

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**“FRACCIONAMIENTO CON MEMBRANAS DE PÉPTIDOS
OBTENIDOS EN LA HIDRÓLISIS DE LA SEROALBÚMINA BOVINA
(BSA)”**

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

LAURA SÁEZ BENITA

JULIO, 2013



AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Francisco A. Riera, Profesor Titular del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Oviedo, tutor del presente trabajo de investigación, por ofrecerme esta oportunidad, por su dirección y por su ayuda.

A los compañeros de laboratorio, especialmente a Adrián por su orientación y a Dani por amenizar esas mañanas eternas de experimentación.

A los “Forasteros”, que me han acompañado durante todo este año y han hecho de este año una gran experiencia; y de ellos especialmente a Miriam y María sin las cuales no habría sido capaz de entregar este trabajo.

A mis amigos, que me han tenido que aguantar incluso desde la distancia y cuyos ánimos me han permitido soportar mejor los largos días de trabajo.

Y finalmente a mi familia, que me ha ofrecido la oportunidad de vivir esta experiencia, por su cariño y apoyo constante, por estar siempre a mi lado incluso sin estar aquí.

Muchas gracias a todos.

RESUMEN

En los últimos años, se ha dado un creciente interés por el aprovechamiento de los subproductos de la industria alimentaria, especialmente en la industria láctea, cuyo subproducto, el lactosuero, ha demostrado tener importantes aplicaciones tecnológicas, industriales y nutricionales.

Si bien existen muchas ramas de investigación al respecto, una de las más destacadas es el fraccionamiento y separación mediante membranas de los posibles péptidos bioactivos, existentes en las proteínas del lactosuero obtenidos mediante hidrólisis de las mismas.

El presente trabajo se centra concretamente en el estudio de la BSA (sero-albúmina bovina), que tras ser hidrolizada mediante tripsina, e identificados sus péptidos mediante la técnica de HPLC cuadrupolo, fueron separados mediante membranas de ultrafiltración y nanofiltración.

Para la separación se emplearon tres tipos de membranas con diferente tamaño de poro entre 1000, 2000 y 5000 Da; además se estudió la variación de transmisión de dichos péptidos en distintas condiciones de pH.

ABSTRACT

In the last few years , there has been a growing interest for the exploitation of subproducts in food industry , especially in lacteal industry , which subproduct , lactoserum , has proved having important technological applications , either industrials and nutritional .

Although there are lots of investigating branches about it , one of the most outstanding is division and separation through membranes of the possible bioactive peptides , existing in lactoserum proteins obtained by means of hydrolysis of these proteins .

The present work is specifically focused in the BSA study (bovine serum albumine) , that after being hydrolyzed with trypsin , and identified its peptides with the HPLC quadrupole technic , they were separated by ultrafiltration and nanofiltration membranes.

For the separation there were used three types of membranes with a different pore size between 1000 , 2000 and 5000 Da ; also we studied the variation of the transmission of those peptides in different ph conditions

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Secuencia aminoacídica y estructuras secundarias de la BSA</i>	13
Figura 2. <i>Representación de los dominios y estructuras secundarias de la BSA, cada dominio está representado por un color distinto y cada subdominio por un tono distinto</i>	14
Figura 3. <i>Estructuras de la BSA en función del pH</i>	15
Figura 4. <i>Mecanismo catalítico de una proteasa</i>	18
Figura 5. <i>Estructura de la tripsina</i>	21
Figura 6. <i>Péptidos obtenidos por la hidrólisis de BSA con tripsina</i>	22
Figura 7. <i>Mecanismo del paso por membrana</i>	24
Figura 8. <i>Clasificación de las membranas en función del tamaño de poro</i>	25
Figura 9. <i>Perfil de concentración debido a la polarización, con formación de capa de gel</i>	27
Figura 10. <i>Mecanismo de HPLC QQQ</i>	30
Figura 11. <i>BSA</i>	32
Figura 12. <i>pH-metro</i>	33
Figura 13. <i>Cromatógrafo Agilent 1200 series RR</i>	35
Figura 14. <i>Cromatógrafo HPLC semipreparativo modelo ProStar Variant</i>	36
Figura 15. <i>Dispositivo experimental de trabajo</i>	39
Figura 16. <i>Regulador de pH conectado al biorreactor</i>	40
Figura 17. <i>Cromatograma del hidrolizado de BSA con ratios S/E 45, 131, 221</i>	47
Figura 18. <i>Cromatograma del hidrolizado de BSA con un ratio S/E de 131 a lo largo del tiempo</i>	48

<i>Figura 19. Porcentaje de hidrólisis obtenido a lo largo del tiempo para un ratio S/E de 45</i>	<i>49</i>
<i>Figura 20. Cromatograma del hidrolizado de BSA con distintos ratio S/E</i>	<i>50</i>
<i>Figura 21. Porcentaje de hidrólisis obtenidos a distintos ratios E/S</i>	<i>51</i>
<i>Figura 22. Cromatograma del hidrolizado de ratio S/E 5 a lo largo del tiempo</i>	<i>52</i>
<i>Figura 23. Cromatograma (HPLC semipreparativo) del hidrolizado de BSA de concentración 15g/L</i>	<i>53</i>
<i>Figura 24. Fracciones (HPLC semipreparativo) del hidrolizado de BSA de concentración 15g/L</i>	<i>53</i>
<i>Figura 25. Identificación de las fracciones dentro de la cadena de aminoácidos que forma la BSA</i>	<i>54</i>
<i>Figura 26. Cromatograma obtenido del HPLC QQQ al analizar la fracción 22</i>	<i>56</i>
<i>Figura 27. Cromatograma obtenido del HPLC QQQ al analizar la fracción 20.</i>	<i>57</i>
<i>Figura 28. Efecto del aumento de la temperatura (°C) sobre el flujo de permeado (J (L/hm²))</i>	<i>58</i>
<i>Figura 29. Efecto del aumento presión (bar) sobre el flujo de permeado (J (L/hm²))</i>	<i>59</i>
<i>Figura 30. Representación del flujo de permeado frente al tiempo de operación</i>	<i>60</i>
<i>Figura 31. Variación del flujo de permeado en función del pH del hidrolizado, manteniendo temperatura (38°C) y presión constantes para las diferentes membranas estudiadas</i>	<i>61</i>
<i>Figura 32. Péptidos obtenidos mediante fraccionamiento numerados por orden de elución</i>	<i>63</i>
<i>Figura 33: Cromatograma de los permeados obtenidos de la membrana de 1000Da a pH 4, 6 y 8</i>	<i>64</i>

Figura 34. <i>Cromatograma de los concentrados obtenidos de la membrana de 1000Da a pH 4, 6 y 8</i>	65
Figura 35. <i>Cromatograma de los permeados obtenidos de la membrana de 2000Da a pH 4, 6 y 8</i>	66
Figura 36. <i>Cromatograma de los concentrados obtenidos de la membrana de 2000Da a pH 4, 6 y 8</i>	67
Figura 37. <i>Cromatograma de los concentrados obtenidos de la membrana de 5000Da a pH 4, 6 y 8</i>	67
Figura 38. <i>Cromatograma de los permeados obtenidos de la membrana de 5000Da a pH 4, 6 y 8</i>	68
Figura 39. <i>Representación de los valores de Tr para las membranas de 1000, 2000, 5000 Da.</i>	70
Figura 40. <i>Tr experimental y teórico distinto pH en función de su PM.</i>	73
Figura 41. <i>Grado de separación de los péptidos en las membranas de 1000,2000, 5000 Da según la hidrofobicidad.</i>	75
Figura 42. <i>Transmisión peptídica en función del pI para la membrana de 5000Da</i>	77
Figura 43. <i>Transmisión peptídica en función del pI para la membrana de 2000Da</i>	79
Figura 44. <i>Transmisión peptídica en función del pI para la membrana de 1000Da.</i>	80

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. <i>Composición nutricional de lactosuero dulce y ácido</i>	6
Tabla 2. <i>Composición proteica del lactosuero</i>	7
Tabla 3. <i>Valor biológico de las proteínas del lactosuero</i>	7
Tabla 4. <i>Funciones de los péptidos de las proteínas del lactosuero</i>	10
Tabla 5. <i>Composición de aminoácidos de la BSA</i>	12
Tabla 6. <i>Tipos de proteasas y características</i>	19
Tabla 7. <i>Péptidos obtenidos por la hidrólisis de BSA con tripsina y sus enlaces</i>	23
Tabla 8. <i>Comparación paramétrica entre HPLC analítica y preparativa</i>	29
Tabla 9. <i>Gradiente y tiempo de elución de las fases móviles</i>	36
Tabla 10. <i>Método empleado para la separación y fraccionamiento de la BSA en el cromatógrafo semipreparativo</i>	37
Tabla 11. <i>Péptidos teóricos obtenidos del hidrolizado de BSA con tripsina y propiedades de los mismos</i>	43
Tabla 12. <i>Porcentaje de hidrólisis a distintos tiempo para la muestra de hidrolizado de BSA de ratio S/E 45</i>	49
Tabla 13. <i>Grado de hidrólisis del hidrolizado a distintos ratios S/E</i>	51
Tabla 14: <i>Péptidos identificados por fracción junto con su nomenclatura y propiedades físico-químicas</i>	55
Tabla 15. <i>Flujos de permeado en función del distintos pH en membranas de 1000, 2000 y 5000Da.</i>	62
Tabla 16. <i>Porcentaje de transmisión de los péptidos estudiados en las tres membranas empleadas: 1000, 2000 y 5000KDa</i>	69
Tabla 17. <i>Péptidos identificados ordenados en función del orden de elución, con PM, hidrofobicidad (kcal/res) y carga a pH 4,6,8</i>	71
Tabla 18. <i>Agrupación de péptidos identificados de la BSA en función de su pI</i>	76

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	2
2	CONSIDERACIONES TEÓRICAS	5
	2.1 Lactosuero	6
	2.2 Sero-albúmina bovina	11
	2.2.1 Descripción	11
	2.2.2 Efectos de las variaciones físico-químicas sobre las propiedades de la BSA	15
	2.2.3 Funciones de la BSA	17
	2.3 Hidrólisis proteica	18
	2.3.1 Tripsina	20
	2.4 Métodos para la identificación y separación de péptidos.	24
	2.4.1 Técnicas de membrana	24
	2.4.2 Técnicas analíticas para la separación e identificación de péptidos	28
3	MATERIALES Y MÉTODOS	31
	3.1 Hidrólisis y determinación analítica de péptidos de la BSA	32
	3.1.1 Hidrólisis de BSA.	32
	3.1.2 Determinación analítica	34
	3.2 Fraccionamiento del hidrolizado mediante técnicas con membranas	38
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
	4.1 Hidrolizado	47
	4.2 Obtención de fracciones	53
	4.3 Identificación de péptidos	54
	4.4 Fraccionamiento con membranas	58
	4.4.1 Análisis de permeados y concentrados	63
5	CONCLUSIONES	81
6	SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS	84
7	BIBLIOGRAFÍA	88
8	APÉNDICES	95

1. INTRODUCCIÓN

Aproximadamente 90% del total de la leche utilizada en la industria quesera es eliminada como lactosuero, el cual retiene cerca del 55% del total de los ingredientes de la leche: como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales. Cabe destacar que debido a esta composición, posee una elevada carga contaminante, por la gran cantidad de materia orgánica que posee, pudiendo ocasionar importantes problemas medioambientales (Londoño, 2006). Como consecuencia de ello se requiere de tratamientos previos a su vertido, con el elevado coste económico que esto puede suponer.

La composición del lactosuero varía en función del tipo de leche empleada, tipo de queso que se quiere obtener y del método empleado para conseguirlo. Así se pueden distinguir dos tipos de suero:

- Lactosuero dulce: Obtenido por coagulación enzimática, los enzimas del cuajo atacan la secuencia peptídica de la κ -caseína, dando lugar a dos fracciones, una insoluble la para- κ -caseína (insoluble) y caseinomacropéptido (CMP), soluble y que formará parte del suero junto al resto de las proteínas séricas.
- Lactosuero ácido: Obtenido por una disminución del pH, mediante ácidos o fermentos acidificantes. Esta disminución del pH da lugar a la desmineralización de la caseína desestabilizando la estructura y provocando la precipitación.

En cualquiera de los dos tipos de lactosuero obtenidos, se estima que por cada kg de queso se producen 9 kg de lactosuero, esto representa cerca del 85-90% del volumen de la leche y contiene aproximadamente el 55% de sus nutrientes originales (Liu et al., 2005). Entre estos nutrientes destaca el elevado contenido en lactosa, proteínas, vitaminas y minerales. De entre sus componentes uno de los más estudiados son las proteínas, esto es debido a diferentes motivos:

- Su elevado valor biológico, con los importantes beneficios nutricionales
- Las importantes aplicaciones a nivel industrial, debidas a las propiedades espumantes y gelificantes que posee.
- Bioactividad de los péptidos que las componen, estos tienen capacidad de intervenir en el metabolismo y presentan propiedades como son: antihipertensivo, antioxidantes, inmunomoduladores, antimicrobianos, etc (Pérez, 2010)

El último de los motivos nombrados es uno de los de más reciente estudio, y es en el que se centra el proyecto de investigación, este trata la obtención de péptidos bioactivos a partir del hidrolizado de proteínas aisladas del lactosuero, concretamente la BSA (seroalbúmina bovina).

Con el objetivo de la obtención de dichos péptidos de la BSA, se llevó a cabo un hidrolizado enzimático de la proteína en condiciones específicas, seguido de una separación mediante la utilización de membranas, método que presentó elevada eficacia en estudios previos (Fernández, 2012).

Finalmente se llevarán a cabo análisis con la finalidad de determinar los péptidos obtenidos así como su grado de separación bajo diferentes condiciones.

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2.1. Lactosuero

El lactosuero es actualmente el principal subproducto de la industria láctea y al mismo tiempo uno de sus principales problemas, debido al elevado volumen de producción y a la dificultad de su tratamiento para su vertido al medio ambiente. Este problema ha llevado a la búsqueda de alternativas para su aprovechamiento.

La composición y tipo de lactosuero varía considerablemente dependiendo del tipo de leche, queso elaborado y método empleado.

Existen varios tipos de lactosuero dependiendo principalmente de la eliminación de la caseína, el primero denominado dulce, está basado en la coagulación por la renina a pH 6,5. El segundo llamado ácido resulta del proceso de fermentación o adición de ácidos orgánicos o ácidos minerales para coagular la caseína como en la elaboración de quesos frescos (Jelen, 2003).

La composición nutricional del lactosuero dulce y ácido queda reflejada en la Tabla 1, observándose que el dulce tiene mayores cantidades lactosa y de proteína respecto al ácido. Cabe destacar la riqueza en minerales (Ca, P, Fe, K, Na, Cl, Mg) y vitaminas (A, Tiamina, Riboflavina, Niacina, Acido pantoténico y nicotínico, B6) que pueden variar ligeramente en función del tipo de lactosuero.

Tabla 1. composición nutricional de lactosuero dulce y ácido (Panesar et al., 2007)

Componente	Lacto suerodulce	Lactosuero ácido
Acidez (pH)	5.6 - 6.1	4.7
Agua (%)	93.2 - 93.6	93.2
Sólidos totales (%)	6.4 - 6.8	6.8
Lactosa	4.6 - 5.0	4.3 - 4.4
Proteínas	0.8 - 0.9	0.8
Materia Grasa	0.3	0.1
Ácido láctico	0.2	0.5 - 0.6
Cenizas	0.5	1.1

Si bien la fracción proteica del lactosuero no constituye la fracción más abundante, si que es la que, unida a la lactosa, mayores posibilidades económicas puede tener, así como la de mayor importancia nutricional. Concretamente, suponen alrededor del 20% de las proteínas de la leche de bovino (Baro et al., 2001), siendo la mayoritaria la β -lactoglobulina (β -LG) con entre 55 y 65% del total, seguida de la α -lactoalbúmina con entre un 15 y 25% y en menor proporción la albúmina sérica bovina estando en 5 y 12 % (Lapointe, 2004) además, contiene otras proteínas con función enzimática como, lactoferrina, lactoperoxidasa, y otras como inmunoglobulinas, y glicomacropéptidos. Dicha composición queda reflejada en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición proteica del lactosuero (Zydney, 1998)

Proteína	Concentración(g/L)
β -lactoglobulina	2,70
α -lactoalbúmina	1,20
BSA	0,65
inmunoglobulinas	0,40
Lactoferrina	0,1

Cabe destacar que las proteínas obtenidas de este subproducto son de alto valor biológico (ver tabla 3) (por su contenido en leucina, triptófano, lisina y aminoácidos azufrados), tienen una calidad igual a las del huevo y no son deficientes en ningún aminoácido, sin embargo no hay que olvidar su potencial riesgo como alérgenos.

Tabla 3. Valor biológico de las proteínas del lactosuero (g/100 g de proteína) (Linden y Lorient, 1996)

Aminoácido	Lactosuero	Huevo	Recomendaciones de la FAO
Treonina	6,2	4,9	3,5
Cisteína	1,0	2,8	2,6
Metionina	2,0	3,4	2,6
Valina	6,0	6,4	4,8
Leucina	9,5	8,5	7,0
Isoleucina	5,9	5,2	4,2
Fenilalanina	3,6	5,2	4,2
Lisina	9,0	6,2	5,1
Histidina	1,8	2,6	1,7
Triptófano	1,5	1,6	1,1

Estas proteínas pueden presentar muchas funciones tecnológicas con aplicaciones a nivel industrial entre las que destacan principalmente sus propiedades espumantes, gelificantes y como complementos nutricionales (Madureira et al., 2007), sin embargo, además de las posibles funciones industriales que tienen las proteínas del suero lácteo, en los últimos años se ha abierto una nueva vía de estudio: los péptidos bioactivos.

Los péptidos bioactivos se han definido como fragmentos de proteínas específicas que tienen un impacto positivo en las funciones corporales y, finalmente, pueden influir en la salud (Kitts y Weiler, 2003) y fueron mencionados por primera vez por Mellander en 1950 (Mellander, 1950).

En los últimos años se ha reconocido que las proteínas de la dieta, especialmente proteínas de la leche, proporcionan una rica fuente de péptidos biológicamente activos, sin embargo, estos péptidos pueden permanecer inactivos dentro de la secuencia de la proteína pero activarse al ser liberados a través de la proteólisis por las enzimas, ya sea a través de las enzimas digestivas o por medio de enzimas derivadas de microorganismos o plantas. La actividad de estos valiosos péptidos se basa en su composición de aminoácidos y la secuencia inherente, siendo algunos de ellos multifuncional, y su tamaño puede variar de dos a veinte residuos de aminoácidos. El conocimiento de los péptidos bioactivos ha aumentado constantemente desde 1979 y, en la actualidad, se han descrito numerosos péptidos que exhiben biofuncionalidad.

Las estrategias de investigación sobre la producción de péptidos bioactivos incluyen los siguientes pasos:

1. Desarrollo de un sistema de ensayo para determinar la actividad biológica.
2. Diseño de la forma de hidrolizar las proteínas por medio de diferentes tipos de enzimas o procesos de fermentación.
3. Fraccionamiento o aislamiento de péptidos de acuerdo con algunas de sus propiedades físico-químicas (tamaño, carga, reactividad, hidrofobicidad, etc.)
4. Análisis de las estructuras y la verificación de la actividad ("in vitro", "in vivo" y pruebas clínicas en humanos).

Las metodologías comúnmente utilizadas para el fraccionamiento de péptidos y de enriquecimiento incluyen: precipitación selectiva, filtración de membrana, de intercambio iónico, las tecnologías de filtración en gel y cromatografía de líquidos (Muro et al, 2011.). Sin embargo, los procedimientos de extracción poseen diferencias significativas en cuanto al número y tipo de péptidos extraídos. Además, los péptidos no deseados, tales como péptidos alergénicos o de sabor amargo, podrían enriquecerse en el proceso cuando se utiliza algunas de esas técnicas.

La forma más habitual de producción de péptidos bioactivos es mediante una hidrólisis enzimática (Hui, 2007; Korhonen, 2006), y una posterior separación, mediante distintos métodos. Algunos de estos péptidos bioactivos han demostrado su funcionalidad “in vitro”, pero su potencial como ingredientes eficaces de salud queda por demostrar en la mayoría de los casos debido a la falta de evidencias clínicas y la limitación de algunos modelos “in vivo”.

Las bioactividades potenciales de los péptidos liberados de estas proteínas, son actualmente, un tema de intensa investigación en todo el mundo siendo las actividades biológicas más estudiadas en los últimos años:

1. Efectos sobre el sistema cardiovascular (propiedades antihipertensivas)
2. Propiedades hipocolesterolémicas
3. Propiedades opioides y anti-opioide
4. Efectos sobre el sistema gastrointestinal
5. Propiedades anticaries
6. Efectos sobre el sistema inmune.

En la Tabla 4, se exponen algunas de las actividades confirmadas en los distintos péptidos de cada proteína con actividad confirmada

Tabla 4. Funciones de los péptidos de las proteínas del lactosuero

Proteína	secuencia de aminoácidos	Bioactividad	efectos farmacológicos	Producción	estudios "in vivo"	referencias
BSA	AKFAWAVAR [BSA f(208-216)]: Albutensina A	Opioide Efectos sobre el sistema digestivo	GPI Contracción Retrasar el vaciamiento gástrico, eleva los niveles de glucosa en la sangre	BSA + tripsina	Ratones: efectos sobre el sistema digestivo [Ohinata, 2002]	Yamauchi, 1992
	YGFGNA [BSA f(399-404)]: Serofina	Opioide				
GMP		Regulación de la función gástrica Supresión de la digestión gástrica Antimicrobiano Prevención de la caries dental control de saciedad		Presente en suero dulce	Humanos: control de saciedad [Lam et al, 2009]	Yvon et al, 1994; Beucher et al, 1994; Brody et al, 2000; Malkoski et al, 2001
	MAIPPKNQDK [κ-CN f(106-116)]	Antitrombótico a	inhibe agregación plaquetaria			
LF	FKCRRWQWRMCKL GAPSICVRRRAF [LF f(17-41)]	Antimicrobiano propiedades de regulación del sistema inmune Propiedades antiinflamatorias Anti-tumoral	contra G-, G+, virus	LF + pepsina o quimosina		Bellamy et al, 1992; Hoek et al, 1997; Yoo et al, 1998; Wakabajashi et al, 2003; Samuelson et al, 2004
	APRKNVRWCTISQPEW- FKCRRWQWRMCKL GAPSITCVRRAFALECIRA [LF f(1-16)S-S(17-48)]	Antimicrobiano	Contra <i>Escherichia coli</i>		LF + quimosina	
	APRKNVRWCTISQPEW-CIRA [LF f(1-16)S-S(45-48)]	Antimicrobiano	Contra <i>Micrococcus flavus</i>	LF + pepsina		Recio and Visser, 1999
	APRKNVRWCTI- FKCRRWQWRMCKL GAPSITCVRRAFALECIR [LF f(1-11)S-S(17-47)]	Antimicrobiano	Contra <i>Micrococcus flavus</i>	LF + pepsina		Recio and Visser, 1999
	FKCRRWQWRMCKL GAPSITCV [LF f(17-30)]	Antimicrobiano	Contra oral pathogenic bacteria	Péptido sintético		Groenink et al, 1999
	PEWSKCYQWQRMRKLGAPSITCVRRTS [LF ^d f(14-42)]	Antimicrobiano	Contra <i>Micrococcus flavus</i>	LF + pepsina		Recio and Visser, 1999
	SKCYQWQRMRKLGAPSITCVRRTS [LF ^d f(17-41)]	Antimicrobiano	Contra <i>Escherichia coli</i>	Péptido sintético		Vorland et al, 1999
	DLIWKLLSKAQEKFGKNKRS [LF f(263-284)]	Antimicrobiano	Contra <i>E. coli</i> , <i>Candida albicans</i> <i>Bacillus subtilis</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Péptido sintético		van der Kraan et al, 2005

2.2 Sero-albúmina bovina (BSA)

2.2.1. Descripción

Dentro de las proteínas que forman el lactosuero nos centraremos a continuación en las características de la BSA, proteína empleada como sustrato en el procedimiento experimental.

