compañías. Más aún, si los costos globales asociados a la manufactura se reparten entre varios productos proteicos a obtener del suero, el costo por cada uno de ellos será menor. En este contexto, la industrialización del suero de queso para obtener productos de alto valor agregado –incluyendo proteínas específicas puras– demanda una importante inversión de capital, una situación que puede ser afrontada solamente por las grandes compañías lácteas. En contraste, las pequeñas compañías podrían especializarse en el empleo del suero de queso o de los permeados ricos en lactosa para procesos que requieren una menor inversión de capital, como el empleo de estos materiales como sustratos en procesos enzimáticos o fermentativos para producir diferentes productos –bioplásticos, biomasa, probióticos, etc– en función de las diferentes demandas del mercado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amundson, C.H., S. Watanawanichakorn & C.G. Hill Jr (1982) Production of enriched protein fractions of beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin from cheese whey. *J. Food Process Preserv.* **6**: 55-71.
- Baieli, M.F., N. Urtasun, M.V. Miranda, O. Cascone & F.J. Wolman (2014) Isolation of lactoferrin from whey by dye-affinity chromatography with Yellow HE-4R attached to chitosan mini-spheres. *Int. Dairy J.* **39**: 53-59.
- Baieli, M.F., N. Urtasun, M.J. Martinez, D.B. Hirsch, A.M.R. Pilosof, M.V. Miranda, O. Cascone & F.J. Wolman (2017) Affinity chromatography matrices for depletion and purification of casein glycomacropptide from bovine whey. *Biotechnol. Progr.* **33**: 171-180.

- Baldasso, C., T.C. Barros & I.C. Tessaro (2011) Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination* **278**: 381-386.
- Billakanti, J.M. & C.J. Fee (2009) Characterization of cryogel monoliths for extraction of minor proteins from milk by cation exchange. *Biotechnol. Bioeng.* **103**: 1155-1163.
- Boots, J.W. & R. Floris (2006) Lactoperoxidase: From catalytic mechanism to practical applications. *Int. Dairy J.* **16**: 1272-1276.
- Brandelli, A., D.J. Daroit & A.P.F. Corrêa (2015) Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Res. Int.* **73**: 149-161.
- Bylund, G. (1995) *Dairy processing handbook*, Tetra Pak Processing Systems AB, Lund.
- Castells, M.L. & E. Schmidt (2013) *Desarrollo de productos seleccionados a base de suero lácteo*. Disertación en INTI Lácteos, Buenos Aires, Argentina.
- Chandan, R.C., R.M. Parry & K.M. Shahani (1968) Lysozyme, Lipase, and Ribonuclease in Milk of Various Species. *J. Dairy Sci.* **51**: 606-607.
- Chatterton, D.E.W., G. Smithers, P. Roupas & A. Brodkorb (2006) Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin— Technological implications for processing. *Int. Dairy J.* **16**: 1229-1240.
- Christensen, B. & E.S. Sørensen (2016) Structure, function and nutritional potential of milk osteopontin. *Int. Dairy J.* **57**: 1-6.
- Davis, M.E., F. Ming, S.X. Su, M. Yang, M. & A. Ichinomiya (2002) *Large scale production of low fat and SDS gel pure kappa-casein glycomacropeptides (GMP) from bovine deproteinized whey*. US20020183489A1.
- Davis, M.E., A. Rao, S. Gauthier, Y. Pouliot, L. Gourley & A.F. Allain (2006) *Enzymatic treatment of whey proteins for the production of antihypertensive peptides and the resulting products*. US006998259B1.
- de Wit, J.N. & H. Bronts (1995) *Process for the recovery of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin from a whey protein product*. US005420249A.
- Etzel, M.R. (2004) Manufacture and use of dairy protein fractions. *J. Nutr.* **134**: 996S-1002S.
- Fee, C.J. & A. Chand (2006) Capture of lactoferrin and lactoperoxidase from raw whole milk by cation exchange chromatography. *Sep. Purif. Technol.* **48**: 143-149.
- Fox, P.F. & A.L. Kelly (2006) Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects. Part 2. *Int. Dairy J.* **16**: 517-532.
- Fweja, L.W.T., M.J. Lewis & A.S. Grandison (2010) Isolation of lactoperoxidase using different cation exchange resins by batch and column procedures. *J. Dairy Res.* **77**: 357- 367.
- Ganju, S. & P.R. Gogate (2017) A review on approaches for efficient recovery of whey proteins from dairy industry effluents. *J. Food Eng.* **215**: 84-96.
- Ghaly, A.E., N. Mahmoud, D. Rushton & F. Arab (2007) Potential Environmental and Health Impacts of High Land Application of Cheese Whey. *Am. J. Agr. Biol. Sci.* **2**: 106-117.
- González Siso, M.I. (1996) The biotechnological utilization of cheese whey. *Bioresour. Technol.* **57**: 1-11.
- González, M. (2013) *Utilización actual del suero de quesería*. Disertación en INTI Lácteos, Buenos Aires, Argentina.
- Greene, L.H., J.A. Grobler, V.A. Malinovskii, J. Tian, K.R. Acharya & K. Brew (1999) Stability, activity and flexibility in α -lactalbumin. *Protein Eng. Des. Sel.* **12**: 581-587.
- Gunasekaran, S., S. Ko & L. Xiao (2007) Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. *J. Food Eng.* **83**: 31-40.
- Huffman, L.M. & W.J. Harper (1999) Maximizing the value of milk through separation technologies. *J. Dairy Sci.* **82**: 2238-2244.
