

## Estudio del comportamiento del hierro fijado sobre la caseína bovina y fosforilada luego de la hidrólisis producida por las proteasas digestivas

*Ana Luisa Medina Gallardo*

Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería.  
Universidad de Los Andes Edo. Mérida, Venezuela

**RESUMEN.** Los grupos fosfatos de la caseína nativa y fosforilada tienen la propiedad de secuestrar el hierro. La fijación del hierro depende de la tasa de fosforilación de la caseína. Los grupos fosfatos naturalmente presentes o ligados químicamente, constituyen los sitios de fijación preferenciales del hierro y modifican la constante de afinidad de la caseína vis-a-vis del mineral. La fosforilación y la fijación del hierro conllevan a una baja en la sensibilidad de la caseína ante las proteasas digestivas. Cualquiera que sea la enzima, la hidrólisis de la caseína que fijó el hierro produce péptidos capaces de conservar el mineral bajo la forma ligada. Esta retención crece con el número de grupos fosfatos asociados a la caseína.

**SUMMARY.** Behavior of iron on bovine and phosphorylated casein after hydrolysis produced by digestive protease. The phosphate groups of the native and phosphorylated casein have the property of sequestering the iron. This metal fixation depends on the casein's degree of phosphorylation. The phosphate groups either, naturally present or chemically binded, are the preferential fixation sites for iron. They modify the affinity constant of the casein respect to iron. Both, phosphorylation and ironfixation influence negativily the caseins sensibility to digestive protease. Whichever the enzyme might be, the hydrolysis of the casein with fixed iron produces fixed iron peptides. It seems that iron retention is a function of the number of phosphate groups associated to casein.

### INTRODUCCION

El promedio de proteínas por litro en una leche normal de bovino es de 30 a 35 gramos (1). Alrededor de 80% de estas proteínas son esencialmente caseínas, que se encuentran bajo la forma de complejos macromoleculares que contienen una parte mineral, conocidas bajo el nombre de micelas. Esta parte mineral puede existir bajo dos formas: 1) fijada sobre los grupos aniónicos, carboxílicos o fosfoserinas, 2) esencialmente bajo la forma de fosfato de calcio. Las caseínas presentes bajo esta forma, encierran hasta un 8% de constituyentes minerales.

Las caseínas son proteínas ácidas, ricas en ácido aspártico, y glutámico, de estructura desordenada debido a su riqueza en prolina, repartida a lo largo de la cadena proteica y a la escasez de residuos cisteínicos o puentes disulfuros; en razón a esta estructura muy particular, ellas son fácilmente aislables a pH 4,6. Se distinguen diferentes fracciones caseínicas, en las proporciones siguientes:  $\alpha_1$ : 45-55%,  $\alpha_2$ : 7-13%,  $\beta$ : 25-35%,  $\kappa$ : 8-15%,  $\gamma$ : 3-7%.

Las diferentes fracciones tienen un contenido de fósforo variable  $\alpha_1$  1%,  $\beta$  0,5%, y  $\kappa$  0,2%, se encuentran principalmente como monoésteres de fosfato de serina y de treonina. La caseína  $\alpha_1$  posee 8 grupos de fosfoserina, la caseína  $\beta$  posee 5, y la caseína  $\kappa$  no posee sino uno (2). Desde el punto de vista nutricional y tecnológico, estos grupos tienen una gran importancia debido a su capacidad para secuestrar el hierro (3,4,5). Diversos trabajos han mostrado que la fijación del hierro depende de la tasa de fosforilación de la caseína y que existe una competición entre el hierro y el calcio a nivel de los sitios de fijación (4,6,2). El hierro reacciona con los fosfatos de monoésteres ligados naturalmente a la serina y la fijación depende de la concentración en hierro, del pH, y de la fuerza iónica del medio. Por otro lado, numerosos estudios sobre la hidrólisis de la caseína por las enzimas digestivas han puesto en evidencia la formación de fosfopéptidos resistentes a la proteólisis (7,8). Una baja en la sensibilidad de la caseína fosforilada por las proteasas ha sido observado (9,10,11). Los fosfopéptidos son capaces de atravesar la barrera intestinal (12).