La albúmina sérica bovina (también conocida como BSA o "Fracción V") es una de las proteínas más ampliamente estudiadas y es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo con una concentración de 0,65 g/L y es a menudo empleada como un estándar de concentración de proteínas y referencia en muchos estudios sobre membranas dado su marcado carácter globular.

Tiene un tamaño de 66.382 Da y su secuencia esta formada por 607 aminoácidos, de los cuales entre el 1 y el 19 actúan como marcadores, entre el 19 y el 22 son un propéptido (donde comienza el primer dominio), por lo que la secuencia real empieza en el aminoácido 23.

La BSA se caracteriza por contener bajas concentraciones de triptófano y metionina, mientras que posee gran cantidad de cisteína (encontramos 17 enlaces disulfuro en su estructura) y aminoácidos con carga, ácido glutámico y aspártico, lisina y arginina (ver tabla 5 para la distribución de aminoácidos). La estructura primaria de la albúmina es inusual entre las proteínas extracelulares ya que posee un único grupo sulfhidrilo (Cys-34) (Carter y Ho, 1994).

Tabla 5. Composición de aminoácidos de la BSA (Brown, 1975; Patterson and Geller, 1977; McGillivray et al., 1979; Reed et al., 1980; Hirayama et al., 1990).

Ala 48	Cys 35	Asp 41	Ser 32
Glu 58	Phe 30	Gly 17	Thr 34
His 16	Ile 15	Lys 60	Val 38
Leu 65	Met 5	Asn 14	Trp 3
Pro 28	Gln 21	Arg 26	Tyr 21

En cuanto a su estructura secundaria destaca que cerca del 90% de la proteína está constituida por hélices alfa, existiendo solo 2 giros β y 3 hojas plegadas β . Tanto la estructura primaria como secundaria se pueden observar en la Figura 1.

```

10      20      30      40      50      60
MKWVTFISLL LLFSSAYSRG VFRDRTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLIA FSQYLQQCPF

70      80      90      100     110     120
DEHVKLVNEL TEFAKTCVAD ESHAGCEKSL HTLFGDELCK VASLRETYGD MADCCEKQEP

130     140     150     160     170     180
ERNECFLSHK DDSPDLPKPK PDPNTLCDEF KADEKKFWGK YLYEIARRHP YFYAPELLEY

190     200     210     220     230     240
ANKYNGVFQE CCQAEDKGAC LLPKIETMRE KVLASSARQR LRCASIQKFG ERALKAWSVA

250     260     270     280     290     300
RLSQKFPKAE FVEVTKLVTD LTKVHKECCH GDLLCADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE

310     320     330     340     350     360
CCDKPLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCK NYQEAKDAFL GSFLYEYSRR

370     380     390     400     410     420
HPEYAVSVLL RLAKYEYATL EECCAADDPH ACYSTVFDKL KHLVDEPQNL IKQNCDFEYK

430     440     450     460     470     480
LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS RSLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL

490     500     510     520     530     540
NRLCVLHEKT PVSEKVTKCC TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP

550     560     570     580     590     600
DTEKQIKKQT ALVELLKHKP KATEEQLKTV MENFVAFVDK CCAADDKEAC FAVEGPKLVV

STQTALA

```

Secuencia de aminoácidos			
Helice alfa	30-38	40-54	60-79
	90-99	104-108	109-116
	121-127	143-152	154-168
	174-191	197-229	231-245
	251-269	273-288	291-294
	301-303	306-315	329-332
	338-344	346-360	366-385
	389-393	396-403	408-437
	443-460	465-489	494-502
	507-512	527-530	534-537
541-558	564-583	587-606	
Giros beta	84-87	404-407	
Hoja plegada beta	56-58	194-196	461-463



Figura 1. Secuencia aminoacídica y estructuras secundarias de la BSA

Distintos experimentos han determinado que la forma de la BSA es similar a un corazón. (Bos *et al.*, 1989). A su vez podemos distinguir tres dominios homólogos en su estructura (I:19-209, II:210-402 y III:8403-600) que se dividen en nueve bucles (L1-L9) por 17 por enlaces disulfuro. Los bucles en cada dominio se componen de una secuencia bucles que forman un triplete. Cada dominio a su vez es el producto de dos subdominios (IA, IB, etc

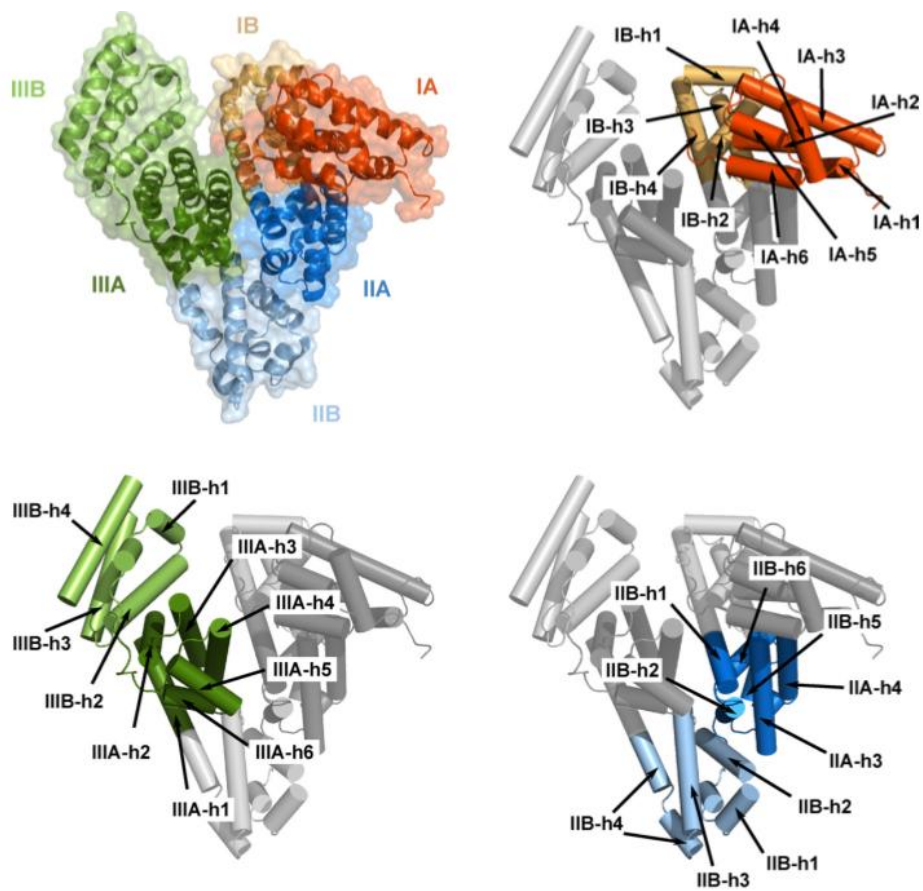


Figura 2. Representación de los dominios y estructuras secundarias de la BSA, cada dominio está representado por un color distinto y cada subdominio por un tono distinto (Sugio *et.al* 1999)

2.2.2 Efectos de las variaciones físico-químicas sobre las propiedades de la BSA

Al igual que el resto de proteínas del lactosuero, la BSA posee características con importantes aplicaciones a nivel tecnológico e industrial; destacaremos a continuación algunas de estas propiedades.

- Viscosidad

La albúmina de suero se somete a isomerización conformacional reversible con cambios en el pH. La forma N es la que posee en condiciones fisiológicas y es la más estable. La forma F se caracteriza por un aumento espectacular de la viscosidad, mucha menor solubilidad, y una pérdida significativa en el contenido helicoidal (Foster, 1960). A valores de pH inferiores a 4, la albúmina se somete a otra expansión con una pérdida de las hélices intra-dominio, esta forma expandida se conoce como la forma E.

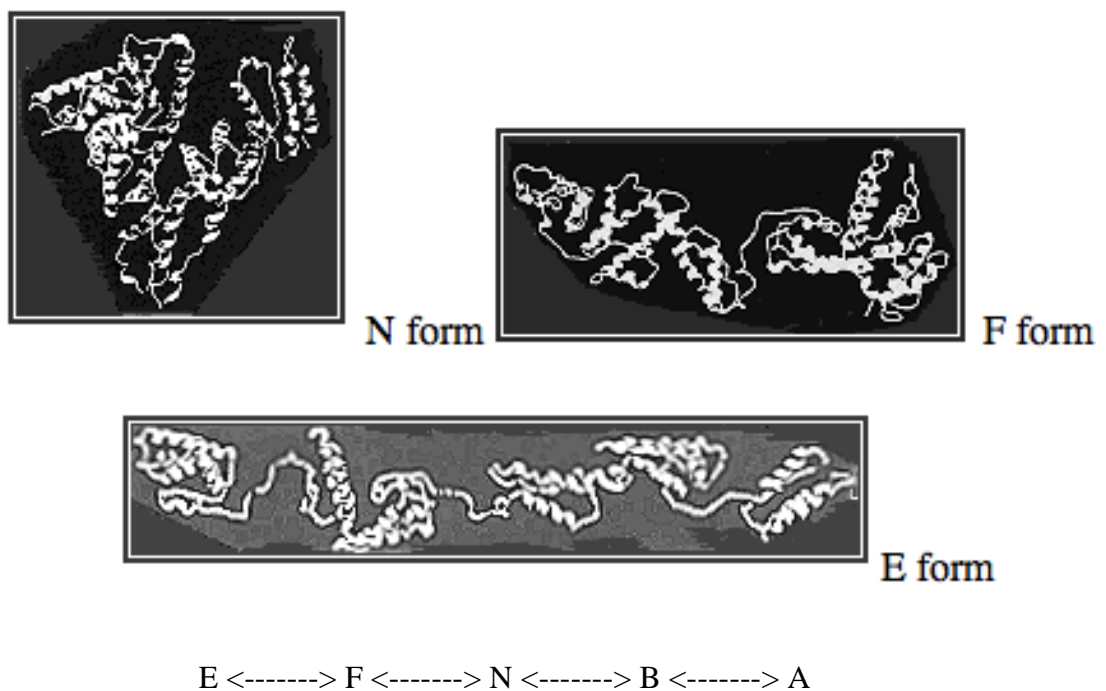


Figura 3. Estructuras de la BSA en función del pH

- Temperatura

La albúmina sérica al ser tratada por calor, pasa por dos etapas estructurales, la primera reversible (hasta 65°C), mientras que la segunda por encima de los 65°C es irreversible, pero no necesariamente resulta en una destrucción completa de la estructura ordenada (Kuznetsow et al, 1975;. Lin y Koenig, 1976; Oakes, 1976), dando lugar a una coagulación por desnaturalización de la proteína.

- Formación de espuma

Formación de espuma se puede definir como la creación y la estabilización de burbujas de gas en un líquido. Las proteínas se difunden a la interfase aire-agua y reducen la tensión superficial. En la interfase se desarrollan parcialmente y se asocian para producir una película cohesiva intermolecular con un cierto grado de elasticidad. La BSA tiene una mayor capacidad de formación de espuma cuando se encuentra cerca de su punto isoeléctrico (pI 4,7)), es decir, cuando repulsión electrostática está en su mínimo valor.

- Gelificación

La BSA al calentarse forma agregados solubles a través de enlaces disulfuro y enlaces no covalentes. La gelificación es un mecanismo de dos pasos. Una etapa de iniciación implica despliegue o la disociación de las moléculas de proteína, seguida de una etapa de agregación en el que se producen reacciones de asociación o agregación, lo que resulta en la formación de gel en condiciones apropiadas. Para la formación de un gel altamente ordenado, es esencial que la etapa de agregación proceda a un ritmo más lento que la etapa de despliegue de la proteína (Hermansson, 1978; 1979a). Se encontró que la temperatura de desnaturalización de la BSA por análisis térmico diferencial (DTA) es de 64°C (Itoh et al., 1976) y de 62°C por calorimetría diferencial de barrido (Ruegg et al., 1977). La temperatura de desnaturalización de la BSA aumenta cuando se une a los ácidos grasos (Bernal y Jelen, 1985). En cuanto a la gelificación producida por la modificación del pH tiene lugar por debajo de un pH de 6,5 y se inicia por un intercambio intramolecular tiol-disulfuro, similar a lo que sucede con la β -LG.

2.2.3 Funciones de la BSA

La BSA tiene la importante función en el metabolismo de actuar como ligando: es la principal portadora de ácidos grasos que son de otro modo insolubles en el plasma circulante, es secuestrante de radicales libres de oxígeno y de diversos metabolitos tóxicos lipófilos tales como la bilirrubina (Emerson, 1989). La albúmina tiene una alta afinidad por ácidos grasos, hematina, bilirrubina y una amplia afinidad por compuestos aromáticos cargados negativamente así como por algunos metales. Esta capacidad de ligando está siendo ampliamente estudiada en la actualidad ya que puede actuar como secuestrante de tóxicos lo que podría tener gran importancia en la industria farmacéutica (Ruíz Peña., et al, 2005).

Se ha determinado que la albúmina de suero es principalmente responsable del mantenimiento de pH de la sangre (Figge et al, 1991).

Otra importante propiedad que se ha asociado a la BSA es su capacidad de inhibir el crecimiento tumoral, análisis “*in vitro*” han proporcionado pruebas del efecto de la BSA sobre el cáncer de mama humano (MCF-7), influyendo sobre los factores de regulación endocrina (Laursen, Briand, y Lykkesfeldt, 1990).

Otra propiedad de gran importancia de aplicación para la salud es la capacidad antioxidante que posee esta proteína (Tong, Sasaki, McClements, y Decaer, 2000).

2.3 Hidrólisis proteica

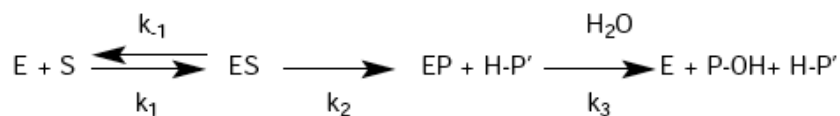
El proceso de hidrólisis de una proteína consiste en la ruptura del enlace peptídico (enlace tipo amida: $-\text{COO}-\text{HN}_2-$) en presencia de agua (de ahí el término hidrólisis).

El resultado de dicha ruptura es la formación de péptidos de longitud variable, de bajo peso molecular y aminoácidos libres. El proceso de hidrólisis se puede llevar a cabo por varios métodos; existe una hidrólisis química (que tiene lugar en presencia de ácidos o álcalis), y una hidrólisis enzimática mediante enzimas. Las enzimas son biocatalizadores de las reacciones químicas que tienen lugar en los seres vivos. Son proteínas (globulares), aunque algunos RNAs también poseen actividad catalítica (ribozimas).

Dichos enzimas tienen un gran poder catalítico aumentando la velocidad de la reacción, sin embargo solo pueden trabajar en condiciones muy suaves de pH y temperatura próximas a las condiciones metabólicas, y generalmente tienen un elevado nivel de especificidad enzima-sustrato, uniéndose a su vez a zonas específicas del sustrato sobre el que actúan.

El proceso de hidrólisis está dividido en tres fases claras:

- Formación de un complejo enzima-sustrato (proteína)
- Rotura del enlace amídico dando como resultado la liberación de un péptido
- Separación del péptido restante después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua



E: enzima, S: sustrato, P, P': péptidos resultantes, k_x : constante velocidad de reacción.

Figura 4. Mecanismo catalítico de una proteasa

Las enzimas que actúan sobre las proteínas produciendo su hidrólisis son conocidas como proteasas y para que pueda comenzar a actuar, el enzima debe reconocer la región específica de la secuencia de aminoácidos, por lo que cada enzima producirá una serie distinta de péptidos al fragmentar la proteína.

En el mercado podemos encontrar actualmente proteasas grado-alimenticio (Tabla 6) Existen distintas clasificaciones para las proteasas como: por el origen, (animal, vegetal, bacteriano o fúngico), por su modo de acción catalítica (endoproteasas: hidrolizan enlaces acídicos dentro de la cadena y exoproteasas que eliminan aminoácidos terminales) o en función de su sitio catalítico.

Tabla 6. Tipos de proteasas y características

Tipo de proteasa	Nombre	Fuente	Temp. (°C)	Intervalo de pH	Sitio de acción catalítica	
Serinproteasa	• Animal	Tripsina	30-60	7-9	-*Lis (o Arg) ---	
		Quimotripsina	45-55	8-9	-*Trp (o Tir, Fe, Leu) --	
		Elastasa		6-8	-	
					-*Ala----	
	• Bacteriana	Substilisín. Carlsberg, Alcalasa	<i>Bacillus licheniformis</i>	50-60	6-10	-*AAhf----
		Subst. BPN, Substilisín Novo	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	40-55	6-10	
Cisteinproteasas	• Plantas	Papaína	Papaya	40-75	5-8	-*Fe (o Val, Leu)-
		Bromelaina	Piña	20-65	5-8	AAhf ---
		Ficina	Látex de Ficus		5-8	
Aspartato proteasas	• Animal	Pepsina	Porcino, bovino		1-4	-Fe (o Tir, Leu)*-Trp
		Quimosina	Becerro		4-6	(o Fe, Tir)
	• Fúngica	Aspergillopeptidasa A	<i>Aspergillus saitoi</i>	35-50	2-5	Glu, Asp, Leu *---
		Newlasa	<i>Rhizopus sp.</i>	40-50	3-6	Similar a la pepsina
Metalo proteasas	• Animal	Carboxipeptidasa A	Páncreas		7-8	*Carbonilo del AA terminal del péptido, excepto Pro, Arg, Lis
	• Bacteriana	Neutrasa® Termolisina	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>B. thermoproteolyticus</i>	40-55	6-7,5 7-9	-Fe, Leu, Val*--- -Ile, Leu, Val, Fe*---

* Indica sitio de acción de la proteasa sobre el sustrato.

Las primeras enzimas proteolíticas utilizadas en la industria alimentaria fueron proteasas pancreáticas de origen animal, si bien cada vez están adquiriendo mayor importancia las de origen bacteriano o fúngico y en muchos casos se comercializan mezclas de varios tipos de enzimas.

En el caso de proteínas globulares como la empleada durante el procedimiento como sustrato, la mayor parte de los enlaces peptídicos se encuentran localizados en el interior de la proteína y no son accesibles para la enzima, por esto, se considera que para proteínas globulares podría ser necesario efectuar una desnaturalización previa al hidrolizado, ya que después de la desnaturalización estarán expuestos más enlaces peptídicos.

A continuación se pasará a describir más ampliamente la proteasa tripsina, pues fue la empleada en este trabajo.

2.3.1 Tripsina

La tripsina es una de las proteasas más comúnmente utilizadas en procesos biotecnológicos, y fue la empleada en el proceso experimental que nos ocupa, por lo que será la descrita en las consideraciones teóricas.

La tripsina es producida en el páncreas y secretada en el duodeno (parte del intestino), donde es esencial para la digestión. Es una enzima de peso molecular de 23,3 kDa y formada por una secuencia de 226 aminoácidos (estructura representada en la figura 5). El pH óptimo es 7,8 y la temperatura óptima es 37 °C. Es una enzima específica ya que liga al péptido en las posiciones del carboxilo de residuos Arginina (Arg) o Lisina (Lys) en la cadena, ambos aminoácidos con grupos R cargados positivamente, fragmentando al péptido inicial, salvo que estos últimos se encuentren enlazados a prolina (Olsen et al, 2004).

La tripsina comercializada habitualmente puede poseer actividad residual de quimotripsina, lo que puede dar lugar a otros péptidos de bajo peso molecular que podrían interferir en el análisis, por ello en este caso se empleo una enzima con inhibidores de la quimotripsina.

Muchos autores han empleado enzimas inmovilizadas para realizar hidrólisis proteicas (Chen et al., 1994; Park et al., 1998). Este método puede tener muchas ventajas, sin embargo no es tan empleado debido a que se produce un menor contacto con el sustrato, dificulta la operación y tiene un elevado coste el producir el soporte de inmovilización (Bai et al., 1999).