- Imafidon, G.I., N.Y. Farkye & A.M. Spanier (1997) Isolation, purification, and alteration of some functional groups of major milk proteins: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **37**: 663-689.
- Kawasaki, Y., H. Kawakami, M. Tanimoto & S. Dosako (1993) *Large-Scale Preparation and Application of Caseinomacropeptide*. American Chemical Society, Washington DC.
- Krissansen, G.W. (2007) Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. *J. Am. Coll. Nutr.* **26**: 713S-723S.
- Kussendrager, K.D., M.G.C. Kivits & A.B. Verver (1997) *Process for isolating lactoferrin and lactoperoxidase from milk and milk products, and products obtained by such process*. US005596082A.

- Liang, Y., X. Wang, M. Wu & W. Zhu (2011) Simultaneous Isolation of Lactoferrin and Lactoperoxidase from Bovine Colostrum by SPEC 70 SLS Cation Exchange Resin. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **8**: 3764-3776.
- Marshall, K. (2004) Therapeutic applications of whey protein. *Altern. Med. Rev.* **9**: 136-156.
- McIntosh, G.H., P.J. Royle, R.K. Le Leu, G.O. Regester, M.A. Johnson, R.L. Grinsted, R.S. Kenward & G.W. Smithers (1998) Whey Proteins as Functional Food Ingredients?. *Int. Dairy J.* **8**: 425-434.
- Mollea, C., L. Marmo & F. Bosco (2013) *Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry*. InTech, London.
- Okonogi, S., M. Tomita, T. Tomimura, Y. Tamura & T. Mizota (1988) *Process for producing bovine lactoferrin in high purity*. US4791193.
- Pan, M., S. Shen, L. Chen, B. Dai, L. Xu, J. Yun, K. Yao, D.Q. Lin & S.J. Yao (2015) Separation of lactoperoxidase from bovine whey milk by cation exchange composite cryogel embedded macroporous cellulose beads. *Sep. Purif. Technol.* **147**: 132-138.
- Patel, S. (2015) Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead. *J. Funct. Foods* **19**: 308-319.
- Pearce, R.J. (1983) Thermal separation of beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin in bovine cheddar cheese whey. *Aust. J. Dairy Technol.* **38**: 144-149.
- Pearce, R.J. (1992) *Whey Protein Recovery and Whey Protein Fractionation*. En: *Whey and Lactose Processing*, J.G. Zadow, ed. Springer, Dordrecht.
- Plate, K., S. Beutel, H. Buchholz, W. Demmer, S. Fischer-Frühholz, O. Reif, R. Ulber & T. Scheper (2006) Isolation of bovine lactoferrin, lactoperoxidase and enzymatically prepared lactoferricin from proteolytic digestion of bovine lactoferrin using adsorptive membrane chromatography. *J. Chromatogr. A* **1117**: 81-86.
- Prazeres, A.R., F. Carvalho & J. Rivas (2012) Cheese whey management: a review. *J. Environ. Manage.* **110**: 48-68.
- Santos, M.J., J.A. Teixeira & L.R. Rodrigues (2012) Fractionation of the major whey proteins and isolation of β -Lactoglobulin variants by anion exchange chromatography. *Sep. Purif. Technol.* **90**: 133-139.
- Saxena, A., B.P. Tripathi, M. Kumar & V.K. Shahi (2009) Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: an overview. *Adv. Colloid Interface Sci.* **145**: 1-22.
- Smithers, G.W. (2008) Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’. *Int. Dairy J.* **18**: 695-704.
- Steinhauer, T., S. Hanély, K. Bogendörfer & U. Kulozik (2015a) Temperature dependent membrane fouling during filtration of whey and whey proteins. *J. Membr. Sci.* **492**: 364-370.
- Steinhauer, T., M. Marx, K. Bogendörfer & U. Kulozik (2015b) Membrane fouling during ultra- and microfiltration of whey and whey proteins at different environmental conditions: The role of aggregated whey proteins as fouling initiators. *J. Membr. Sci.* **489**: 20-27.
- Thöemmes, J. & M.R. Kula (1995) Membrane chromatography - an integrative concept in the downstream processing of proteins. *Biotechnol. Progr.* **11**: 357-367.
- Urtasun, N., M.F. Baieli, D.B. Hirsch, M.C. Martínez-Ceron, O. Cascone & F.J. Wolman (2017) Lactoperoxidase purification from **whey** by using dye affinity chromatography. *Food Bioprod. Process.* **103**: 58-65.
- Urtasun, N., M.F. Baieli, D.B. Hirsch, M.V. Miranda, O. Cascone & F.J. Wolman (2018) Challenges in dairy whey protein purification. En: *Handbook on Protein Purification: Industry Challenges and Technological Developments*, en prensa. N. Labrou, ed. Nova Science Publishers Inc, Hauppauge N.Y.
- Voswinkel, L. & U. Kulozik (2014) Fractionation of all major and minor whey proteins with radial flow membrane adsorption chromatography at lab and pilot scale. *Int. Dairy J.* **39**: 209-214.
- Wolman, F.J., D.G. Maglio, M. Grasselli & O. Cascone (2007) One-step lactoferrin purification from bovine whey and colostrum by affinity membrane chromatography. *J. Membr. Sci.* **288**: 132-138.
- Yadav, J.S., S. Yan, S. Pilli, L. Kumar, R.D. Tyagi & R.Y. Surampalli (2015) Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnol. Adv.* **33**: 756-774.
- Ye, X., S. Yoshida & T.B. Ng (2000) Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin, alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin B and beta-lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatography. *Int. J. Biochem. Cell B.* **32**: 1143-1150.