El hierro contenido en los alimentos es conocido por ser menos absorbido en el tracto gastrointestinal que las sales ferrosas. No solamente la forma bajo la cual el hierro es administrado es importante para la determinación de la proporción de hierro que puede ser absorbido, sino también la acción de las secreciones gástricas y pancreáticas, y la presencia de alimentos que contengan fosfatos y oxalatos han mostrado sus efectos particulares como inhibidores de la absorción del hierro (13).

Las numerosas propiedades funcionales y nutricionales de las proteínas se explican por los conocimientos y la comprensión de su estructura, propiedades físicas o mecánicas y las propiedades químicas.

Este trabajo tiene por objeto estudiar el comportamiento del hierro sobre la caseína nativa y fosforilada después de la acción de las proteasas digestivas.

La fosforilación química de la caseína por medio del oxiclورو de fósforo (POCl<sub>3</sub>) asegura la fijación del fósforo sobre los grupos hidroxilos de la serina, de la treonina y de la tirosina (14,15,16,17). Las uniones N-fosfatos pueden formarse sobre los grupos ε-aminados de la lisina (18,11). Esta reacción permite aumentar la capacidad fijadora de hierro de la caseína, aumentando el número de fosfatos (4,6).

## MATERIAL Y METODOS

**Preparación de la caseína:** A partir de leche fresca, se realizó una precipitación de la caseína a pH 4,6 con la ayuda de una solución normal de ácido clorhídrico. El precipitado es lavado varias veces y luego solubilizado con hidróxido de sodio normal. Su conservación se asegura por liofilización y empaque en sacos sellados herméticamente.

**Fosforilación de la caseína:** El oxiclورو de fósforo diluido al 20% (v/v) en tetra-cloruro de carbono es agregado a tasa constante, a una solución de caseína al 2% bajo fuerte agitación mecánica. La temperatura de la reacción es controlada y mantenida a 5°C. El pH es mantenido a 7 a través de un regulador que dispensa hidróxido de sodio 5N (15). La caseína así obtenida es purificada por decantación y centrifugación, y finalmente por cromatografía sobre Sefadex G50. La detección de la caseína se realiza a 280 nm.

La tasa de fosforilación corresponde a la relación fósforo/proteína. La proteína es determinada por el método de Kjeldahl y el fósforo por el método colorimétrico del molibdato de amonio a 760 nm (19).

**Fijación del hierro:** La fijación del hierro se realizó a través de la técnica de diálisis al equilibrio (2). La solución proteica al 2% es introducida en un tubo y dializada contra una solución de sulfato ferroso (Fe SO<sub>4</sub>) en agua destilada a pH 5,2. La diálisis es efectuada bajo agitación a 4°C durante 18 horas.

**Dosificación del hierro:** La dosificación del hierro fue reali-

zada por espectrofotometría de absorción atómica.

**Hidrólisis enzimática:** Las medidas del grado de hidrólisis por potenciometría a pH constante fueron realizadas utilizando la tripsina, la pancreatina y la pepsina como enzimas proteolíticas. Las relaciones enzima/sustrato utilizadas fueron 1/25; 1/10; 1/12,5 respectivamente (20).

Las hidrólisis de las soluciones de caseína al 1%, fueron efectuadas durante 40 minutos en una célula termo-regulada a 37°C. El pH es mantenido constante gracias a un pH=Stat Tacusel. El volumen de reactivo a agregar es medido gracias a un registro que está unido a una bureta automática.