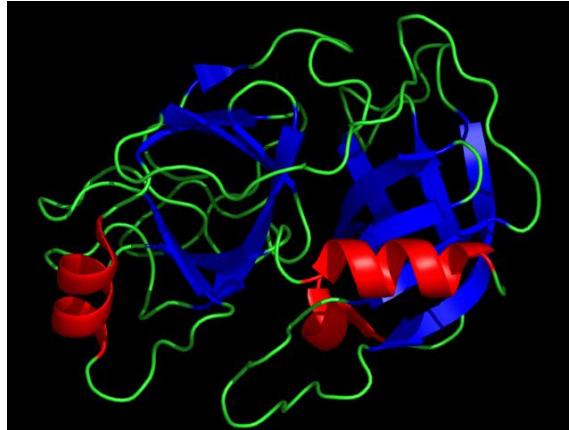


Figura 5. Estructura de la tripsina

10 20 30 40 50 60
 MKWVTFISLL LLFSSAYSRG VFRR-DTHK-SE IAHR-FK-DLGE EHFk-GLVLIA FSQYLQQCPF

70 80 90 100 110 120
 DEHVk-LVNEL TEFAK-TCVAD ESHAGCEK-SL HTLFGDELCK-VASLR-ETYGD MADCCEK-QEP

130 140 150 160 170 180
 ER-NECFLSHK-DDSPDLPK-LK PDPNTLCDEF K-ADEK-K-FWgK-YLYEIAR-R-HP YFYAPELLYY

190 200 210 220 230 240
 ANK-YNGVFQE CCQAEDK-GAC LLPK-IETMR-E K-VLASSAR-QR-LR-CASIQK-FG ER-ALK-AWSVA

250 260 270 280 290 300
 R-LSQK-FPK-AE FVEVTK-LVTD LTK-VHK-ECCH GDLLCADDR-ADLAK-YICDN QDTISSK-LK-E

310 320 330 340 350 360
 CCDKPLLEK-S HCIAEVEK-DA IPENLPPLTA DFAEDK-DVCK-NYQEAK-DAFL GSFLYEYSR-R

370 380 390 400 410 420
 HPEYAVSVLL R-LAK-EYEATL EECCA K-DDPH ACYSTVFDK-L K-HLVDEPQNL IK-QNCDQFEK-

430 440 450 460 470 480
 LGEYGFQNAL IVR-YTR-K-VPQ VSTPTLVEVS R-SLGK-VGTR-C CTKPESER-MP CTEDYLSLIL

490 500 510 520 530 540
 NR-LCVLHEK-T PVSEK-VTK-CC TESLVNR-RPC FSALTPDETY VPK-AFDEK-LF TFHADICTLP

550 560 570 580 590 600
 DTEK-QIK-K-QT ALVELLK-HKP K-ATEEQLK-TV MENFVAFVDK-CCAADDK-EAC FAVEGPK-LVV

STQTALA

Figura 6. Péptidos obtenidos por la hidrólisis de BSA con tripsina

Tabla 7. Péptidos obtenidos por la hidrólisis de BSA con tripsina y sus enlaces

Péptidos	Enlaces	Péptidos	Enlaces
GLVLIAFSQYLQQCPFDEHV K	45-65	LVTDLTK	257-263
DAIPENLPLTADFAEDK	319-336	NYQEAK	341-346
HPYFYAPELLYYANK	169-183	CCAADDK	581-587
LFTFHADICTLPDTEK	529-544	SEIAHR	29-34
RPCFSALTPDETYVPK	508-523	VLISSAR	212-218
MPCTEDYLSLILNR	469-482	GACLLPK	198-204
YNGVFQECCQAEDK	184-197	AWSVAR	236-241
ECCHGDLLECADDR	267-280	TPVSEK	490-495
DAFLGSFLYEYSR	347-359	QEPER	118-122
LKDPNTLCDEFK	139-151	IETMR	205-209
VPQVSTPTLVEVSR	438-451	CASIQK	223-228
DDPHACYSTVFDK	387-399	AFDEK	524-528
LGEYGFQNALIVR	421-433	VASLR	101-105
TVMENFVAFVDK	569-580	FWGK	157-160
EYEATLEECCA	375-386	ADLAK	281-285
YICDNQDTISSK	286-297	HKPK	558-561
ETYGDMADCCEK	106-117	FGER	229-232
SLHTLFGDELCK	89-100	DTHK	25-28
TCVADESHAGCEK	76-88	LSQK	242-245
HLVDEPQNLIK	402-412	DVCK	336-340
HPEYAVSVLLR	361-371	ADEK	150-154
ECCDKPLLEK	300-309	YTR	434-436
LVNELTEFAK	66-75	VGTR	456-459
CCTKPESER	460-468	SLGK	452-455
EACFAVEGPK	588-597	FPK	246-248
CCTESLVNR	499-507	QIK	545-547
SHCIAEVEK	310-318	VHK	264-266
QTALVELLK	549-557	VTK	496-498
QNCDQFEK	413-420	ALK	233-235
LVVSTQTALA	598-607	LAK	372-374
NECFLSHK	123-130	QR	219-220
DLGEEHFK	37-44	FK	35-36
YLYEIAR	161-167	LR	221-222
AEFVEVTK	249-256	EK	210-211
DDSPDLPK	131-138	LK(2X)	400-401;298-299
LCVLHEK	483-489	R(2X)	360; 168
ATEEQLK	562-568	K(3X)	548;156;437

2.4 Métodos para la identificación y separación de péptidos.

Existen diferentes métodos para poder separar e identificar los péptidos tras el hidrolizado de una proteína, sin embargo el siguiente apartado se centra concretamente en los empleados durante la experimentación, distinguiendo dos métodos: las técnicas de membrana y los métodos analíticos.

2.4.1 Técnicas de membrana

Los hidrolizados proteicos deben de ser fraccionados para la obtención de péptidos bioactivos; uno de los métodos que pueden ser utilizados para separar las fracciones obtenidas tras el hidrolizado es el tratamiento con membranas debido a su efectividad y posible implantación a nivel industrial por las ventajas que presentan (Ghos & Cui, 2000; Prádanos et. al, 1996):

- Elevado rendimiento y posibilidad de operación continua.
- Permiten trabajar a bajas temperaturas, lo que será necesario en caso de muestras biológicas como es el caso
- Tecnología fácilmente escalable
- Pueden emplearse membranas adecuadas a cada producto

Una membrana se puede definir como una barrera selectiva que separa dos fases y permite o regula el transporte de algunos componentes de la disolución mientras rechaza el transporte de otros. Las membranas se pueden clasificar atendiendo a su naturaleza (sintéticas o naturales), a su estructura o a su mecanismo de permeación.

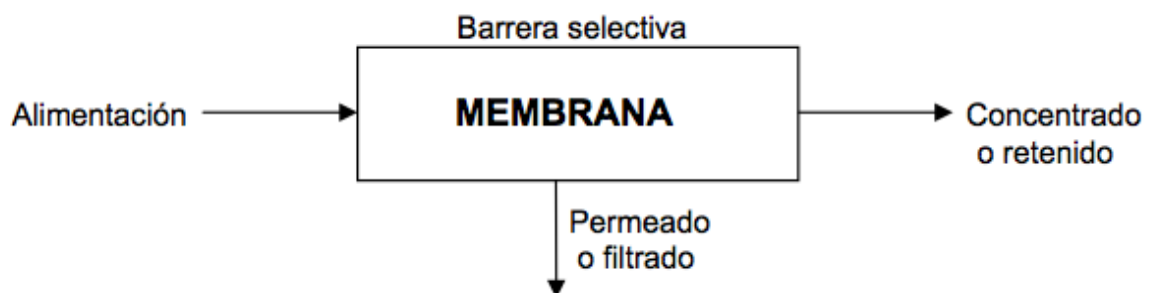


Figura 7. Mecanismo del paso por membrana

Habitualmente estos procesos se clasifican en función del tamaño de las partículas o moléculas que son capaces de separar, lo que se encuentra íntimamente relacionado con el tamaño de poro y la estructura de las membranas. A medida que los poros son más pequeños, la resistencia de las membranas a la transferencia de materia se hace mayor y la presión aplicada (fuerza impulsora) debe aumentarse apropiadamente.

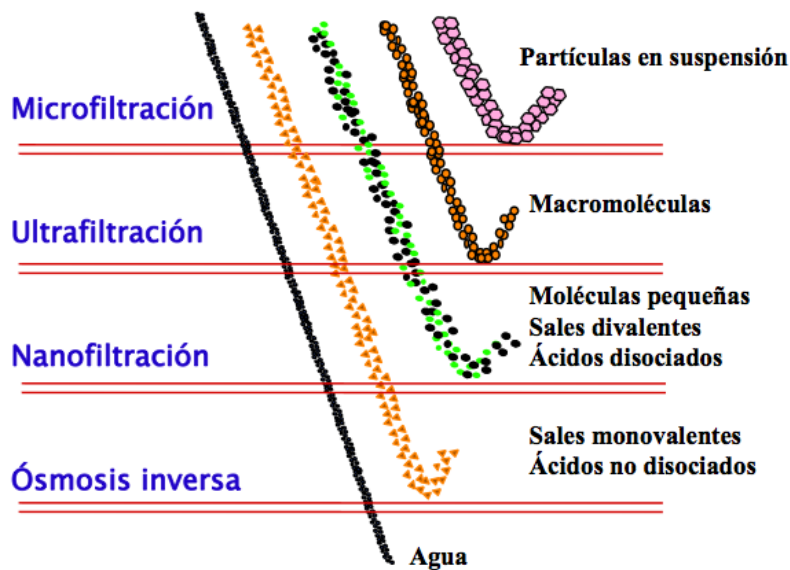


Figura 8. Clasificación de las membranas en función del tamaño de poro

En la actualidad se presta especial atención a la tecnología de membranas (ultra y nanofiltración (NF)) para la obtención de fracciones interesantes a escala industrial, aunque su selectividad puede ser más pobre que en otras técnicas (cromatografía o intercambio iónico) en algunas aplicaciones. Como muestra la Figura 6 el tratamiento de las proteínas abarcaría la ultrafiltración (macromoléculas biológicas) y la nanofiltración (moléculas de menor tamaño como serían los péptidos)

El proceso de filtración depende de efectos de convección, de difusión y electrostáticos existente entre péptidos y la superficie de la membrana. La importancia relativa de estos mecanismos depende de muchos factores como: la concentración de péptido, pH, puntos isoelectrónicos de membrana y péptidos, péptidos carácter hidrófobo / hidrófilo, fuerza iónica, etc.

A continuación se explicará con mayor profundidad las membranas de nanofiltración (NF).

La NF es una técnica de membrana impulsada por presión en el que el tamaño de poro de la membrana está en el rango de nanómetros. Esta técnica es intermedia entre la ósmosis inversa (RO) y la ultrafiltración (UF) y es útil para separar/fraccionar solutos ≠ con MW inferior a 5 kDa. La presión transmembrana en la NF es menor que en RO y el flujo de permeado es generalmente más alto, lo que representa una importante ventaja energética en aplicaciones industriales.

Existen diferentes factores que pueden afectar a la obtención de péptidos por membranas, como son el tamaño y la carga del péptido (Ferry, 1938; Gareem et., al 1998) además de ello varias investigaciones publicadas (Tsuru y col. (1994)) muestran la influencia del pH en la retención de los aminoácidos a través de membranas de NF.

- pH

El pH tiene un efecto crucial en la transferencia de péptidos a través de la membrana, ya que los aminoácidos que los forman se pueden clasificar en ácidos, neutros o básicos en función del valor de su pI (punto isoelectrico), por lo tanto la carga neta que poseerán los péptidos dependerá en gran medida del pH del medio, (Fievet et., al 2000)

- Fuerza iónica

La fuerza iónica del medio afectará en gran medida al proceso, así un aumento de la fuerza iónica producirá una disminución del potencial de membrana, produciendo una menor movilidad electroforética de las proteínas y péptidos (Nau et., al 1995).

- Otros factores

Además de los efectos mencionados existen otros factores comunes al tratamiento con membranas que pueden afectar al rendimiento y efectividad del proceso, como son la polarización de concentración y ensuciamiento:

- Polarización de concentración

Este fenómeno se caracteriza por la acumulación de solutos sobre la superficie de la membrana, apareciendo un gradiente de concentración parcialmente contrarrestado por la difusión, con formación de perfiles de concentración en la interfase membrana-disolución. Este proceso queda representado en la Figura 9.

- Ensuciamiento

Es el conjunto de fenómenos que contribuyen a modificar las propiedades de filtración de la membrana, aumentando su resistencia hidráulica y provocando la disminución de la densidad de flujo de permeado. Todos ellos son de naturaleza físico-química.

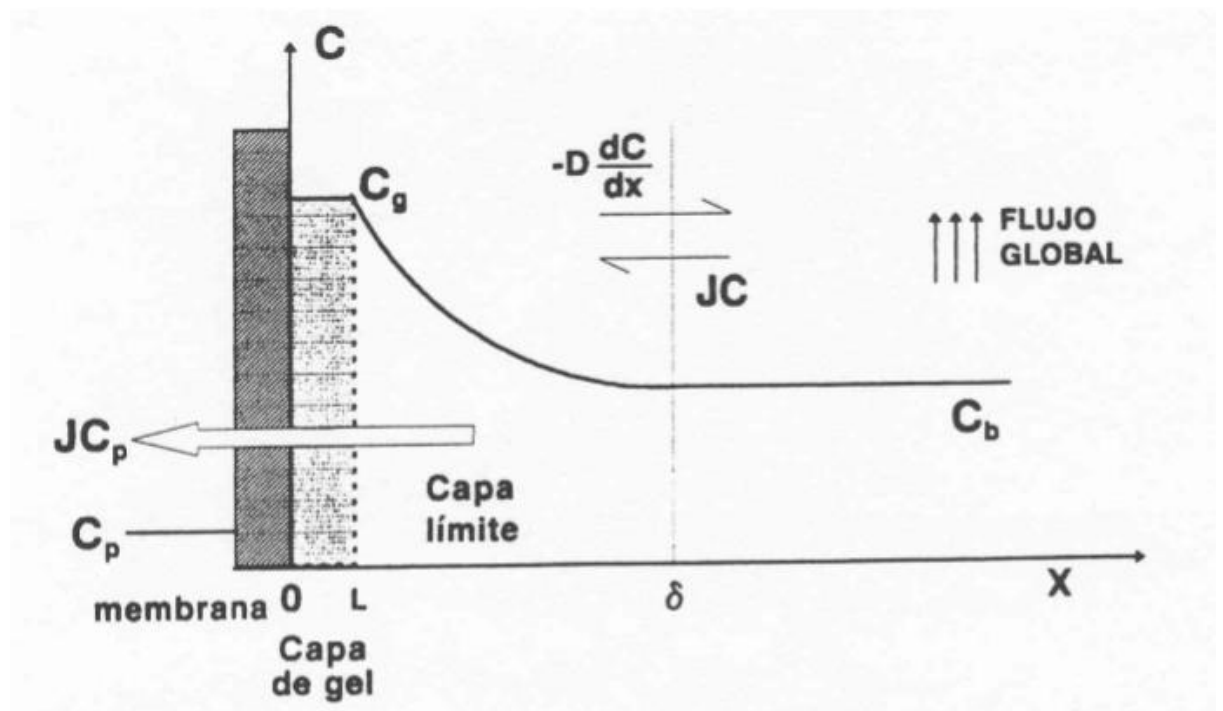


Figura 9. Perfil de concentración debido a la polarización, con formación de capa de gel

2.4.2 Técnicas analíticas para la separación e identificación de péptidos

- ***Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)***

La cromatografía líquida de alta resolución (High performance liquid chromatography) es una técnica de separación de elevada sensibilidad, ideal para especies no volátiles, muy empleada para la determinación de proteínas, drogas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, etc.

Es una técnica basada en una distribución de los componentes de una muestra entre una fase estacionaria y una fase móvil (líquida); esta distribución dependerá de la distinta interacción de los componentes, que se retendrán según su afinidad por las distintas fases. El tiempo que tarda un compuesto en ser eluído de la columna se llama tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria (Cornelly, 2001)

La cromatografía de fase reversa se basa en las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar. La fuerza conductora en la unión del compuesto a la fase estacionaria es la disminución del área del segmento apolar del analito expuesto al disolvente. La fase estacionaria más común está formada por sílice a la que se unen grupos de carácter no polar, siendo los más utilizados los grupos orgánicos $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_8\text{H}_{17}$ y $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$, de ellos la cadena de 18 carbonos es la más empleada (la usada en proyecto). En cuanto a la fase móvil, los disolventes poco polares son los mejores eluyentes; siendo los más empleados agua, metanol y acetonitrilo; en algunos casos adicionados de TFA (tfluoroacético) para mejorar la separación.

En este tipo de cromatografía, los compuestos más polares son los que eluirán en primer lugar aumentando el tiempo de retención según los compuestos son más apolares. El tiempo de elución dependerá también de la hidrofobicidad (mayor tiempo de retención cuanto más hidrofóbicas) así como del pH, que no solo afectará a la muestra si no que podría degradar la columna (Rubinson & Rubinson, 2000).

- *Cromatografía líquida de alta resolución semipreparativa*

Este tipo de cromatografía se basa en los mismos aspectos que el HPLC tradicional, sin embargo requiere mayor cantidad de muestra así como de fases móviles ya que la finalidad en este caso, no es únicamente la separación de los distintos componentes de la muestra sino la obtención las fracciones obtenidas de esa separación, es decir, que mientras que en el HPLC analítico las muestra se elimina por el colector de residuos en este caso pasa al colector de fracciones, siendo cada fracción uno de los picos obtenidos al separase la muestra en la columna.

Si bien se basan en los mismos principios el HPLC analítico y semi-preparativo tienen importante diferencias, dichas diferencias se encuentran representadas en la Tabla 8.

Tabla 8: *comparación paramétrica entre HPLC analítica y preparativa (Snyder & Kirkland, 1979)*

Parámetro	Analítica	Preparativa
Diámetro de la columna	2-5mm	> 10mm
Relleno de columna	10µm totalmente porosa o 10µm pelicular	50µm totalmente porosa
Flujo de fase móvil	1ml/min	10ml/min
Volumen de muestra	<200µL	>1000µL
Sensibilidad	Alta	Baja

- *HPLC cuadrupolo*

Este equipo (representado en la figura 10) basa la identificación de la muestra en la relación masa/carga existente. Los iones provenientes de la fuente de ionización pasan al analizador de masas, cuya función es separarlos y ordenarlos de acuerdo a su relación m/z .

El *analizador de cuadrupolo (Q)*, o también llamado filtro de masas, está formado por cuatro barras metálicas posicionadas de forma precisa en cada una de las esquinas de un cuadrado imaginario. Entre barras diagonalmente opuestas se aplica un voltaje de corriente continua (CC) con una radiofrecuencia (RF) sobrepuesta. Bajo unas condiciones dadas de CC y RF sólo los iones con un determinado valor m/z llegarán al detector, mientras que el resto ofrecerán trayectorias inestables e impactarán contra las barras metálicas del analizador. La estructura del equipo y con sus distintos componentes quedan representados en la figura 10.

De esta forma, haciendo un barrido de CC y RF se obtendrá el espectro de masas de la muestra a analizar.

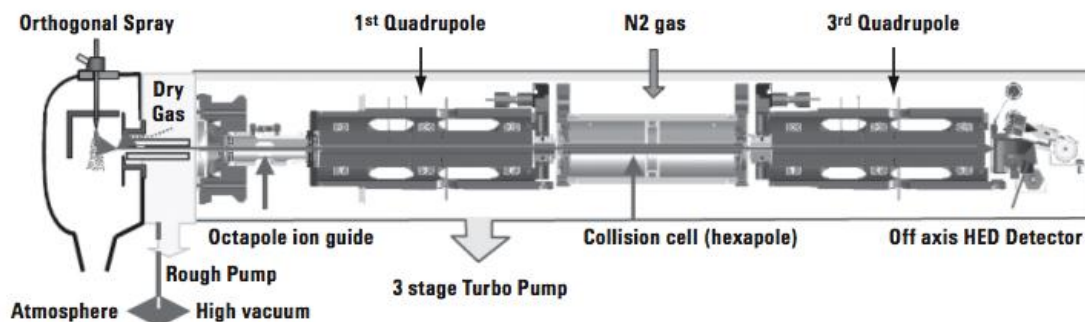


Figura 10. Mecanismo de HPLC QQQ

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Hidrólisis y determinación analítica de péptidos de la BSA

3.1.1 Hidrólisis DE BSA.

La materia prima empleada en el procedimiento fue BSA, (suministrada por FEDESA) obtenida a partir de plasma bovino ultrafiltrado y purificada por tratamiento térmico y precipitación con disolventes orgánicos. Posteriormente se trata con microfiltración y ultrafiltración, y finalmente liofilizado; obteniéndose un producto en forma de escamas de color amarillento con una pureza superior al 90%.



Figura 11. BSA

Se realizó una disolución de la materia prima en agua MQ en un reactor con capacidad de 200ml y posibilidad de control de pH y temperatura, hasta alcanzar las condiciones idóneas para la actuación de la tripsina antes de su adición (37°C y pH 8).

Una vez alcanzadas las condiciones optimas de actuación se adicionó la tripsina. La tripsina empleada para la hidrólisis, es una tripsina de páncreas bovino (T1426-1G, Sigma, USA) dicho enzima se caracteriza por tener la actividad de la quimotripsina inhibida al estar tratada con TPCK (L-1-tosilamida-2-feniletíl-clorometilcetona). Este producto se presenta en forma de polvo blanquecino liofilizado, libre de sales y con una capacidad de actuación de ≥ 10000 unidades BAEE/mg.

La información acerca de la hidrólisis enzimática de la BSA es escasa por lo que el estudio de la dosis o ratio de sustrato/enzima ha sido uno de los objetivos de este trabajo. Se estudiaron ratios S/E que variaron entre 221 y 5, partiendo de distintas concentraciones iniciales de BSA (necesarias para poder realizar determinaciones analíticas fiables).

Durante el proceso de hidrólisis se mantendrán siempre constantes las condiciones óptimas para la actuación del enzima, las cuales se comentaron con anterioridad, para lo cual se empleo una disolución NaOH 0,1N, para contrarrestar la acidificación del medio debida a la actuación del enzima, este control se llevó a cabo con un pHmetro Crison pH- Burette 24, que requirió de una calibración previa a cada análisis.



Figura 12. pH-metro

Una vez comenzada la reacción de hidrólisis se tomaron muestras del hidrolizado a intervalos de tiempo llevando un registro de la cantidad de NaOH empleado a cada tiempo para mantener las condiciones de la reacción. Este valor nos permitirá comprobar si la enzima continúa actuando, debido a que al hidrolizar la proteína tiene lugar a una acidificación del medio, por lo que mientras sea necesario adicionar NaOH el enzima estará activo

Para comprobar el porcentaje de hidrólisis obtenido se tomó el área del pico de la proteína nativa a lo largo del tiempo, relacionando su disminución con el porcentaje de hidrolizado obtenido.

$$(\text{Área inicial}-\text{área final}/\text{Área inicial})\times 100$$

A las muestras tomadas se adicionó inmediatamente 100µL de HCl 0,1N con la finalidad de acidificar el medio, de manera que queda inactivado el enzima, de esta forma se impide que continúe la reacción de hidrólisis en los viales pudiendo confirmar así la variación del grado de hidrólisis entre muestras mediante técnicas analíticas.

3.1.2 Determinación analítica

Una vez completado el proceso de hidrólisis de la BSA, se llevó a cabo el análisis de las muestras tomadas a intervalos de tiempo del hidrolizado de la BSA. Para ello se empleó la técnica de RP-HPLC (cromatografía líquida en alta resolución en fase reversa), con la finalidad de comprobar los péptidos producidos tras la hidrólisis así como el nivel de hidrolizado de la muestra.

El equipo empleado fue un cromatógrafo Agilent 1200 series RR (Agilent Technologies, Santa Clara (California), USA), dicho equipo está equipado con un automuestreador, una bomba binaria y un detector “Diode array” (DAD), lo que permite la detección a varias longitudes de onda distintas de forma simultanea. Para la separación de los péptidos se empleó una columna Microsorb-MV 300-8 C18 (Varian Inc, Palo Alto (California), USA).



Figura 13: Cromatógrafo Agilent 1200 series RR

El equipo se controla con el software ChemStation, que permitirá establecer los parámetros de análisis, la recolección de datos y el procesamiento de los mismos.