## RESULTADO Y DISCUSION

### 1. Fijación del Hierro:

#### Influencia de la concentración del hierro

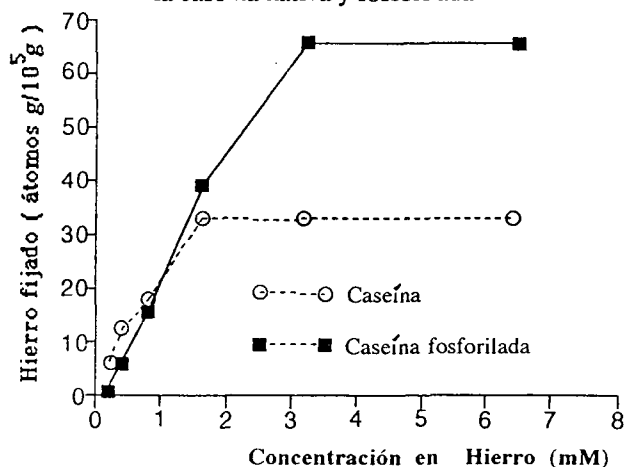
##### Curva de fijación

En este trabajo dos tipos de caseína fueron utilizadas: la caseína nativa que contiene 6 moles de fósforo por mol de caseína y la caseína fosforilada que contiene 21 mol de fósforo por mol de caseína (Cas P21).

Cualquiera que sea la caseína estudiada, la fijación del hierro aumenta con la concentración, hasta la saturación de todos los sitios. Por consiguiente observamos que la capacidad fijadora de la Cas P21 es más importante (Fig. N° 1), el número de grupos fosfatos fue más elevado.

FIGURA 1

Influencia de la concentración sobre la fijación de hierro de la caseína nativa y fosforilada

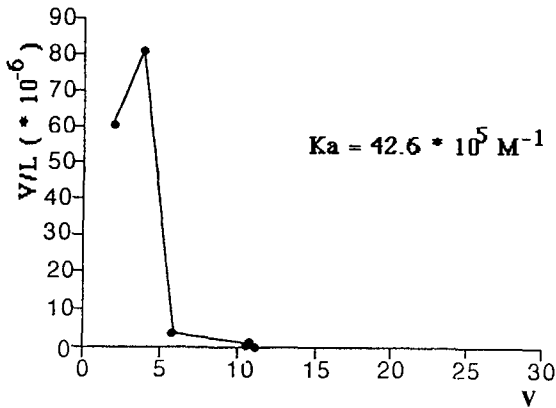


#### Representación de Scatchard

Esta representación es la recta  $v/L=f(v)$  con  $v$  que corresponde al número medio de sitios fijados por mol de proteína al equilibrio y  $L$  la concentración del ligante libre al equilibrio. Ella permite determinar el número de sitios de fijación preferenciales  $n$  (intersección con las abscisas) y la constante de afinidad  $K_a$  (pendiente de la recta).

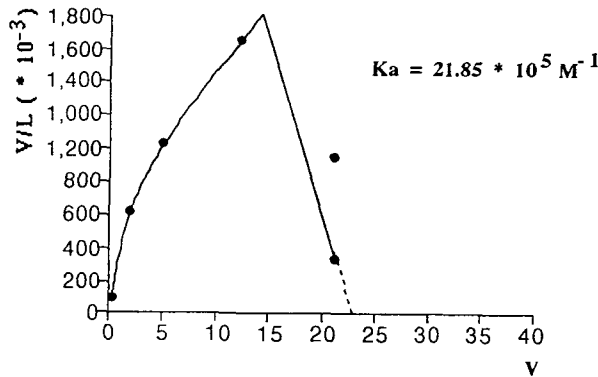
La caseína nativa presenta 6 sitios de fijación de fuerte afinidad por el hierro (Fig. N° 2) correspondiente a los 6 grupos de fososerina capaces de fijar cada uno un átomo. Estos resultados están de acuerdo con otros trabajos (21,4).

**FIGURA 2**  
Afinidad de la caseína nativa por el hierro



La fosforilación de la caseína aumenta el número de sitios de fuerte afinidad de 6 a 21 fosfatos (Fig. N° 3). El mayor poder secuestrante de la caseína es debido a su tasa de fosforilación más elevada.