Todas las muestras requirieron de un filtrado previo al análisis en el HPLC, dicho filtrado se realizó con filtros de acetato de celulosa de $0,45\mu\text{m}$ de diámetro de poro, mientras que el volumen inyectado de muestra fue de $20\mu\text{L}$. En caso necesario se realizó una dilución de la muestra para conseguir una concentración inferior a 1g/L , con la finalidad de evitar una saturación de la columna.

Para el análisis se emplearon dos tipos de fases móviles en distinta proporción: agua ultrapura (MilliQsystem, Millipore, USA) y acetonitrilo (AcN) de grado HPLC (99,9%), ambas fases móviles contenían a su vez 0,1% de ácido trifluoroacético (Panreac, España).

Para conocer la proporción correcta de fases móviles, así como el tiempo de retención necesario para la determinación de los péptidos obtenidos tras la hidrólisis de la BSA, se ensayaron distintas proporciones entre fases móviles que se indican en la Tabla 9.

Tabla 9. Gradiente y tiempo de elución de las fases móviles

Tiempo	Fase móvil A	Fase móvil B
0,00	95%	5%
60	55%	45%
65	10%	90%
67	95%	5%

El tiempo total del análisis fue de 67 minutos, considerando un post-time entre muestras de 2 minutos, este tiempo es necesario para recuperar las condiciones iniciales de proceso antes del siguiente análisis, al tiempo de análisis de las muestras hay que añadir además el tiempo empleado para la limpieza de la columna.

Una vez realizado el análisis en el RP- HPLC, se llevó a cabo el fraccionamiento de los distintos péptidos para su posterior análisis. Para ello se empleó RP-HPLC Semipreparativo modelo ProStar Variant Inc.(Palo Alto, California USA) cuya imagen se muestra en la figura 14.



Figura 14. Cromatógrafo HPLC semipreparativo modelo ProStar Variant

El modelo está equipado con dos bombas de un solo canal, una columna de fase reversa DYNAMAX mictosorb 300-8 C18 y un detector visible-ultravioleta. El equipo está conectado a un colector de fracciones donde se recogerán las distintas muestras para su posterior análisis.

El volumen de muestra inyectado en este caso será de 2mL y su concentración deberá ser de al menos 15g/L para una correcta detección.

Las fases móviles empleadas para este equipo son las mismas que para el RP-HPLC analítico: agua ultrapura (MQ) y acetonitrilo grado HPLC.

Si bien las fases móviles son las mismas en los dos análisis, en este caso fue necesario crear un nuevo método específico para la proteína empleada, para ello emplearemos diferentes proporciones de fases móviles a lo largo del tiempo, dichos datos están representados en la Tabla 10.

Tabla 10: Método empleado para la separación y fraccionamiento de la BSA en el cromatógrafo semipreparativo

Tiempo (Min)	Flujo (mL/min)	Fases Móviles	
		• Agua MQ	• AcN
Prerun	10 ml/min	95%	5%
0.0	10 ml/min	95%	5%
5	10 ml/min	95%	5%
20	10 ml/min	90%	10%
40	10 ml/min	85%	15%
60	10 ml/min	80%	20%
70	10 ml/min	75%	25%
90	10 ml/min	70%	30%
110	10 ml/min	65%	35%
130	10 ml/min	60%	40%
140	10 ml/min	55%	45%
150	10 ml/min	50%	50%
160	10 ml/min	45%	55%
170	10 ml/min	40%	60%
175	10 ml/min	35%	65%
180	10 ml/min	5%	95%

Será necesario que la última etapa del método tenga una elevada proporción de AcN para evitar que queden restos de la proteína en la columna para una mayor separación de los péptidos.

Una vez separadas las fracciones de los supuestos péptidos fue necesario una identificación de las fracciones obtenidas, para ello fue empleado un HPLC Quadrupole, modelo Agilent 6410 QQQ LC/MS.

Además del análisis de las fracciones en el HPLC cuadrupolo, se realizó un análisis paralelo de las mismas muestras en el HPLC analítico para poder identificar posteriormente los péptidos obtenidos en el proceso de membranas.

3.2. Fraccionamiento del hidrolizado mediante técnicas con membranas

La operación comienza con la preparación de un litro de disolución de BSA con una concentración de 3g/L en un reactor de vidrio encamisado (Figura 15) al cual se le acopla externamente un sistema de membranas . Dicho biorreactor mantendrá las condiciones óptimas de hidrólisis, tanto de temperatura como de pH mediante un baño termostatzado se alcanzarán y mantendrán los 38°C y la variación de pH se controlará con un pHmetro-conductímetro (pHmetro Crison 28).

Una vez finalizada la hidrólisis el contenido del reactor se bombea a través del equipo de membranas. En el proceso se mantendrán constantes tanto la presión como la temperatura y el pH, siendo recirculados al tanque inicial tanto el permeado como el concentrado, pero extrayendo muestras de ambas corrientes

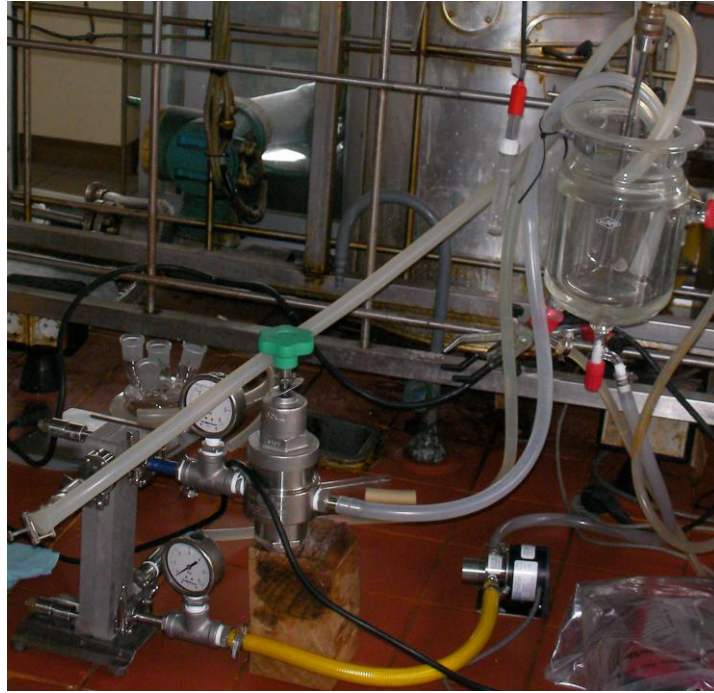


Figura 15. Dispositivo experimental de trabajo

La presión de trabajo se reguló mediante una válvula, manteniendo la presión constante durante todo el experimento.

Para el experimento se emplearon distintas membranas, todas ellas con la misma superficie ($0,1 \text{ m}^2$) pero distinto tamaño de poro:

- Membrana Pellicon Mini-Holder de Millipore (Billerica (Massachussets, USA), con un MWCO de 5kDa, cargada negativamente en el rango de pH empleado durante el experimento y con un carácter ligeramente hidrofóbico.
- Membrana de ultrafiltración PESU de Sartorius Stedim Biotech (Goettingen, Alemania) con un MWCO de 1 kDa y las mismas características que la anterior.
- Membrana de ultrafiltración Hydrosart de Sartorius Stedim Biotech (Goettingen, Alemania) con un MWCO de 2 kDa, cargada negativamente y altamente hidrofílica.

Las membranas fueron previamente caracterizadas con agua en distintas condiciones de presión y temperatura.

El proceso de trabajo en base a lo mencionado anteriormente fue el siguiente: Se completó el hidrolizado en el tanque y manteniendo la presión constante se comenzó tomando muestras del permeado y el concentrado con la disolución a pH 8, repitiendo el procedimiento durante una hora cada 15 minutos; al mismo tiempo se fue midiendo el flujo de permeado obtenido que será expresado como J (L/hm^2).

Se repitió el mismo proceso modificando el pH de la disolución a valores de pH 6 y 4, los cuales fueron regulados por el pHmetro conectado al equipo.(CRISON pH28) mostrado en la figura 16.



Figura 16. Regulador de pH conectado al biorreactor

Las muestras tanto de permeado como de concentrado se analizaron a continuación mediante el HPLC analítico, siguiendo el mismo procedimiento previo de preparación de muestras para inyectar en el HPLC, mencionado anteriormente.

Obtenidos los cromatogramas se realizó una comparación con los obtenidos de las fracciones separadas por métodos analíticos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En siguiente apartado se aportarán y comentarán los datos obtenidos durante la experimentación. Para ello se estudiarán los resultados de cada etapa del proceso de forma independiente.

Para una mejor comprensión de los resultados en primer lugar se expondrán los datos físico-químicos de los péptidos obtenidos tras la hidrólisis de BSA con tripsina, que se muestran en la Tabla 11, ya que esos datos aportan la información necesaria para la correcta interpretación de los resultados de los experimentos. La información necesaria para el cálculo de dichas características se muestra en los anexos al final de la memoria.

Posteriormente se describirán los resultados obtenidos en el fraccionamiento e identificación de los péptidos existentes en el hidrolizado y su correlación con los datos teóricos descritos en la Tabla 11.

Por último el apartado, resultados y discusión, finalizará con la descripción de los resultados obtenidos del tratamiento con membranas.

En la tabla 11 se han ordenados los péptidos teóricos que deberían obtenerse tras una hidrólisis completa de la BSA con tripsina. La enzima liga al péptido en las posiciones del carboxilo de residuos Arginina (Arg) o Lisina (Lys).

Se obtiene por tanto una lista de 78 aminoácidos posibles. En la tabla se han incluido también los pesos moleculares de cada péptido ya que éste será un dato importante para poder entender el comportamiento de los péptidos durante los experimentos de fraccionamiento con membranas. El punto isoeléctrico de cada péptido ha sido obtenido mediante la herramienta pI/Mw de la base de datos ExPASy. Del mismo modo se ha estimado la hidrofobicidad/hidrofilia de cada péptido y se ha expresado en unidades Kcal/ res. El cálculo se ha llevado a cabo mediante el método desarrollado por Bigelow (1967) explicado en los apéndices de esta memoria. Por último se ha calculado la carga de cada péptido a pH 7. Este valor también es importante ya que se espera que, por experiencias anteriores, la transmisión de péptidos a través de las membranas sea el resultado de una combinación de tamaño y carga eléctrica a cada pH

Tabla 11: Péptidos teóricos obtenidos del hidrolizado de BSA con tripsina y propiedades de los mismos

péptidos	enlaces	Peso molecular	pI	hidrofobicidad	Carga a pH7
GLVLIAFSQYLQQCPFDEHV K	45-65	2435.2427	5.32	1,31138	-1
DAIPENLPPLTADFAEDK	319-336	1955.9596	3.77	1,2432	-4
HPYFYAPELLYYANK	169-183	1888.9268	6.74	1,80153	0,1
LFTFHADICTLPDTEK	529-544	1850.8993	4.54	1,265625	-2
RPCFSALTPDETYVPK	508-523	1823.8996	6.06	1,39375	0
MPCTEDYLSLILNR	469-482	1667.8131	4.37	1,36374	-1
YNGVFAQECCQAEDK	184-197	1633.6621	4.14	0,81753	-2,1
ECCHGDLLECADDR	267-280	1578.5981	4.10	0,66402	-4
DAFLGSFLYEYSR	347-359	1567.7427	4.37	1,33037	-1
LKPDPNTLCDEFK	139-151	1519.7461	4.56	1,31499	-1
VPQVSTPTLVEVSR	438-451	1511.8427	5.97	1,14597	0
DDPHACYSTVFDK	387-399	1497.6314	4.41	1,04584	-2
LGEYGFQNALIVR	421-433	1479.7954	6.00	1,265005	0
TVMENFVAFVVK	569-580	1399.6926	4.37	1,19952	-1
EYEATLEECCA	375-386	1388.5708	4.09	0,89131	-3,1
YICDNQDTISSK	286-297	1386.6206	4.21	0,97461	-1
ETYGDMADCCEK	106-117	1364.4803	3.92	0,737205	-3,1
SLHTLFGDELCK	89-100	1362.6722	5.30	1,06624	-1
TCVADESHAGCEK	76-88	1349.5460	4.65	0,549835	-2
HLVDEPQNLIK	402-412	1305.7161	5.32	1,231695	-0,9

HPEYAVSVLLR	361-371	1283.7106	6.75	1,377135	0,1
ECCDKP LLEK	300-309	1177.5591	4.68	1,24	-1,1
LVNELTEFAK	66-75	1163.6306	4.53	1,185	-1
CCTKPESER	460-468	1052.4499	6.13	0,81103	-0,1
EACFAVEGPK	588-597	1050.4924	4.53	1,095	-1
CCTESLVNR	499-507	1024.4550	5.99	0,81103	-0,1
SHCIAEVEK	310-318	1015.4877	5.38	0,87769	-1
QTALVELLK	549-557	1014.6193	6.00	1,28876	0
QNCDQFEK	413-420	1011.4200	4.37	0,64375	-1
LVVSTQTALA	598-607	1002.5830	5.52	1,17766	0
NECF LSHK	123-130	977.4509	6.74	0,94375	0
DLGEEHFK	37-44	974.4577	4.65	0,81875	-1,9
YLYEIAR	161-167	927.4934	6.00	1,79214	0
AEFVEVTK	249-256	922.4880	4.53	1,09375	-1
DDSPDLPK	131-138	886.4152	3.93	1,1375	-2
LCVLHEK	483-489	841.4600	6.74	2,7138	0
ATEEQLK	562-568	818.4254	4.53	0,72828	-1
LVTDLTK	257-263	789.4716	5.84	1,006224492	0
NYQEAK	341-346	752.3573	6.00	0,84966	0
CCAADDK	581-587	725.2593	4.21	0,714	-1,1
SEIAHR	29-34	712.3736	6.47	0,74137	0,1
V LASSAR	212-218	703.4097	9.72	0,90678	1
GACLLPK	198-204	701.4014	8.22	1,52082	1
AWSVAR	236-241	689.3729	9.79	1,15787	1

TPVSEK	490-495	660.3563	5.66	1,04125	0
QEPER	118-122	658.3155	4.53	0,67	-1
IETMR	205-209	649.3338	6.00	1,09	0
CASIQK	223-228	649.3338	8.22	1,03292	1
AFDEK	524-528	609.2878	4.37	0,98	-1
VASLR	101-105	545.3405	9.72	1,12	1
FWGK	157-160	537.2820	8.75	1,7875	1
ADLAK	281-285	517.2980	5.88	1,08	0
HKPK	558-561	509.3194	10.00	1,4	2,1
FGER	229-232	508.2514	6.00	0,85	0
DTHK	25-28	500.2463	6.74	0,4875	0,1
LSQK		475.28	8.75	0,975	1
DVCK		464.21	5.83	1,05	0
ADEK		462.21	4.37	0,5625	-1
YTR		439.22	8.75	1,349865	1
VGTR		432.25	9.72	0,725	1
SLGK		404.25	8.47	0,975	1
FPK		391.23	8.75	2,249775	1
QIK		388.25	8.75	1,483185	1
VHK		383.24	8.73	1,06656	1,1
VTK		347.22	8.72	1,216545	1
ALK		331.23	8.80	1,549845	1
LAK		331.23	8.75	1,549845	1
QR		303.17	9.75	0,375	1

FK	294.18	8.75	2,075	1
LR	288.20	9.75	1,575	1
EK	276.15	6.10	0,75	0
LK(2X)	260.19	8.75		
R(2X)	175.11	9.75		
K(3X)	147.11	8.75		

4.1. Hidrolizado

En la primera etapa se llevó a cabo una serie de hidrolizados de BSA como quedó expuesto en el apartado 3.1 de “Materiales y Métodos”. Obtención de fracciones

Para el primer experimento, los valores S/E empleados se basaron en un estudio previo sobre la β -lactoglobulina, (Fernández, 2012) con la finalidad de realizar un estudio comparativo entre ambas proteínas, por lo que se mantuvieron las condiciones y valores de dicho estudio. Este primer experimento fue llevado a cabo con ratios S/E de 45, 131, 221, manteniendo constante la adición de enzima en todos ellos (0,06 g de enzima), dando lugar a un hidrolizado incompleto de la proteína, como se puede observar en la Figura 17.

En dicha figura se puede comprobar que existe un pico final a un tiempo de retención aproximado de 55 minutos que se corresponde con parte de la proteína no hidrolizada. Si bien en todos los casos la hidrólisis fue incompleta, para alcanzar el mismo nivel de hidrolizado fue necesario más tiempo a mayor concentración de sustrato de la muestra. Así mientras que la muestra de 3g/L apenas requirió dos horas para completar el grado de hidrolizado posible, la muestra de 15 g/L requirió de 5 horas para conseguir el mismo resultado.

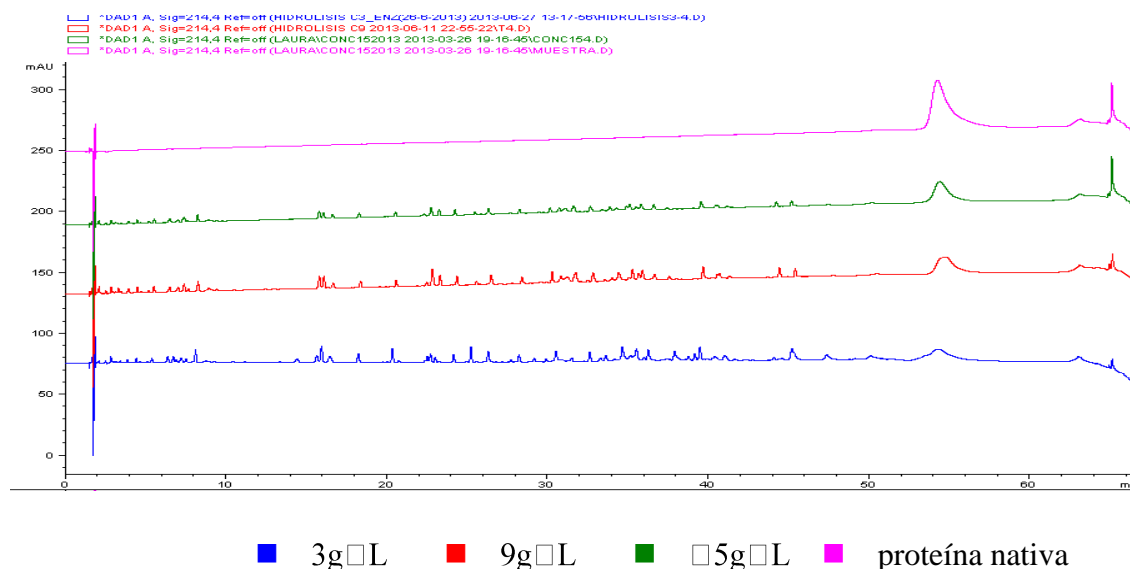


Figura 17: Cromatograma del hidrolizado de BSA con ratios S/E 45, 131, 221

Para conocer el porcentaje de hidrólisis obtenido se estudió como fue decreciendo el área del pico de la proteína nativa, hasta llegar a un punto en el que no disminuyó, sin embargo, se observó que el consumo de NaOH aumentó ligeramente y de forma muy lenta en los últimos intervalos de tiempo, es decir que el medio continuaba acidificando y por lo tanto la enzima aún actuaba, aunque el cromatograma muestra que la proteína nativa no continuó hidrolizando durante dichos intervalos (Tabla 12, Figura 19), si que se observaron diferentes picos en el cromatograma (figura 18). Esto puede ser debido a que el enzima, al no poder atacar en mayor grado la proteína nativa, continuó hidrolizando los enlaces susceptibles de los péptidos ya separados variando ligeramente el cromatograma.

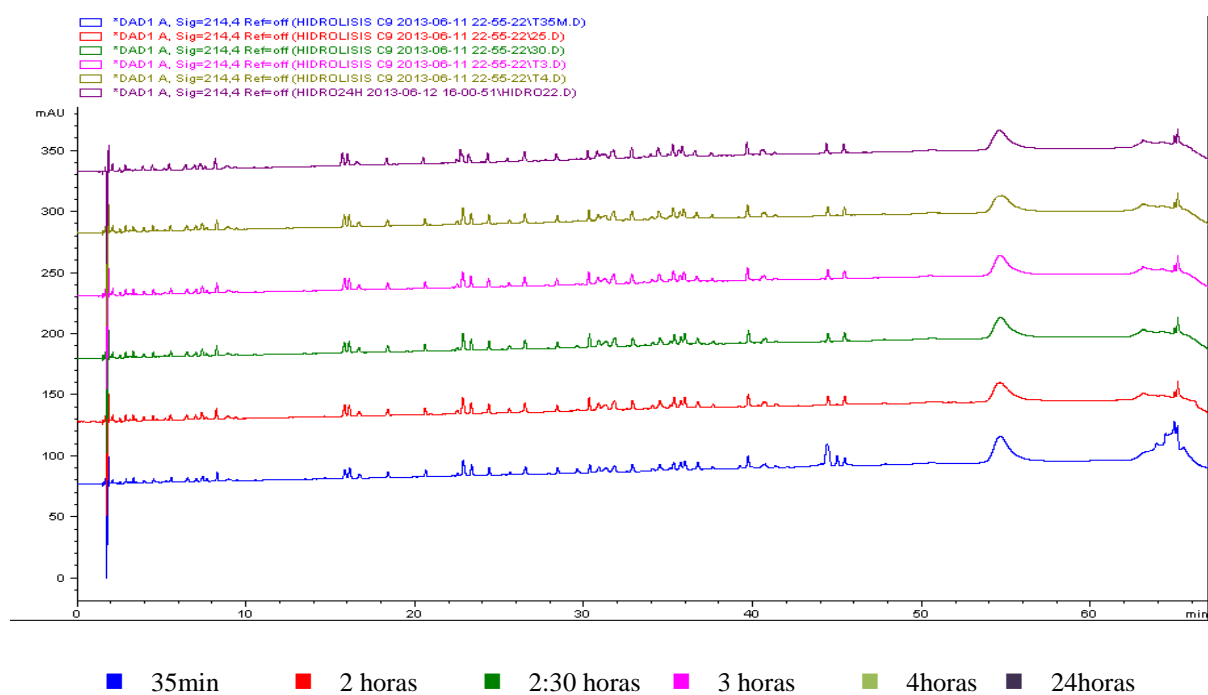


Figura 18. Cromatograma del hidrolizado de BSA con un ratio S/E de 131 a lo largo del tiempo

Tabla 12. Porcentaje de hidrólisis a distintos tiempo para la muestra de hidrolizado de BSA de ratio S/E 45

RATIO S/E 45	
% hidrólisis	Tiempo (h)
38,98	0,58
52,44	2
56,89	2,5
56,95	3
56,96	4
56,98	24

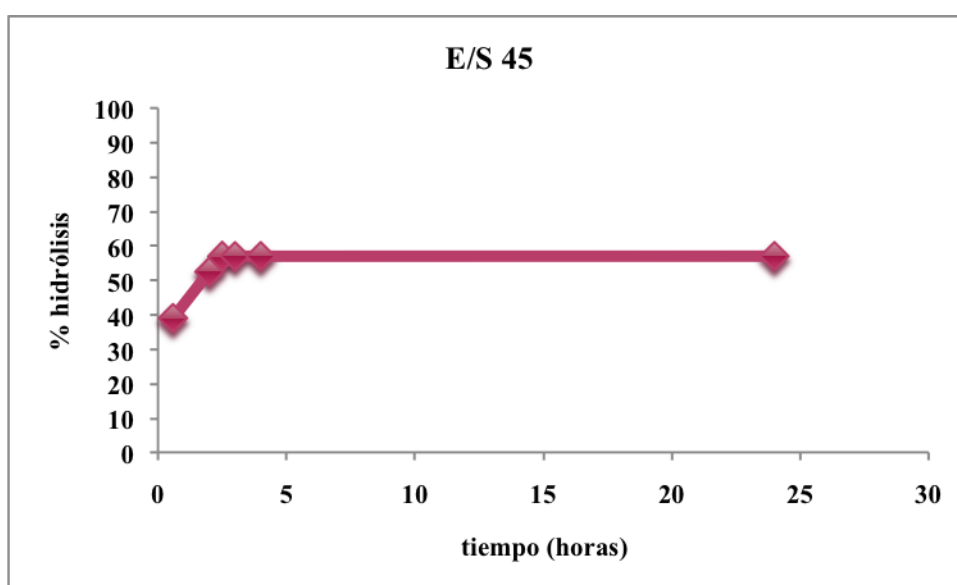


Figura 19. Porcentaje de hidrólisis obtenido a lo largo del tiempo para un ratio S/E de 45

La hidrólisis incompleta difiere de los resultados obtenidos de la hidrólisis de β -Lactoglobulina (Fernández, 2012). Según estos resultados se consiguió una hidrólisis completa de la proteína, con todos los ratios S/E estudiados. Existen varias causas posibles a este comportamiento:

- Puede ser debido a la estructura nativa de la proteína. Siendo la BSA una proteína globular de gran tamaño, la forma globular de la proteína protege la estructura interna, por lo que si con la hidrólisis de los enlaces externos no se consigue desnaturalizar suficientemente la proteína como para desplegar parte de su estructura interna, el enzima no es capaz de seguir actuando sobre ella, tomando entonces como

sustrato péptidos ya separados. Como se comentó anteriormente y se relacionó con el valor de DH.