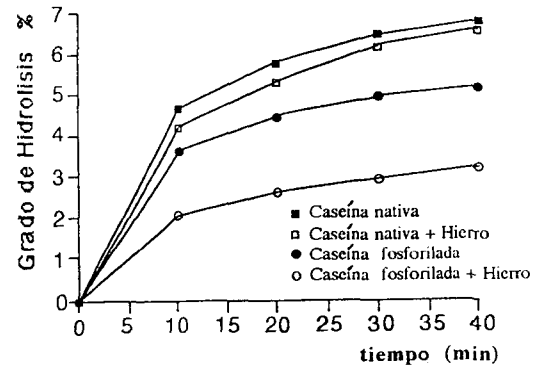
**FIGURA 3**  
Afinidad de la caseína fosforilada por el hierro



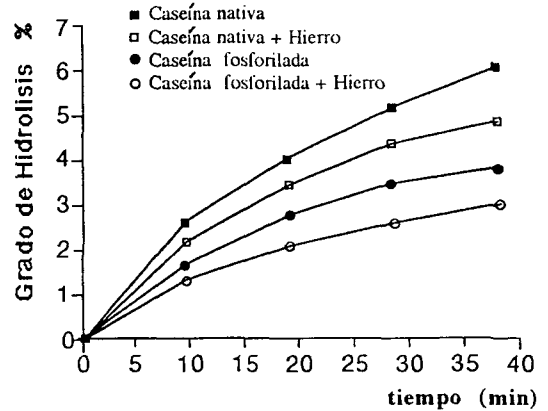
**2. Hidrólisis Enzimática:**

Las hidrólisis enzimáticas fueron efectuadas con tres enzimas: tripsina, pancreatina y pepsina sobre las caseínas nativas y fosforiladas. Las Figuras 4, 5 y 6 muestran la evolución del grado de hidrólisis en función al tiempo así como la influencia de la fosforilación y de la fijación del hierro sobre la sensibilidad de la caseína a las proteasas. Constatamos sobre las figuras ya citadas, que el más alto grado de hidrólisis lo presenta la caseína nativa, cualquiera que sea la enzima empleada.

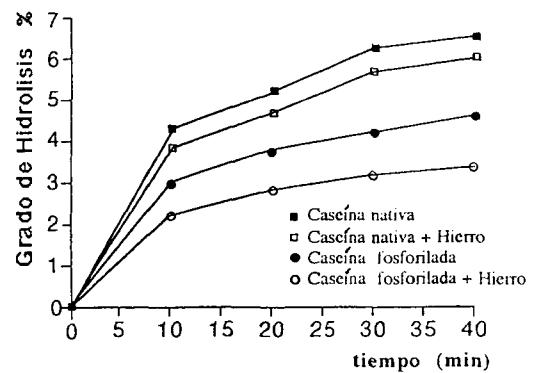
**FIGURA 4**  
Influencia de la fosforilación y de la fijación del hierro sobre la sensibilidad de la caseína a la tripsina



**FIGURA 5**  
Influencia de la fosforilación y de la fijación del hierro sobre la sensibilidad de la caseína a la pancreatina



**FIGURA 6**  
Influencia de la fosforilación y de la fijación del hierro sobre la sensibilidad de la caseína a la pepsina



El método del pH-stat (medida de la hidrólisis por potenciometría a pH constante) permite realizar el ataque enzimático a valores de pH 2 y 7 para ponerse artificialmente a los pH del estómago y del intestino durante la reacción. La digestibilidad es un importante factor que afecta la biodisponibilidad de los aminoácidos (22). Los test «in vitro» de digestibilidad son útiles en la evaluación de los diferentes tratamientos (calor, tratamientos con álcalis, ácidos) sobre la biodisponibilidad.

En el curso de la potenciometría, existe una buena correlación de la digestibilidad «in vitro e in vivo» después de la caída de pH durante los 10 minutos de proteólisis. La sensibilidad de las caseínas a las diferentes enzimas depende de la naturaleza de la enzima utilizada, así constatamos que la pancreatina que es una mezcla de endopeptidasas y exopeptidasas presenta la menor especificidad y por consiguiente el más alto grado de hidrólisis. La tripsina y la pepsina que son endopeptidasas son más específicas.