- Otra causa posible es la existencia de 17 enlaces disulfuro, siendo este tipo de enlaces muy resistentes al efecto de las proteasas

Puesto que no se pudo completar el hidrolizado siguiendo las condiciones del estudio previo mencionado anteriormente, en la siguiente etapa se intentó alcanzar un hidrolizado total.

Para ello se realizó una disolución con una concentración de 3g/L de sustrato (BSA) modificando la cantidad de enzima, obteniendo los siguientes ratios (S/E): 35, 20, 5. Los resultados del hidrolizado quedan reflejados en la Figura 20, en ella se puede observar que no se alcanzó el hidrolizado total hasta el caso del ratio S/E de 5.

Los porcentajes de hidrolizado obtenidos se recogen en la Tabla 13, estando representados en la figura 21.

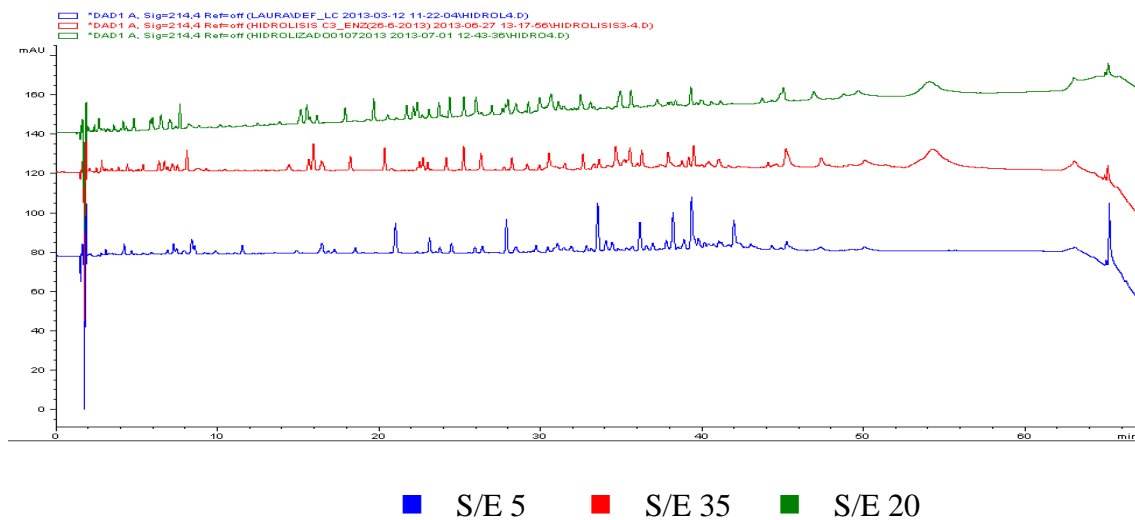


Figura 20. Cromatograma del hidrolizado de BSA con distintos ratio S/E

Tabla 13. Grado de hidrólisis del hidrolizado a distintos ratios S/E

% HIDROLIZADO	RATIO S/E
56,8	45
63,8	35
74,3	20
100	5

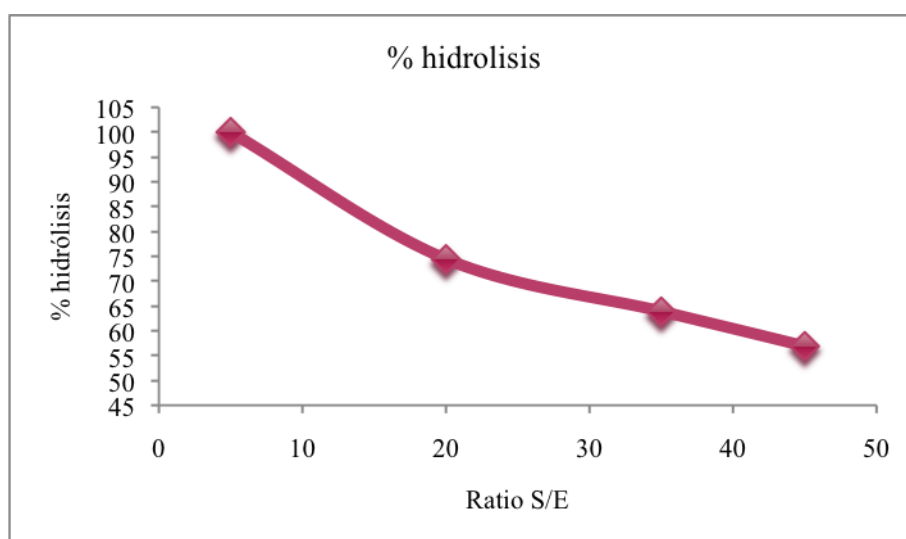


Figura 21. Porcentaje de hidrólisis obtenidos a distintos ratios E/S

De igual modo que ocurría en el experimento anterior, al realizar el cálculo del grado de hidrólisis que sufre la muestra mediante la disminución de área del pico, se puede observar que si bien según el cromatograma desaparece totalmente la proteína nativa, y por lo tanto el grado de hidrólisis es del 100%, se pudo comprobar que durante un tiempo se siguió consumiendo NaOH para contrarrestar la acidificación del medio debida a la ruptura de la proteína, esto se debe a que el enzima continuó actuando fragmentando los péptidos en otros más pequeños y en aminoácidos libres, quedando estable a partir de las 3 horas como queda representado en la Figura 22.

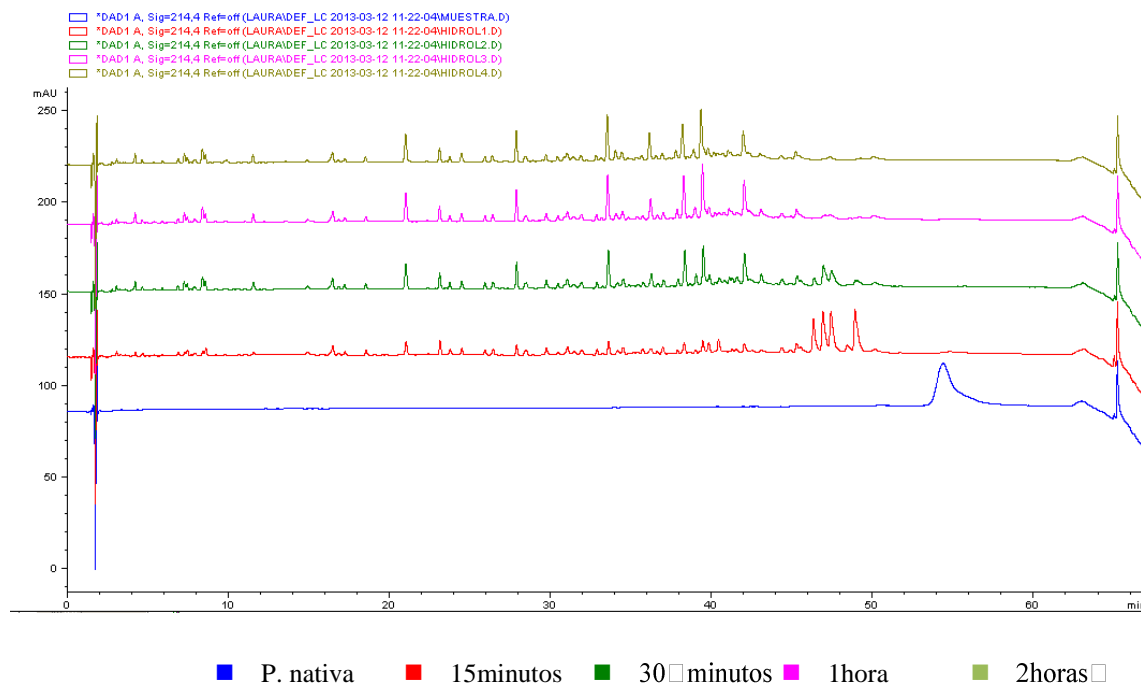


Figura 22. Cromatograma del hidrolizado de ratio S/E 5 a lo largo del tiempo

A partir de los datos obtenidos se puede concluir que, el método enzimático no sería el más apropiado para la hidrólisis de BSA, ya que el ratio S/E requerido para una hidrólisis completa es extremadamente bajo, por lo que se requerirían grandes cantidades de enzima para obtener buenos resultados. Por ello se deben buscar posibles métodos alternativos para conseguir el mismo resultado. Una forma de mejorar los resultados sería realizar una desnaturalización previa de la proteína mediante temperatura, elevándola hasta 55°C conseguiríamos desnaturalizarla sin que tuviera lugar la coagulación. Esto permitiría desplegar su estructura exponiendo la mayor parte de la cadena aminoacídica y facilitando la unión con el enzima en los sitios activos que son inaccesibles de forma natural.

4.2. Obtención de fracciones

Una vez conseguido el hidrolizado, se llevó a cabo la separación de sus fracciones, mediante el método explicado en el apartado 3.2 de “Materiales y Métodos”, para su posterior identificación. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 22 y con el método previamente descrito, se lograron separar 52 fracciones, representadas en la Figura 24. Dicho análisis se realizó únicamente con el hidrolizado del primer experimento en el que no se había completado la hidrólisis, con una muestra de una concentración de 15g/L y un ratio S/E de 221.

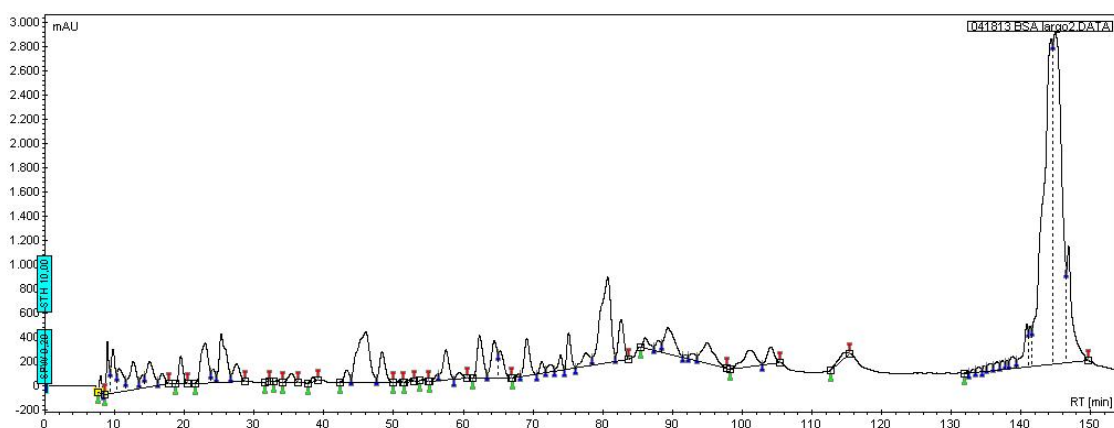


Figura 23. Cromatograma (HPLC semipreparativo) del hidrolizado de BSA de concentración 15g/L

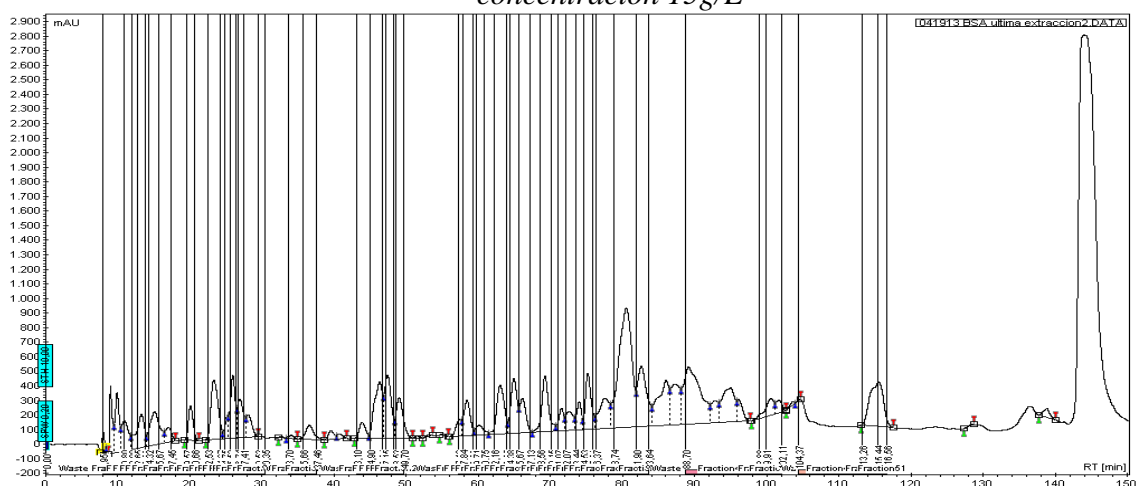


Figura 24. Fracciones (HPLC semipreparativo) del hidrolizado de BSA de concentración 15g/L

4.3. Identificación de péptidos

Todas las fracciones obtenidas (52) se analizaron a continuación mediante el HPLC cuadrupolo, y no todas ellas sirvieron para la identificación de péptidos.

Con dichas fracciones, en base a los pesos moleculares de los compuestos que contenían, se consiguió identificar 25 péptidos, los cuales quedan representados en la Figura 25 y cuyas características se muestran en la Tabla 14.

MKWVTFISLLLLLFSSAYSRGVFRRDTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQ
 CPFDEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMA
 DCCEKQEPERNECFLSHKDDSPDLPKLKPDPNTLCDEFKADEKKFWGKYLEIAR
 RHPYFYAPELLYANKYNGVFQECCAEDKGACLLPKIETMREKVLASSARQRLR
 CASIQKFGERALKAWSVARLSQKFPKAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCHGDLLECA
 DDRADLAKYICDNQDTISSKLKECCDKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAED
KDVCKNYQEAKDAFLGSFLYESRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECCAKDDPH
 ACYSTVFDKLKHLVDEPQNLIKQNCDQFEKLGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTL
 VEVSRSLGKVGTRCCTKPESERMPCTEDYLSLILNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTES
 LVNRRPCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTFHADICTLPDTEKQIKQTALVELLKHKP
KATEEQLKTVMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPKLVVSTQTALA

FRACCIÓN 6		FRACCIÓN 26	
FRACCIÓN 9		FRACCIÓN 28	
FRACCIÓN 11		FRACCIÓN 32	
FRACCIÓN 13		FRACCIÓN 34	
FRACCIÓN 14		FRACCIÓN 36	
FRACCIÓN 16		FRACCIÓN 41	
FRACCIÓN 21		FRACCIÓN 44	
FRACCIÓN 22		FRACCIÓN 45	
FRACCIÓN 24			

Figura 25. Identificación de las fracciones dentro de la cadena de aminoácidos que forma la BSA.

Tabla 14: Péptidos identificados por fracción junto con su nomenclatura y propiedades físico-químicas

	péptidos	enlaces	Peso molecular	pI	hidrofobicidad	Carga a pH7	Fracción
1	LGEYGFQNALIVR	421-433	1479.7954	6.00	1,265005	0	45
2	HLVDEPQNLIK	402-412	1305.7161	5.32	1,231695	-0,9	34
3	HPEYAVSVLLR	361-371	1283.7106	6.75	1,377135	0,1	44
4	LVNELTEFAK	66-75	1163.6306	4.53	1,185	-1	41
5	EACFAVEGPK	588-597	1050.4924	4.53	1,095	-1	11
6	QTALVELLK	549-557	1014.6193	6.00	1,28876	0	45
7	LVVSTQTALA	598-607	1002.5830	5.52	1,17766	0	28
8	DLGEEHFK	37-44	974.4577	4.65	0,81875	-1,9	22
9	YLYEIAR	161-167	927.4934	6.00	1,79214	0	32
10	AEFVEVTK	249-256	922.4880	4.53	1,09375	-1	26
11	DDSPDLPK	131-138	886.4152	3.93	1,1375	-2	20
12	ATEEQLK	562-568	818.4254	4.53	0,72828	-1	11
13	LVTDLTK	257-263	789.4716	5.84	1,006224492	0	21
14	SEIAHR	29-34	712.3736	6.47	0,74137	0,1	9
15	GACLLPK	198-204	701.4014	8.22	1,52082	1	24
16	AWSVAR	236-241	689.3729	9.79	1,15787	1	22
17	TPVSEK	490-495	660.3563	5.66	1,04125	0	6
18	QEPER	118-122	658.3155	4.53	0,67	-1	9
19	AFDEK	524-528	609.2878	4.37	0,98	-1	11/13
20	VASLR	101-105	545.3405	9.72	1,12	1	14/16
21	FWGK	157-160	537.2820	8.75	1,7875	1	11/13
22	FGER	229-232	508.2514	6.00	0,85	0	11
23	DTHK	25-28	500.2463	6.74	0,4875	0,1	11
24	SLGK		404.25	8.47	0,975	1	13
25	VHK		383.24	8.73	1,06656	1,1	9

Cada fracción obtenida con el HPLC semi-preparativo se relacionó también con un perfil cromatográfico determinado por el RP-HPLC, con la finalidad de asegurar que los péptidos identificados se corresponden con picos del cromatograma original. Esto permitió identificar los picos sobre el cromatograma original Figura 32, lo que permitirá determinar posteriormente los péptidos separados mediante las membranas (los tiempos de retención de los péptidos identificados se incluyen en la tabla 17).

Para una mayor comprensión se ha seleccionado algún ejemplo representado en las Figuras 26, 27. En la Figura 26 compuesta a su vez por dos figuras, se observa un único pico aislado que se corresponde con el perfil cromatográfico de la muestra de hidrolizado, en la figura inferior se pueden observar distintas señales, estos picos se corresponden con los péptidos que existen dentro de la fracción, así en este ejemplo se observan dos posibles péptidos.

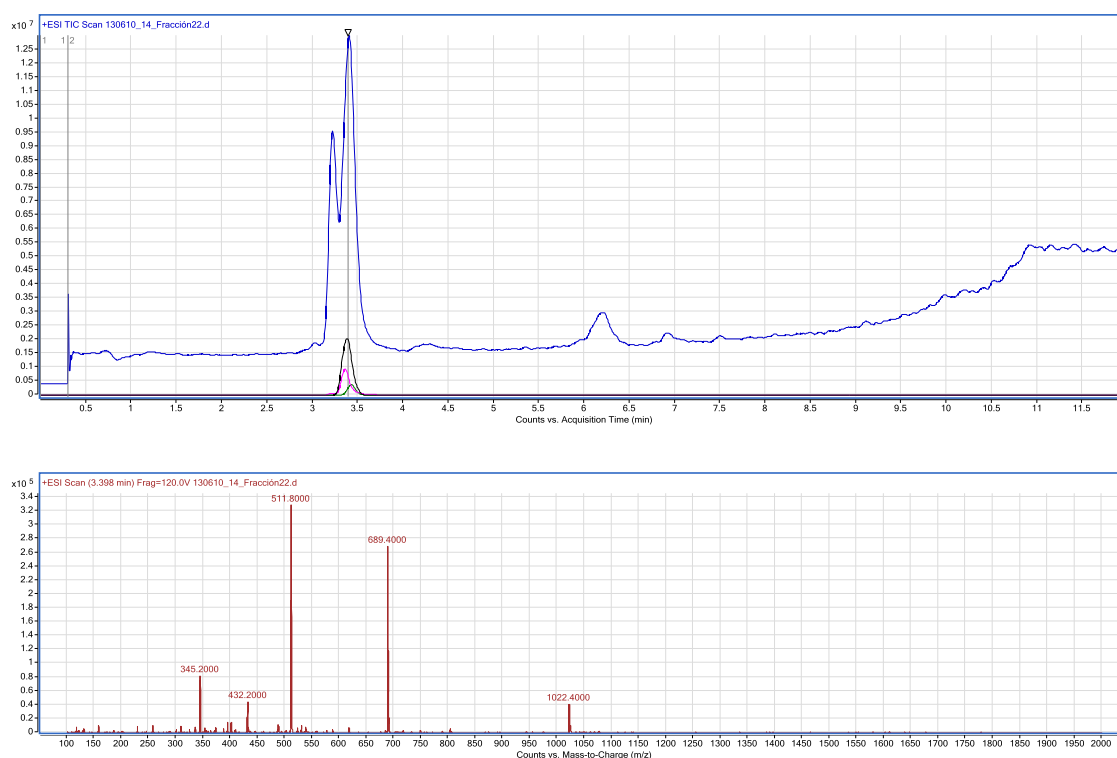


Figura 26. Cromatograma obtenido del HPLC QQQ al analizar la fracción 22

Un segundo ejemplo que contiene varios picos que no se pudieron relacionar con ningún péptido teórico en función de su peso molecular mediante el HPLC QQQ, se puede observar en la figura 22, en este caso no se trataba de un pico bien diferenciado, y como se puede comprobar en la imagen inferior de la figura existían muchos compuestos que no se pudieron identificar, se podría suponer que eran aminoácidos o fragmentos de péptidos, en este caso un pico obtenido correspondía aproximadamente con un péptido teórico pero variaba en cuanto a sus cargas teóricas.