#### Efectos de la fosforilación:

Cualquiera que sea la naturaleza de la enzima, la caseína fosforilada es menos sensible a la hidrólisis. La fosforilación conlleva a una protección parcial de la caseína vis-a-vis de las enzimas proteolíticas al tener un porcentaje DH menor que la caseína nativa. Esto se podría deber al efecto estérico ocasionado por las moléculas de fósforo fijado. También se podría pensar en la presencia de cadenas de polifosfatos que impedirán el acceso de las enzimas a los sitios de ataque o al hecho que las enzimas no reconocerían sus sitios de acción, modificados por la fosforilación (lisina fosforilada, tirosina). La fosforilación produce un efecto inhibitorio no competitivo sobre la enzima, según se ha demostrado en otras investigaciones (11). De la misma manera otras modificaciones afectan la digestibilidad de la proteína, como la glicosilación (20) o la reducción de puentes disulfuros en las proteínas globulares compactas del lacto-suero bovino. Estos cambios reducen el grado inicial de digestibilidad (24).

#### Efectos de la fijación del hierro

Independientemente de la enzima y del tipo de caseína, la hidrólisis de la proteína que ha fijado hierro es más baja. Tomando en cuenta los resultados de este estudio, el hierro parece tener un efecto principalmente inhibitorio sobre las enzimas utilizadas durante la digestión «in vitro» de la caseína.

Otros trabajos han encontrado que los micro-elementos son factores que contribuyen a la reducción «in vitro» de la proteólisis (25). Se ha supuesto que el efecto del hierro no es solamente en relación con la bio-disponibilidad de los micro-elementos para formar complejos estables con las enzimas proteolíticas, sino también con su capacidad de reaccionar con los productos de descomposición de las proteínas. Cuando se hace la comparación con otros micro-elementos, el hierro forma uniones muy estables con las enzimas proteolíticas. Diferentes factores juegan sobre inhibición: concentración,

cantidad de otros micro-elementos, relación enzima/sustrato.

Antilla mostró que el efecto inhibitorio del hierro no sería debido al hierro fijado sobre la caseína, sino a un efecto directo sobre la tripsina (24). Otros estudios han puesto en evidencia el efecto inhibitorio del hierro sobre la proteólisis de la digestión «in vitro» de la pepsina, sobre la caseína, proteína de soya, hemoglobina. Cuando se compara con otros oligo-elementos, el hierro forma complejo muy estable con las enzimas proteolíticas.

La constante de estabilidad del hierro en diferentes compuestos es más elevada que aquellas de cualquier elemento.

### CONCLUSION

Este trabajo muestra la importancia de los grupos fosfatos sobre la fijación del hierro en la caseína. La fosforilación aumenta el poder secuestrante de la proteína vis-a-vis del hierro. Las diferentes proteólisis han mostrado que la fosforilación y la fijación del hierro conlleva a una baja digestibilidad. Tomando en cuenta la importancia del hierro en la nutrición y los problemas en su asimilación, estudios «in vivo» serán necesarios para estudiar la bio-disponibilidad de los complejos péptidos-hierro liberados por la digestión de la caseína que ha fijado hierro.

En la medida que los productos lecheros representan un vehículo para suplementar en hierro las poblaciones anémicas, sería importante definir las condiciones bajo las cuales el hierro se utiliza mejor; ellas dependen entre otra, de la forma bajo la cual la caseína es introducida en el régimen (26). La experimentación «in vivo» en ratas se hace necesaria para cualquier utilización. En este caso la fosforilación sin solvente que es técnicamente posible (26) es preferible.

### AGRADECIMIENTO

Al Dr. Mr. Denis Lorient. Jefe del Departamento de Bioquímica y Toxicología de Alimentos. Escuela Superior de Biología Aplicada a la Nutrición y a la Alimentación. Université de Bourgogne-Francia. Por su apoyo y facilidades para la realización de este trabajo.

### REFERENCIAS

1. Cheftel J.C., Cuq J.L., Lorient D. Les protéines du lait. Lu: Protéines Alimentaires. Tech et Doc., Lavoisier, París, 1985.
2. Dickson I.R. et Perkins D.J. Studies on the interactions between purified bovine caseins and alkaline earth metal ions. *Biochem J.* 124:235-240, 1971.
3. Delmont R.I. et Dincer B. Binding added iron to various milk proteins. *J Dairy Sci.*, 59:1157-1159, 1976.
4. Brule G., Frauquant J. Interactions des protéines du lait et des oligoéléments. *Le Lait*, 62:323-331. 1982.
5. West D.W. Structure and function of the phosphorylated residues of casein. *J. Dairy Res.*, 53:333-352. 1986.