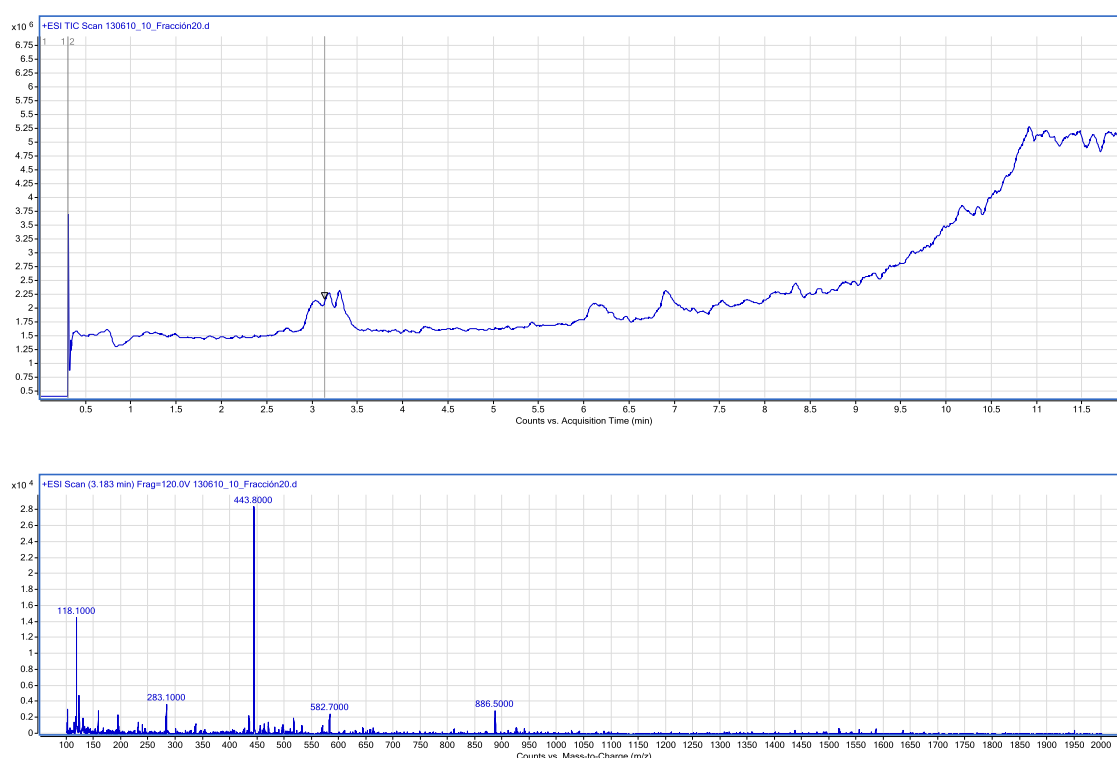


Figura 27: Cromatograma obtenido del HPLC QQQ al analizar la fracción 20.

No todos los péptidos del hidrolizado pudieron ser identificados mediante esta técnica, y dentro de los identificados no todos lo fueron con total seguridad ya que esta técnica se basa en la identificación del peso molecular y existen varios péptidos que poseen pesos moleculares muy similares, lo que puede inducir a error.

Esto es en parte debido a que no se pudo realizar el análisis sobre una muestra completamente hidrolizada, por lo que no todos los péptidos teóricos se encontraban en las fracciones analizadas y pudo haber fracciones que fueran combinaciones de varios péptidos. Por ello queda abierta aquí una posible línea de investigación para próximos estudios.

También sería conveniente realizar el mismo análisis mediante el equipo Q-TOF, con el que se obtendrían más resultados y de mayor fiabilidad, ya que obtendríamos los valores del peso molecular de los aminoácidos que conforman el péptido pudiendo asegurar la secuencia.

En el posterior análisis con membranas se tratará de conseguir la separación de péptidos identificados.

4.4 Fraccionamiento con membranas

Previamente al tratamiento de la muestra con membranas fue necesario un proceso de caracterización de las mismas para comprobar el comportamiento de estas bajo distintas circunstancias, estudiando como afectaba al flujo de permeado (J) la variación de las condiciones del medio.

Se sometió por tanto a las tres membranas empleadas en la experimentación a variaciones de presión, temperatura y pH así como el estudio del flujo de permeado en función del tiempo. Obteniendo los resultados que se exponen en las siguientes figuras.

1. Efecto de la temperatura

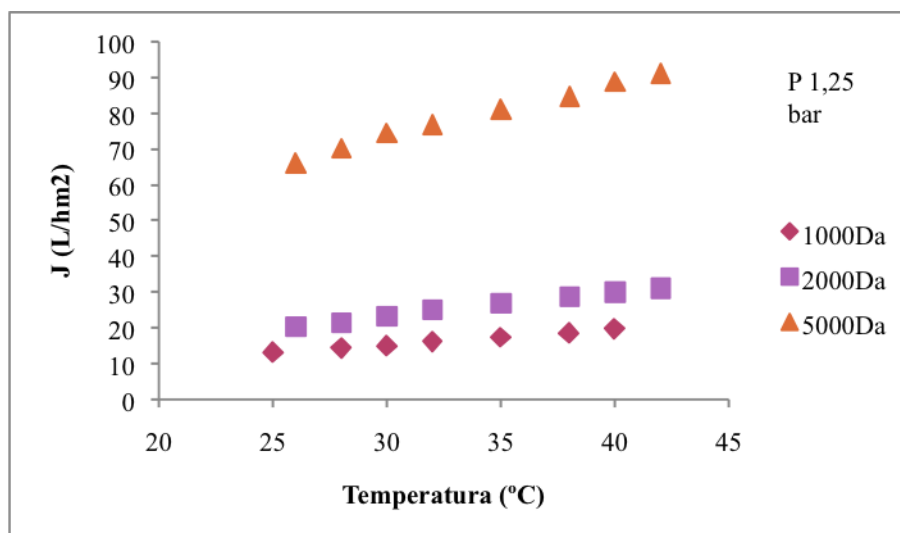


Figura 28: Efecto del aumento de la temperatura (°C) sobre el flujo de permeado (J (L/hm²))

Se puede observar con todas las membranas se produce un aumento de J según se eleva la temperatura, esto se debe tanto a que la viscosidad de agua disminuye según se eleva su temperatura, como a que el tamaño del poro puede aumentar ligeramente con la temperatura, por ello es mayor el flujo de permeado, siendo además más pronunciado según sea mayor el poro de membrana; por lo que el mayor flujo de permeado se dará en la membrana de 5000Da.

2. Efecto de la Presión

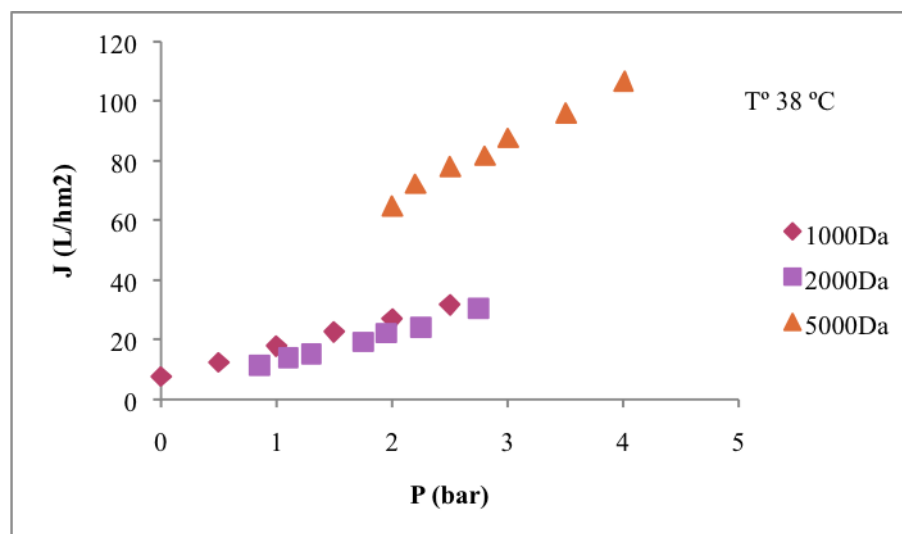


Figura 29: Efecto del aumento presión (bar) sobre el flujo de permeado (J (L/hm^2))

Para este experimento se mantuvo constante la temperatura a 38°C, para simular las condiciones del experimento con el hidrolizado,

Como cabía esperar se produce un mayor flujo de permeado al aumentar la presión; sin embargo en este caso hay que añadir que la presión de partida era mucho mayor en el caso de la membrana de 5000 Da debido a las características de la misma (se trataba de una membrana de características diferentes).

Independientemente de este hecho se puede observar que mientras el efecto de la presión sobre las membranas de 1000 y 2000 Da es similar, en la de 5000Da es mucho más pronunciada.

3. Efecto del tiempo

Otra de las medidas que se realizó fue la toma de muestra cada 15 minutos durante dos horas, de manera que se pudiera comprobar si la membrana muestra el mismo valor de flujo de permeado a lo largo del tiempo, una variación en esta medida podría indicar ensuciamiento de la membrana siendo necesario una limpieza de misma, mediante el método comentado en el apartado “materiales y métodos”.

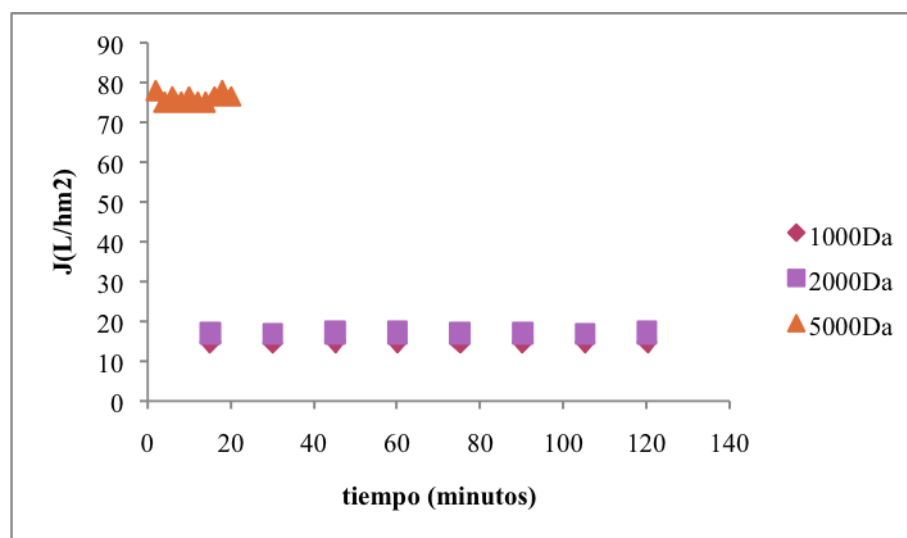


Figura 30: Representación del flujo de permeado frente al tiempo de operación

En caso de la membrana de 5000 Da, al igual que ocurría con la presión, se observa que los datos no se corresponden con la escala de las otras dos membranas, esto es debido a que el flujo de permeado era tan elevado que resultaba imposible establecer el flujo de 15 minutos (ya que el volumen del recipiente de origen es de un litro y se producirá un flujo de aproximadamente 1800 ml/15 min), por ello se tomaron muestras en intervalos de 2 minutos.

Una vez expuesto como se comportan las diferentes membranas frente a la variación de parámetros se estudiará el comportamiento de las mismas cuando se emplea un hidrolizado como alimentación.

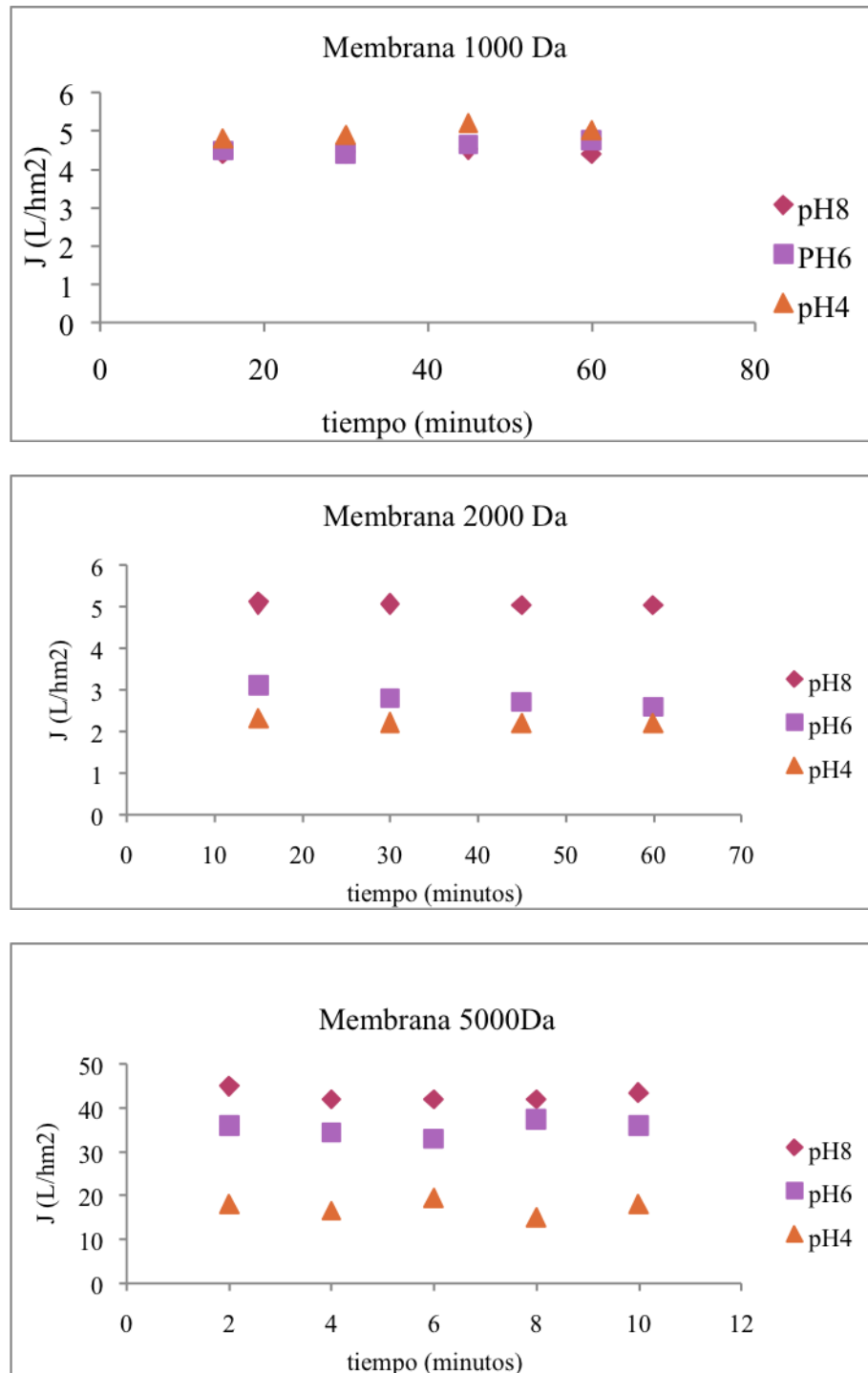


Figura 31: Variación del flujo de permeado en función del pH del hidrolizado, manteniendo temperatura (38°C) y presión constantes para las diferentes membranas estudiadas

Tabla 15. Flujos de permeado en función del distintos pH en membranas de 1000, 2000 y 5000Da.

Tiempo	J (L/hm ²)								
	1000Da			2000Da			5000Da		
	pH4	pH6	pH8	pH4	pH6	pH8	pH4	pH6	pH8
15	4,8	4,48	4,4	2,32	3,1	5,12	18	36	45
30	4,88	4,4	4,48	2,24	2,8	5,08	19,5	33	42
45	5,2	4,64	4,52	2,2	2,72	5,04	15	37,5	42
60	5	4,76	4,4	2,2	2,6	5,04	18	36	43,5

A la vista de los resultados obtenidos mostrados en la figura 31 y la tabla 15 se puede apreciar que el flujo permanece constante en todos los casos a lo largo del tiempo, lo que da a entender que no se produce un ensuciamiento de la membrana, sin embargo al comparar las densidades de flujo en el caso de hidrolizados se observa una clara disminución de flujo debido a la formación de una capa de polarización sobre la superficie de la membrana que, aparentemente, parece no conducir a un ensuciamiento de la membrana.

Cabe destacar que en el caso de la membrana de 1000Da no se aprecian las variaciones en función del pH que tienen lugar en las otras dos membranas, y si bien en la de 2000Da sí que se aprecia la variación se trata de un bajo nivel del flujo, siendo sólo en la de 5000Da en la que se dan importantes variaciones de flujo en función del pH. Hay que destacar que además del tamaño de poro la membrana de 5000Da, debido a sus propiedades intrínsecas, trabaja al doble de presión que las otras dos membranas, facilitando un mayor flujo de permeado.

La disminución del flujo de permeado según disminuye el pH, siendo especialmente drástico en el caso de pH 4, puede ser debido a que a pH ácido las estructuras proteicas tienden a desnaturalizarse perdiendo su estructura, el caso del hidrolizado de BSA se pudo observar un claro enturbiamiento de la muestra así como un aumento de la formación de espuma según disminuía el pH. Esta desnaturalización crea nuevas estructuras de mayor tamaño lo que acaba dando lugar a la disminución del flujo según disminuye el pH del medio.

Una vez completado el proceso de separación mediante membranas se comprobó la eficacia del proceso mediante el análisis de las muestras con el HPLC.

4.4.1 Análisis de permeados y concentrados

Las muestras que se obtuvieron del tratamiento con membranas, tanto en el caso del permeado como del concentrado, fueron analizadas mediante HPLC analítico con la finalidad de determinar la correlación con los cromatogramas obtenidos de las fracciones identificadas.

Para ello en primer lugar se numeraron los péptidos identificados sobre el cromatograma, de forma que en función de los tiempos de elución se pudieran determinar los péptidos obtenidos posteriormente mediante las distintas membranas.

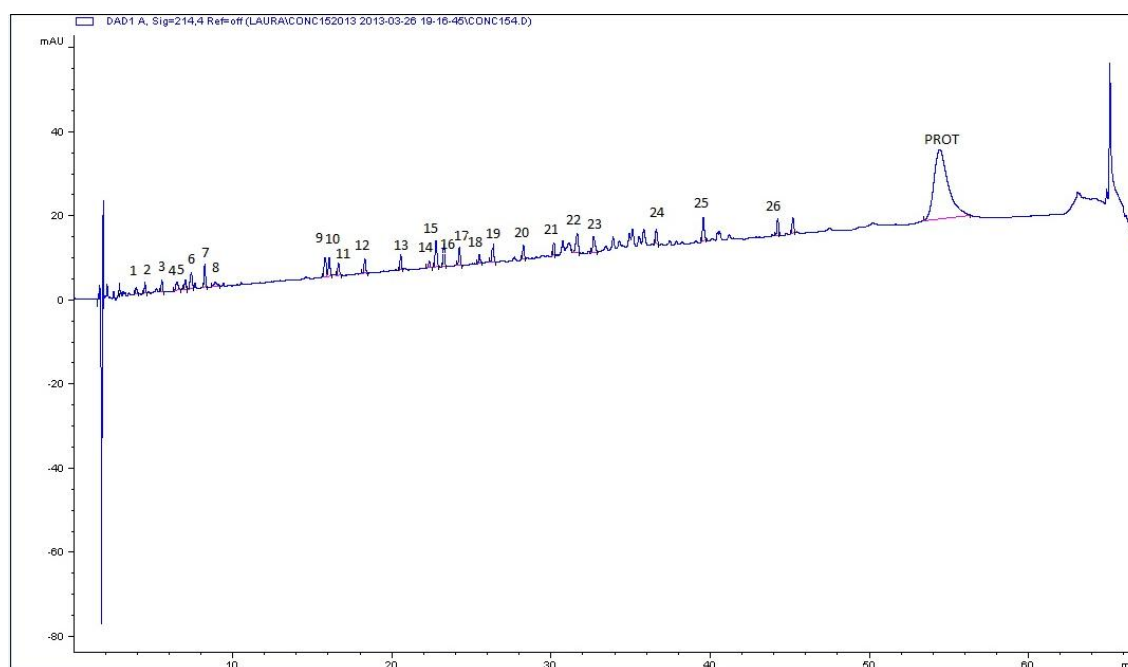


Figura 32 . Péptidos obtenidos mediante fraccionamiento numerados por orden de elución

A demás de la identificación de las fracciones, de los resultados obtenidos de los ensayos con membranas se puede extraer el porcentaje de transmisión (Tr), tomando como concentraciones las áreas bajo los picos cromatográficos de los péptidos del permeado y del retenido o concentrado.

- Membrana de 1000 Da

En el caso de la membrana de 1000Da, tan sólo se obtuvieron 3 picos muy próximos, con la misma retención independientemente del pH del medio como está representado en la Figura 33, y de estos tres picos tan solo uno se correspondía con un péptido identificado.