6. Causeret D. Influence de la phosphorylation de la caséine bovine sur sa capacité de fixation des éléments minéraux: cas du calcium magnésium fer et cuivre. Mémoire de fin d'études. ENS.BANA, Université de Bourgogne. 1986.
7. Mellander O. et Isaksson B. The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts I: Intravenous and peroral calcium dosage in animal experiments. Acta Soc. Med. Upsal, 55:239-246. 1950.
8. Naito H., Kawakami A., Inuamura T. In vivo formation of phosphopeptide with calcium-binding property in the small intestinal tract of the rat fed on casein Agr. Biol. Chem, 36:409-413. 1972.
9. Fradel A. Optimisation de la phosphorylation de la caséine, Séparation des différentes fractions par chromatographie liquide. Influence de la phosphorylation sur la sensibilité aux protéases. DEA, ENS.BANA, Université de Bourgogne. 1986.
11. Duranton E. Etude de l'influence de la phosphorylation sur la sensibilité de la caséine aux protéases; nature des sites de fixation du phosphore. Mémoire de fin d'études, ENS.BANA, Université de Bourgogne. 1985.
12. Scheiki H. & Hemings W.A. I.R.C.S. Medical Science 9:1030-1033. 1981.
13. Peters T., Apt. L. et Ross J.F. Effects of phosphates upon iron absorption studied in normal human subjects and in an experimental model using dialysis. Gastroenterology, 61:315-322. 1971.
14. Ullman B. & Perlman R.I. Chemically phosphorylated protamine: a substrate for the study of phosphoprotein phosphatase activity. Bioch. Res. Com., 63:424-431. 1975.
15. Woo S.L., Creamer L.K. et Richardson T. Chemical phosphorylation of bovine beta-lactoglobulin. J Agric Food Chem, 30:65-70. 1986.
16. Matheis G. Penner M.H. Freney R.E. et Whitaker J.R. Phosphorylation of casein and lysozyme by phosphorus oxychloride. J Agric. Food Chem 31:379-387. 1983.
17. Matheis G. et Whitaker J.R. Chemical Phosphorylation of food proteins: an overview and a prospectus. J. Agr. Food Chem. 32:699-705. 1984.
18. Sung H. Chem H.J. Lin T.Y., Su J.Ch. Improvement of the functionalities of soy protein isolate through chemical phosphorylation. J. Food Sei. 48:716-718. 1983.
19. Delsal J.L. & Manhourii II. Dosages colorimétriques du phosphore, spectrométric dand l'ultraviolet. Bull. Soc. Chim. Biol., 40:1169-1179. 1958.
20. Courthaudon J.L. Communication personnelle. Laboratoire de Biochimie et Toxicologie Alimentaires, ENS,BANA, Université de Bourgogne. 1988.
21. Brule G. Les minéraux du lait. Revue Laitière Française, N°400. 1981.
22. Kakade M.L. Biochemical basis for the differences in plant protein utilization J. Agric. Food Chem 22:550-555. 1974.
23. Rothenbulla et Kinsella J.F. The pH-stat method for assessing protein digestibility ; an evaluation. J. Agric. Food Chem., 33: 433-438. 1985.
24. Antila P., Hague Z., Kinsella J.E. Assessment of the vitro digestibility of casein using the pH stat method: the effect of alkali heat treatments and iron addition. Melckwissenschaft, 42: 485-489. 1987.
25. Poiffait et J. Adrian. La spécificité de la caséine, 2<sup>ème</sup> partie: son action sur l'efficacité des micro-nutriments. Med. et Nut. XXIII, 377-384. 1988.
26. Martin J.F. Influence des modifications chimiques de la caséine sur ses fonctionnelles: cas de la phosphorylation mémoire d'ingénieur ENS, BANA, propriétés. Université de Bourgogne. 1983.

Recibido: 07-07-1993

Aceptado: 02-03-1994