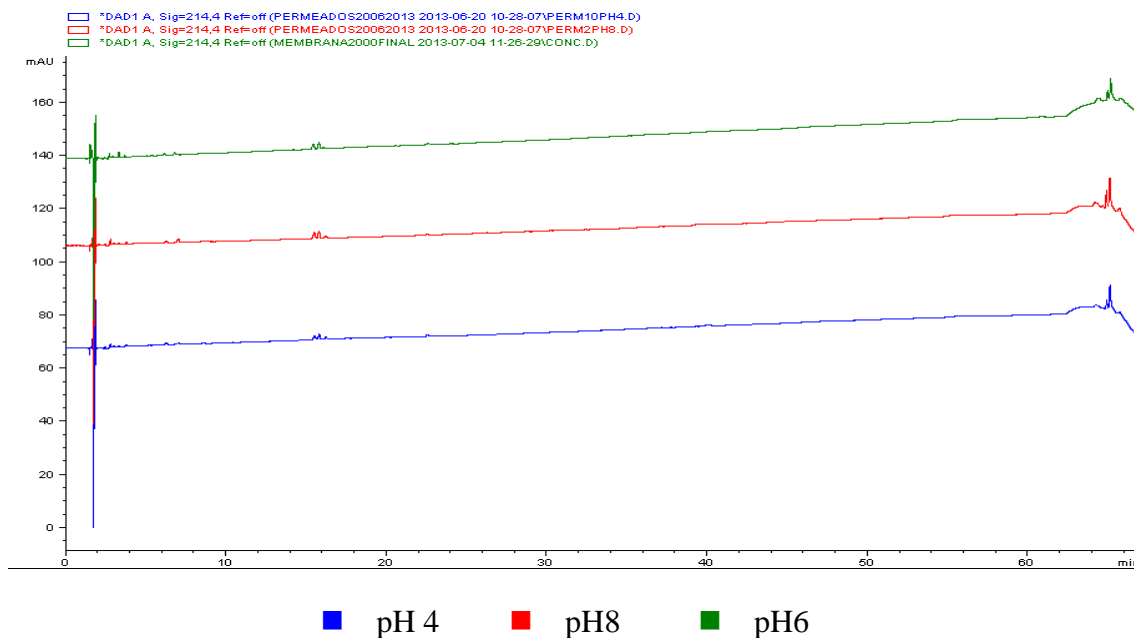


Figura 33: Cromatograma de los permeados obtenidos de la membrana de 1000Da a pH 4, 6

y 8

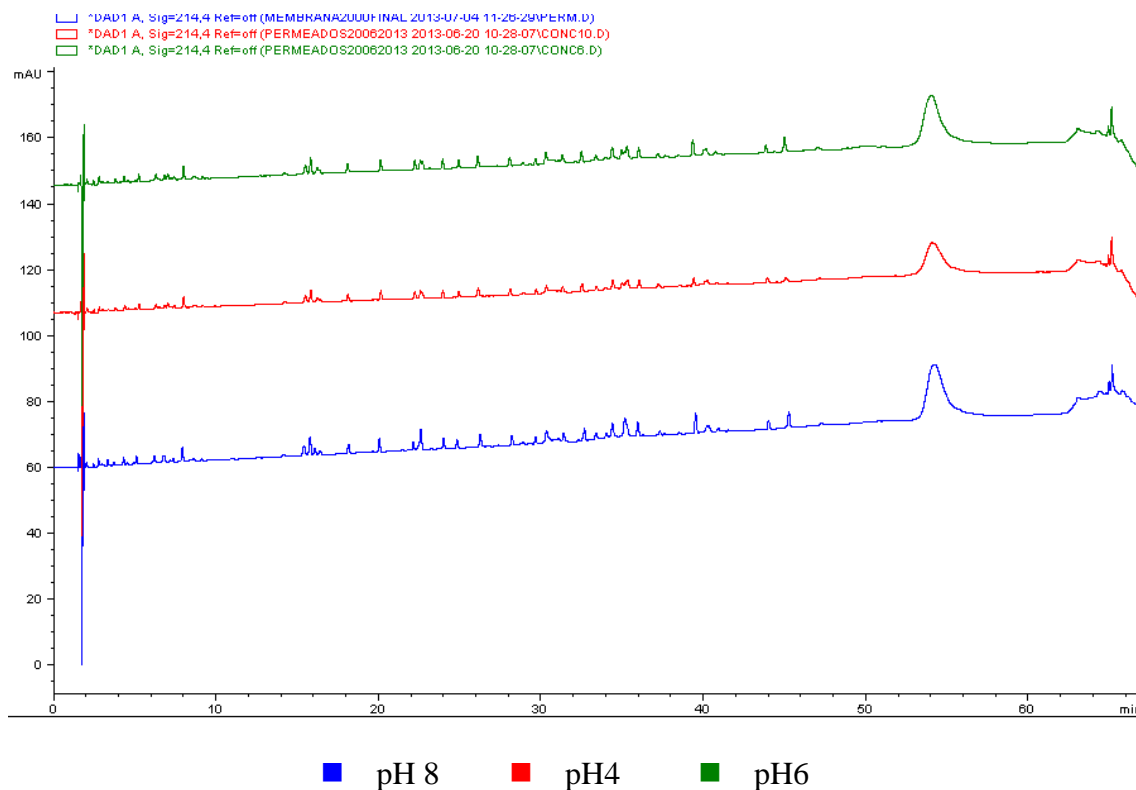


Figura 34: Cromatograma de los concentrados obtenidos de la membrana de 1000Da a pH 4, 6 y 8

La mayor parte del hidrolizado pasó al flujo del retenido como se puede ver en la Figura 34, en esta figura se puede observar también como el pico correspondiente a los restos de la proteína a pH4 ha disminuido, lo que da a entender que ha conseguido hidrolizar en mayor medida, esto es debido al bajo pH del medio, ya que la hidrólisis ácida es otro método para lograr hidrolizar una proteína.

- Membrana de 2000Da

Con la membrana de 2000Da aumentan los picos separados en el permeado, aumentando según disminuye el pH del medio, siendo similares a pH6 y a pH4, como se puede observar en la figura 35.

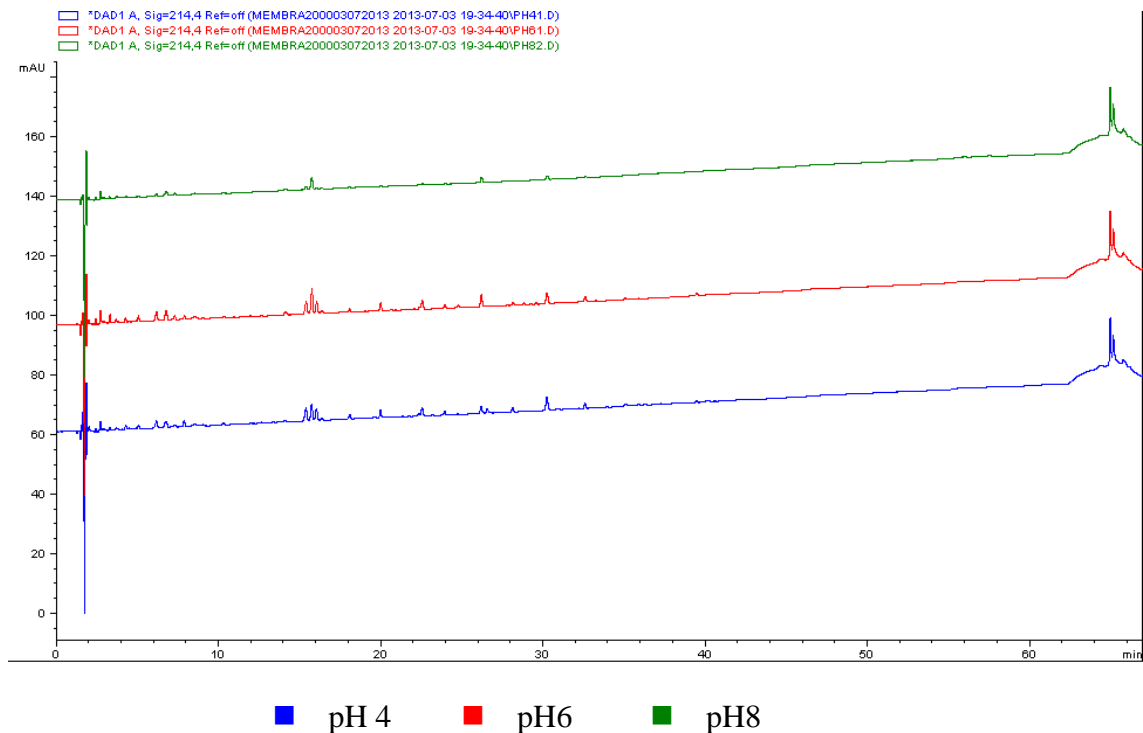


Figura 35. Cromatograma de los permeados obtenidos de la membrana de 2000Da a pH 4, 6 y 8

En este caso se volvió a calcular el valor de Tr, que se encuentra representado en la tabla 16, en ella se puede comprobar como existe un mayor número de péptidos en el permeado que en el caso anterior, y si bien la mayoría se mantienen a los tres pHs, varios los encontramos únicamente al acidificar el medio, y en mayor proporción a pH4, los posibles motivos a los que esto es debido se estudiarán posteriormente.

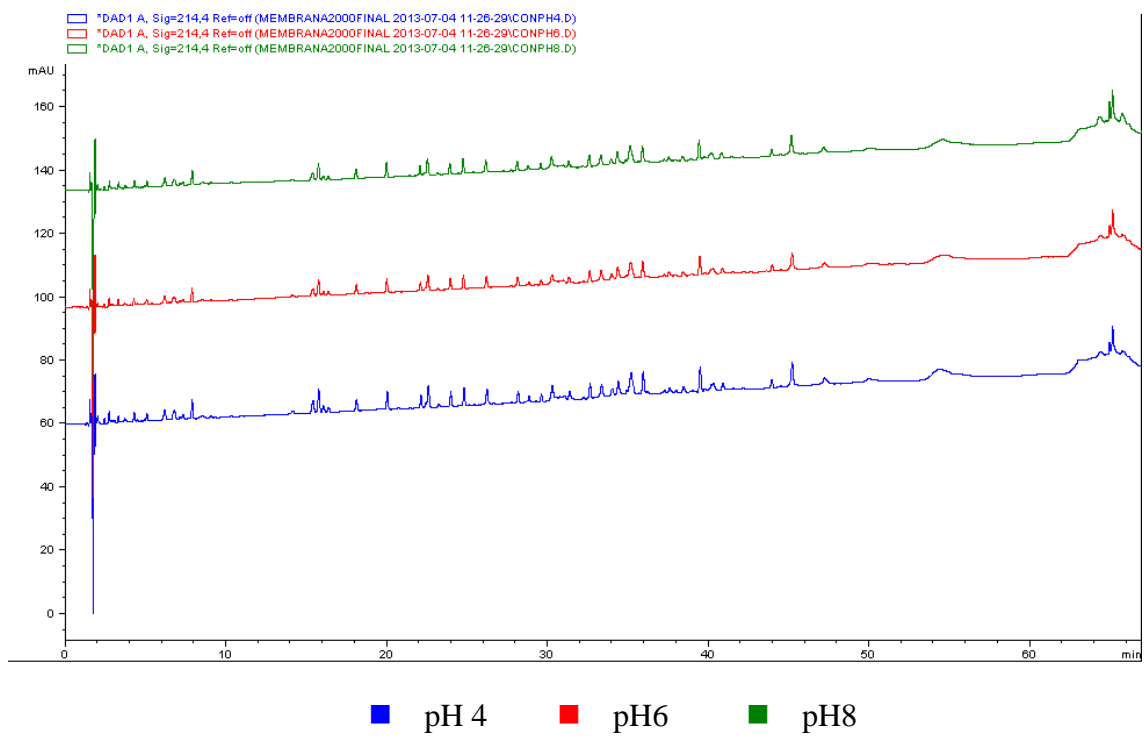


Figura 36. Cromatograma de los concentrados obtenidos de la membrana de 2000Da a pH 4, 6 y 8

● Membrana de 5000Da

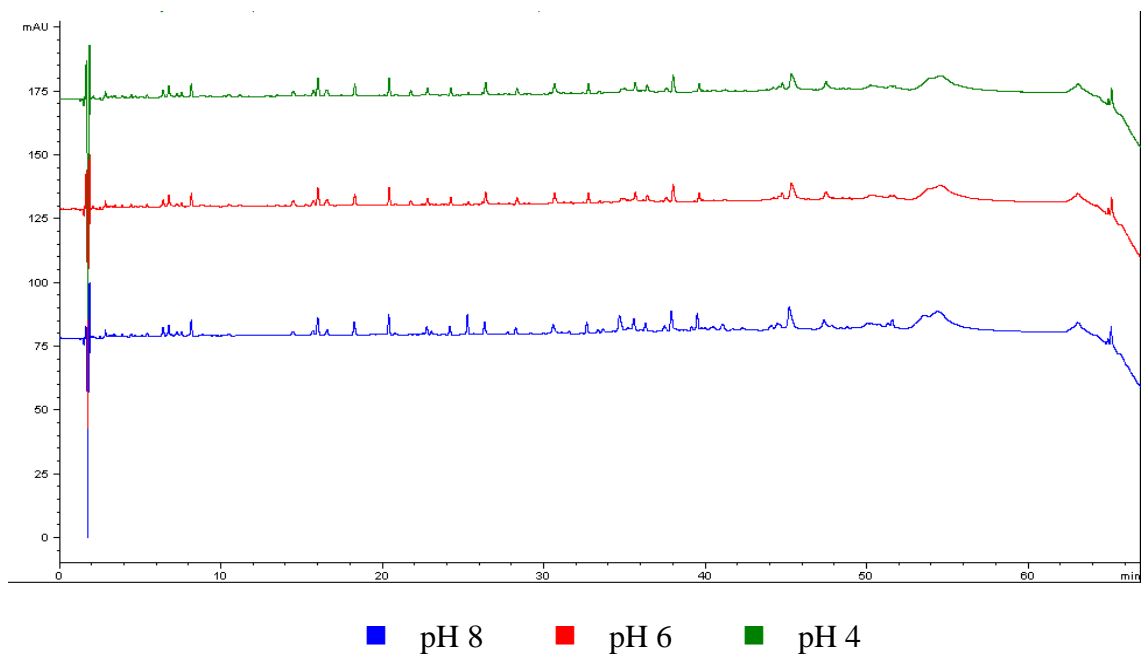


Figura 37. Cromatograma de los concentrados obtenidos de la membrana de 5000Da a pH 4, 6 y 8

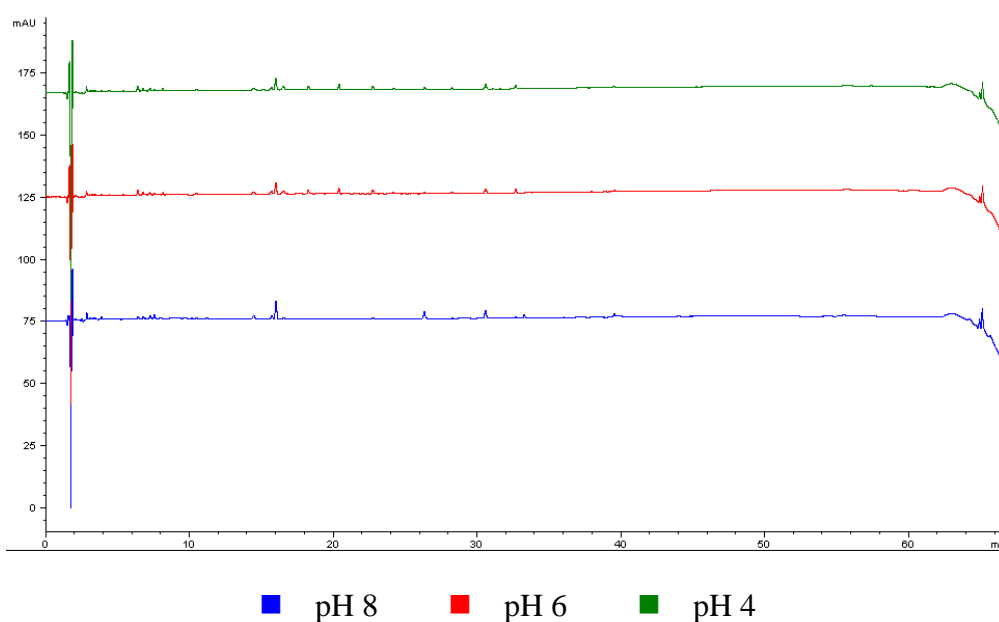


Figura 38. Cromatograma de los permeados obtenidos de la membrana de 5000KDa a pH 4, 6 y 8

Los distintos resultados observados en los cromatogramas de las muestras obtenidas de las membranas se expresarán a continuación en porcentaje de transmisión (Tr), calculando en primer lugar la retención (ecuación 2, descrita del apéndice) en condiciones experimentales, para ello se tomó como referencia las áreas bajo los picos cromatográficos correspondientes a los péptidos identificados, tanto de la muestra de retenido como de permeado a los 3 pH empleados. Una vez calculada la retención se calculó la transmisión (empleando la ecuación 3, descrita en el apéndice). Se calculó el error existente a partir de la media de dos resultados de la misma muestra, dándose un error de ± 2 .

Resulta complejo encontrar una correlación cualitativa ante la transmisión de cada péptido y las propiedades consideradas (peso molecular, pI e hidrofobicidad) y las membranas bajo las condiciones de trabajo (pH 4,6,8).

Las transmisiones elevadas se han obtenido teniendo en cuenta las áreas bajo los picos cromatográficos, estas áreas son en muchos casos demasiado pequeñas lo que puede llevar a errores importantes. El método analítico proporciona en algunos casos la medición

automática, pero en el caso de picos no bien resueltos (con colas o líneas base no recuperadas) es el analista quien establece manualmente el área del pico, lo que contribuye a aumentar los errores analíticos.

Para comprender mejor las diferencias de Tr de las distintas membranas así como el efecto del pH sobre las mismas y para complementar los datos expresados en la Tabla 16 se representaron los resultados en la figura 39.

Tabla 16. Porcentaje de transmisión de los péptidos estudiados en las tres membranas empleadas: 1000, 2000 y 5000KDa

Picos	Péptidos	Tr(%)								
		Membrana 1000Da			Membrana 2000Da			Membrana 5000Da		
		pH4	pH6	pH8	pH4	pH6	pH8	pH4	pH6	pH8
1	F5*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	TPVSEK		0	0	0	0	0	0	0	0
3	QEPER		0	0	0	0	0	0	0	0
4	EACFAVEGPK	0	0	0	60,66	0	0	69,26	0	0
5	AFDEK	0	0	0	68,18	-	53,41	0	0	0
6	VASLR	0	0	0	36,13	0	0	0	0	-
7	F14*	0	0	0	0	0	0	0	52,05	0
8	DDSPDLPK	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	DLGEEHFK	60,26	88,42	74,62	78,34	-	76,63	52,95	20,54	48,23
10	LVTDLTK	53,02	0	0	104,01	48,54	0	68,26	0	59,36
11	GACLLPK	0	0	0	0	0	0	56,24	81,74	0
12	AEFVEVTK	0	0	0	0	0	0	32,29	0	0
13	LVVSTQTALA	0	0	0	40,98	59,49	0	33,51	0	0
14	F28*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	YLYEIAR	0	0	0	0	58,66	0	63,52	0	0
16	HLVDEPQNLIK	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	F38*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	F39*	0	0	0	0	0	0	0	0	61,42
19	F36*	0	0	0	51,22	99,88	52,13	0	81,74	0
20	LVNELTEFAK	0	0	0	0	0	0	0	0	72,73
21	HPEYAVSVLLR	0	0	0	105	79,53		44,52	81,9	
22	F44*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	LGEYGFQNALIVR	0	0	0	32,06	70,18	0	0	0	0
24	QTALVELLK	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	F47*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	F50*	0	0	0	0	0	0	0	0	0

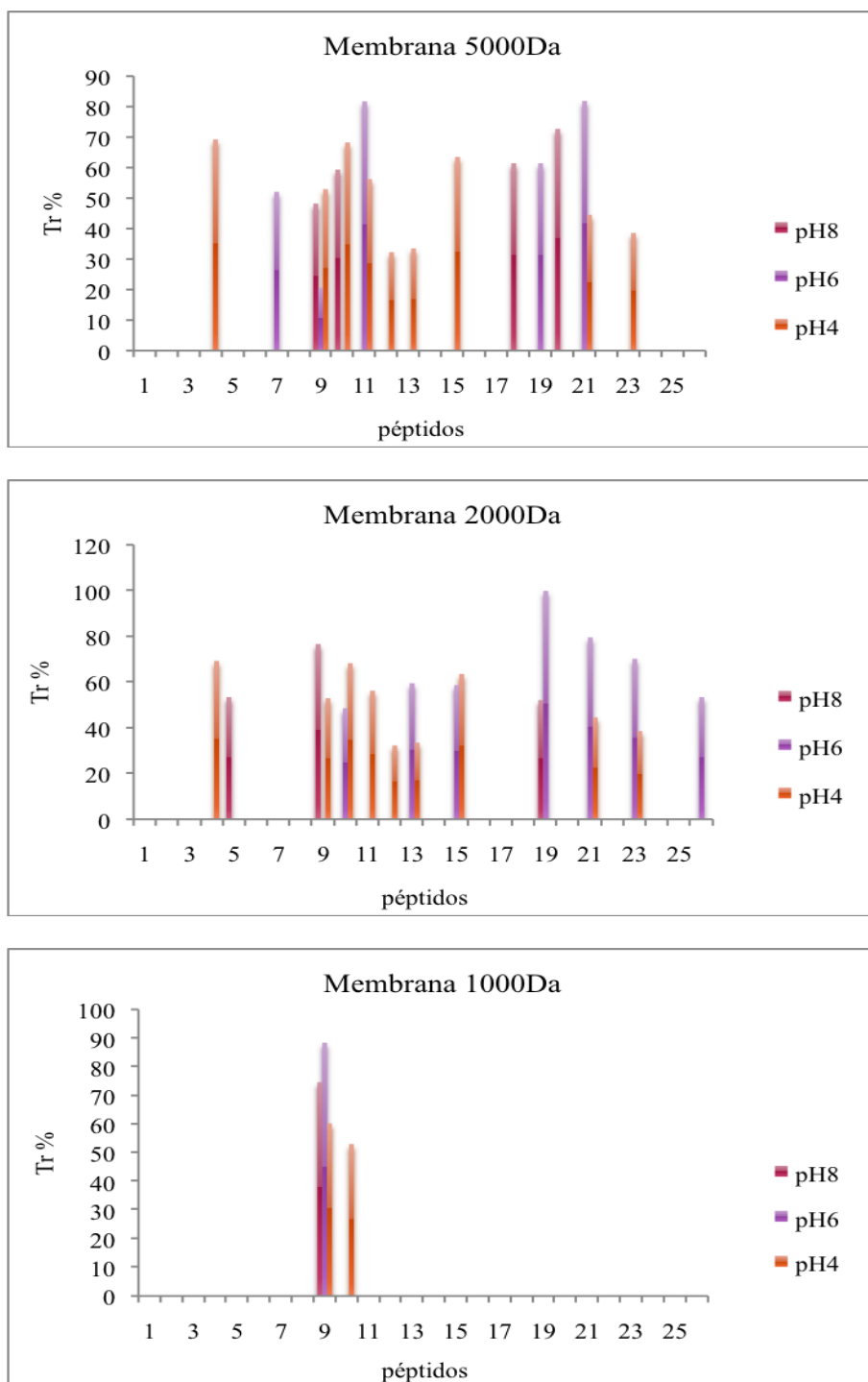


Figura 39. Representación de los valores de Tr para las membranas de 1000, 2000, 5000 Da.

Una vez estudiada la transmisión existente para los diferentes péptidos en cada membrana a diferentes pH, se estudiaron otros criterios que pueden afectar a la separación de péptidos mediante la técnica de membranas.

El primer criterio considerado fue el peso molecular de los distintos péptidos (PM), como muestra la Tabla 17, donde están ordenados en función del orden cromatográfico. Se ha determinado la transmisión teórica, empleando para ello la ecuación propuesta por Ferry en 1938 y modificada por Zeman & Wales en 1981.

$$Tr = (1 - (\lambda(\lambda - 2))^2) \exp(-0,7146\lambda^2)$$

Ecuación 4. Transmisión peptídica teórica (donde $\lambda = PM$ péptido/MWCO membrana)

Tabla 17. Péptidos identificados ordenados en función del orden de elución, con PM, hidrofobicidad (kcal/res) y carga a pH 4,6,8

Picos cromatográficos	tiempos de elución	Péptidos	PM	Hidrofobicidad (kcal/res)	Carga		
					pH4	pH6	pH8
1	3,916	F5*					
2	4,459	TPVSEK	660.3563	1,04	+1	-1	-1
3	5,522	QEPER	658.3155	0,67	1	-1	-1
4	6,480	EACFAVEGPK	1050.4924	1,09	2	0	0
5	6,997	AFDEK	609.2878	0,98	0	-1	-1
6	7,374	VASLR	545.3405	1,12	1	1	1
7	8,219	F14*					
8	8,896	DDSPDLPK	886.4152	1,14	-2	-2	2
9	15,778	DLGEEHFK	974.4577	0,82	+1	-2	-3
10	16,038	LVTDLTK	789.4716	1	0	0	0
11	16,618	GACLLPK	701.4014	1,52	+2	+2	+2
12	18,272	AEFVEVTK	922.4880	1,09	1	-1	-1
13	20,526	LVVSTQATALA	1002.5830	1,18	0	0	0
14	22,320	F28*					
15	22,742	YLYEIAR	927.4934	1,79	3	2	2
16	23,239	HLVDEPQNLK	1305.7161	1,23	+1	0	-1
17	24,224	F38*					
18	25,471	F39*					
19	26,311	F36*					
20	28,237	LVNELTEFAK	1163.6306	1,19	+1	-1	-1
21	30,148	HPEYAVSVLLR	1283.7106	1,34	2	1	0
22	31,616	F44*					
23	32,649	LGEYGFQNALIVR	1479.7954	1,26	2	1	1
24	36,584	QTALVELLK	1014.6193	1,29	1	0	0
25	39,539	F47*					
26	44,215	F50*					

Todos los péptidos obtenidos por la hidrólisis de BSA con tripsina tienen un peso molecular inferior a los 5000Da, por lo que teóricamente en su totalidad deberían ser transmitidos tanto en la membrana de 5000Da como en la 2000Da, sin embargo observamos que no sucede de tal modo, de hecho se puede observar que la gran mayoría de los péptidos no pasan al flujo del permeado aunque el de mayor tamaño posee 1479 Da, como se puede observar en las gráficas representadas en la figura 40.

Sin embargo, en la membrana de 1000 Da, si bien la mayoría de los péptidos identificados también están por debajo de los 1000 apenas pasan al permeado, todo ello lleva a concluir que el PM, por si solo no es un factor lo suficientemente determinante en la separación de péptidos obtenidos del hidrolizado de la BSA.

Esto es debido a que existen otros factores que afectan en gran medida a la transmisión, estos factores dependerán tanto de las propiedades físico-químicas de los péptidos como de la membrana empleada para el experimento; algunas de las propiedades se estudiarán a continuación..

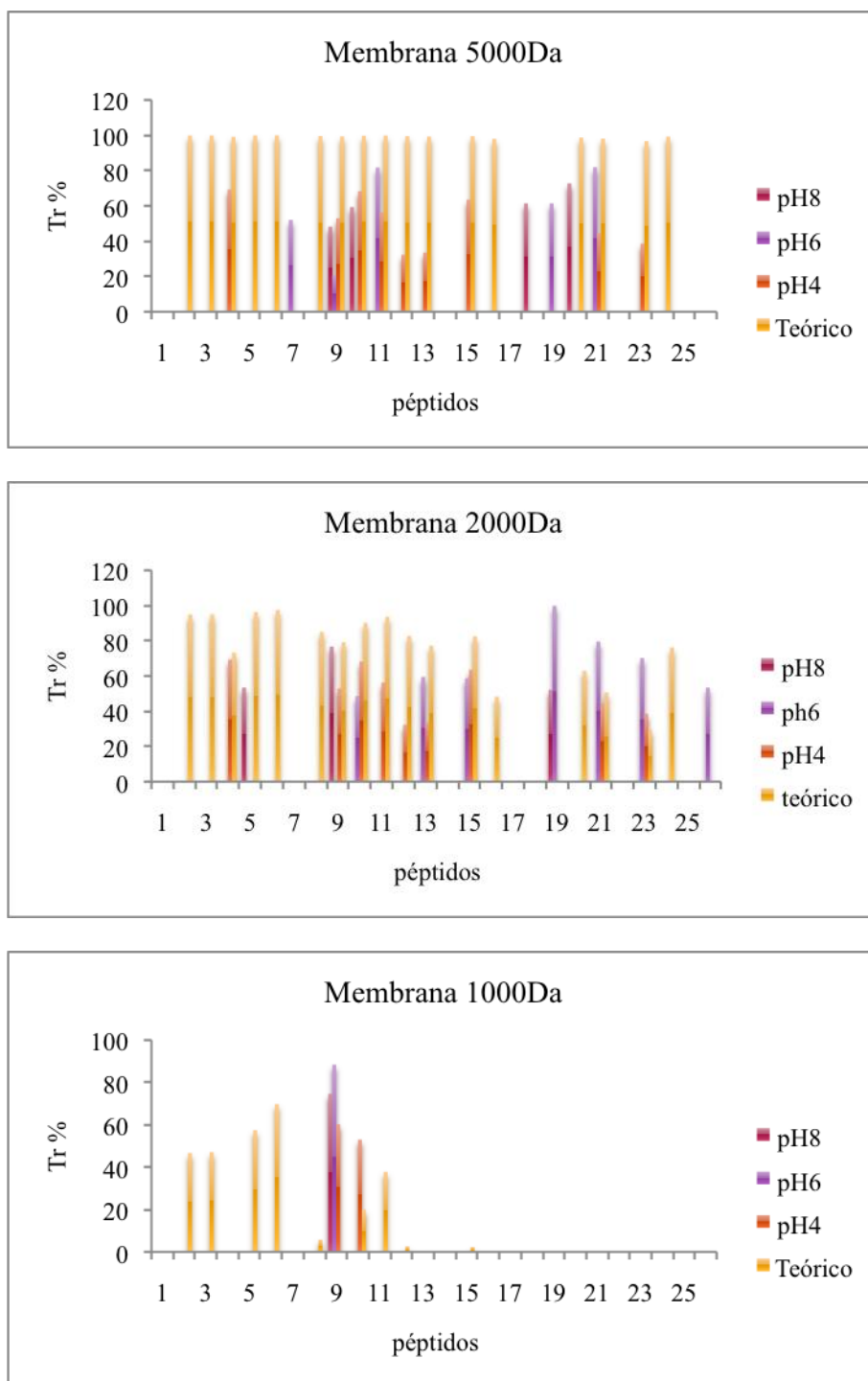


Figura 40. Tr experimental y teórico distinto pH en función de su PM.

En cuanto a la hidrofobicidad, las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas pueden ser un factor determinante en la transmisión. Por ejemplo una membrana con cierta naturaleza hidrofóbica, da lugar a que los péptidos más hidrofóbicos sean favorablemente más transmitidos debido a su carácter similar con la membrana.

El efecto del carácter hidrofóbico de los distintos péptidos está representado en la figura 41, en esta se puede observar que los péptidos hidrofóbicos presentan mayores porcentajes de Tr, especialmente a pH más ácidos, destacando la membrana de 5000Da (membrana más hidrofóbica), sin embargo no se observa el carácter escalonado esperado al descender el carácter hidrofóbico de los mismos, lo que puede venir determinado por la influencia determinante de otros factores adicionales.

Con la membrana de 2000Da, de carácter más hidrofílico, se observa que los valores más elevados son para péptidos de hidrofobicidad más baja.

Con respecto a la membrana de 1000Da ,si bien posee unas características similares a la de 5000Da, no encontramos efecto concluyente del factor de la hidrofobicidad debido a que únicamente permeó un péptido a los 3 pHs (péptido 9) al que se sumó otro (péptido 10) a pH más ácido, siendo la hidrofobicidad en este caso un factor no limitante.

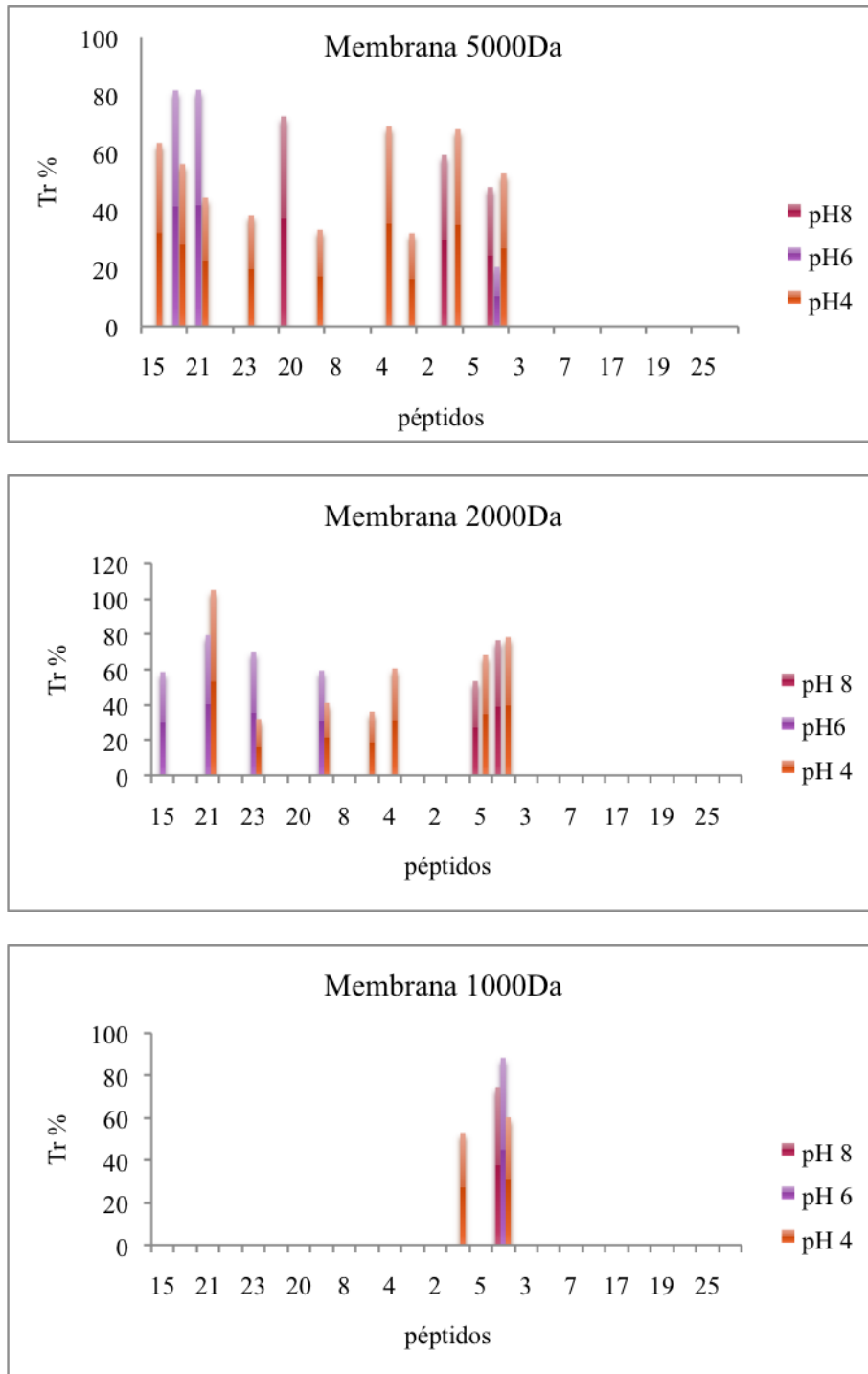


Figura 41. Grado de separación de los péptidos en las membranas de 1000,2000,5000 Da según la hidrofobicidad.

La última variable a estudiar será el punto isoeléctrico, en las siguiente Figuras, se representa la variación de la transmisión de los péptidos identificados en función del mismo y a distintos pHs. Para ello se dividieron los péptidos en función de su pI en tres grupos, péptidos ácidos con $pI \leq 5$, neutros entre 5 y 8 , y básicos cuyo pI es ≥ 8 (Tabla 18).

Tabla 18. Agrupación de péptidos identificados de la BSA en función de su pI

Picos cromatográficos	Péptidos	Ácidos	Neutros	Básicos
1	F5*			
2	TPVSEK		X	
3	QEPER	X		
4	EACFAVEGPK	X		
5	AFDEK	X		
6	VASLR			X
7	F14*			
8	DDSPDLPK	X		
9	DLGEEHFK	X		
10	LVTDLTK		X	
11	GACLLPK			X
12	AEFVEVTK	X		
13	LVVSTQTALA	X		
14	F28*			
15	YLYEIAR		X	
16	HLVDEPQNLIK		X	
17	F38*			
18	F39*			
19	F36*			
20	LVNELTEFAK	X		
21	HPEYAVSVLLR		X	
22	F44*			
23	LGEYGFQNALIVR		X	
24	QTALVELLK		X	
25	F47*			
26	F50*			

* FRACCIONES CORRESPONDIENTES CON LOS PICOS DEL CROMATOGRAMA PERO CUYOS PÉPTIDOS NO HAN PODIDO SER IDENTIFICADOS

El resultado de dicha distribución se muestra en una figura para cada membrana, según el carácter ácido, básico o neutro que poseen los distintos péptidos (Figuras 42, 43, 44) en función de su pI.

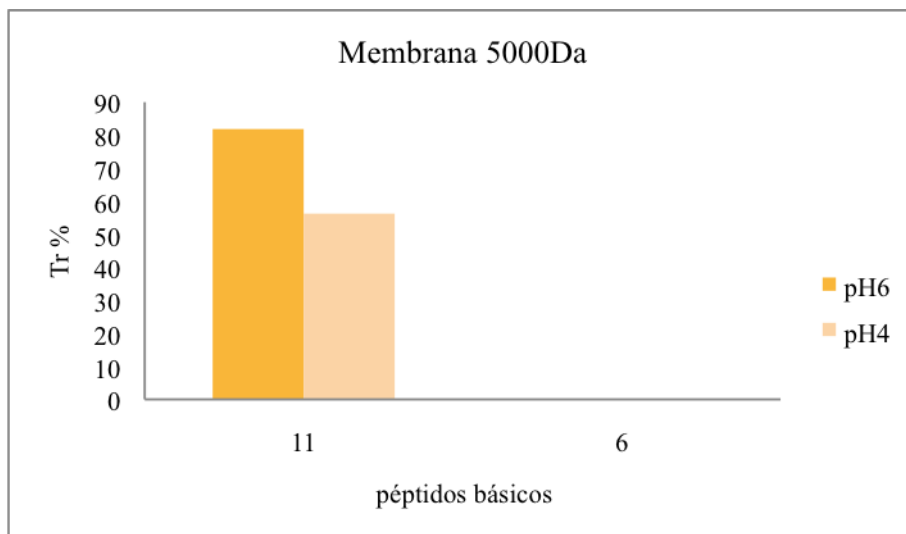
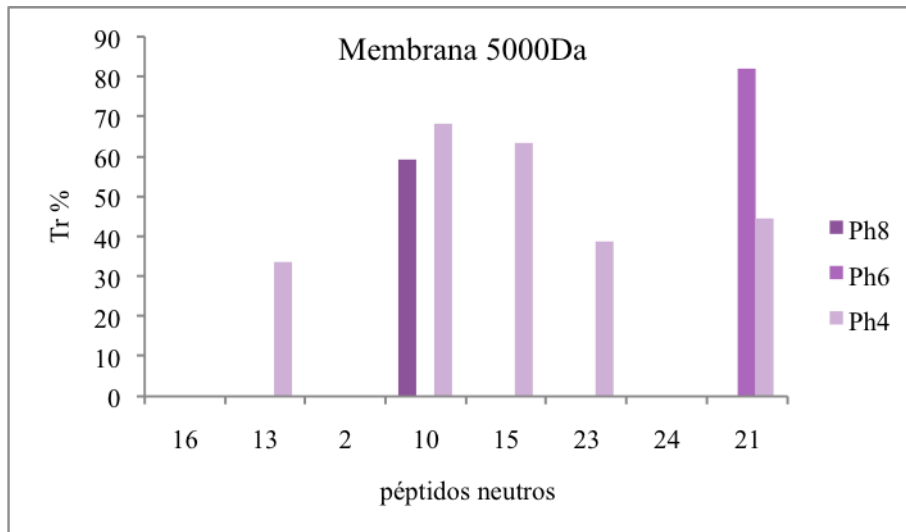
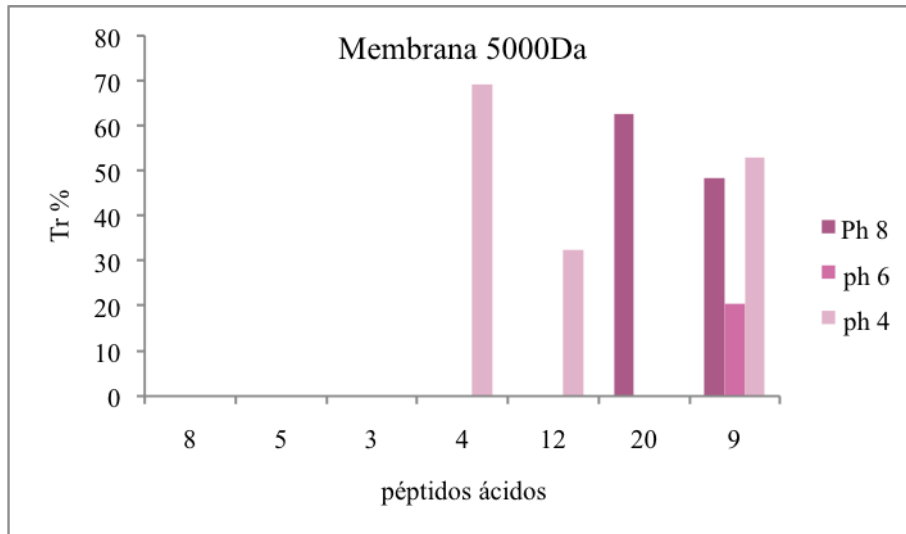


Figura 42. Transmisión peptídica en función del pI para la membrana de 5000Da

La Figura anterior refleja que la mayor transmisión se obtiene para los péptidos neutros, incluso dentro del grupo de los ácidos hay una mayor transmisión para aquellos que se acercan más a los valores de neutralidad. Esto se ve influido a su vez por la carga de la membrana, que en el caso de la 5000Da (PES) estará cargada negativamente a pH superiores a 4, ya que se producen fuerzas de repulsión cuanto más ácido es el péptido.

Para la membrana de 2000Da, cuyos datos están representados en la figura 43, se observa una menor transmisión (aunque similar que la membrana de 5000Da), en lo que a péptidos neutros se refiere, ya que posee similares unas características en cuanto a su carga. Como sucedía en el caso anterior los mejores valores de Tr en su mayoría se observan para valores de pH 4 y pH 6, obteniéndose a penas transmisión para pH 8.

Con la membrana de 1000Da, se obtienen las mejores transmisiones con los péptidos neutros, sin embargo ya que tan solo se obtuvieron dos péptidos en el permeado, no se puede estudiar correctamente el efecto del pI de los péptidos en esta membrana, estando afectada principalmente por el PM del péptidos para su transmisión.

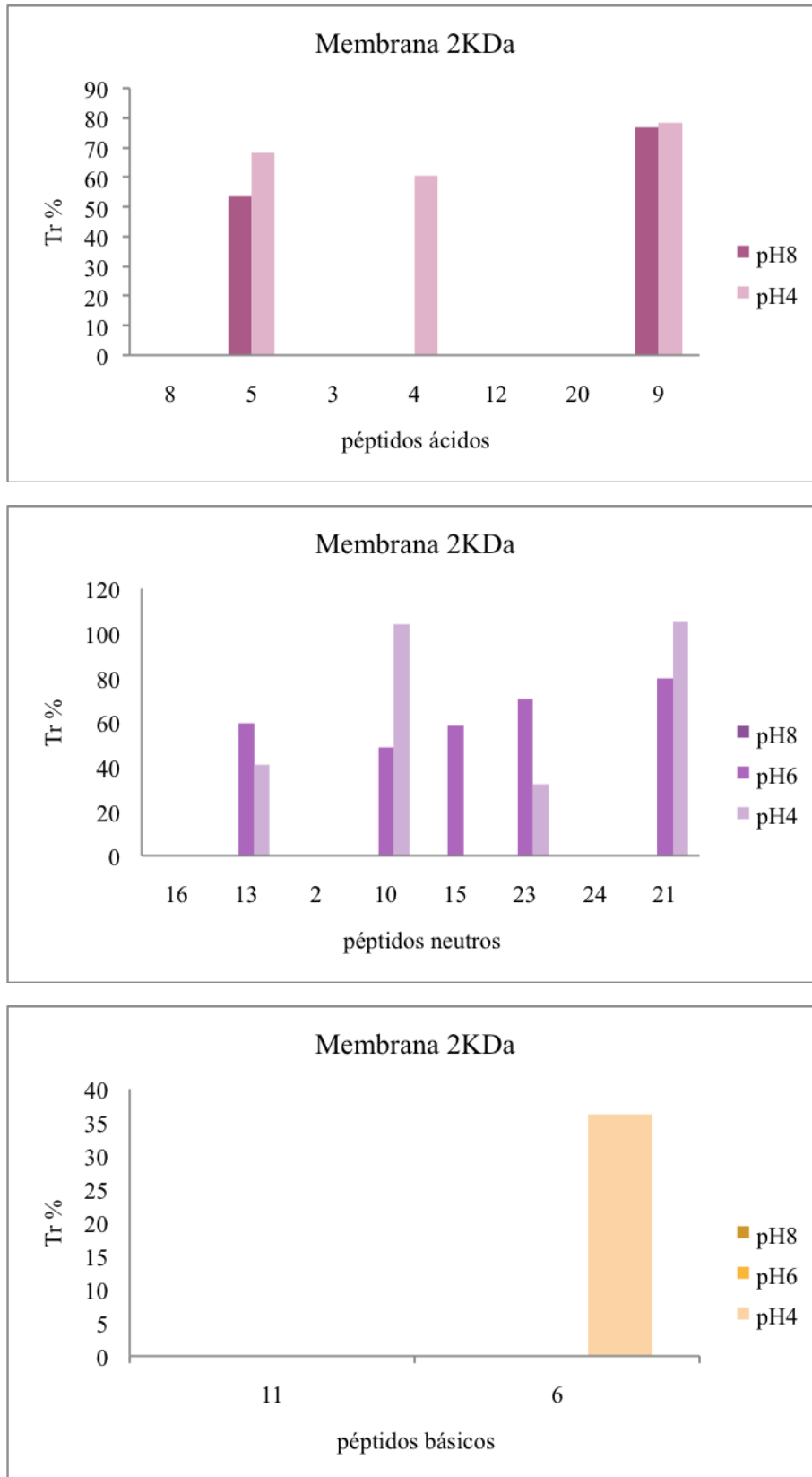


Figura 43. Transmisión peptídica en función del pI para la membrana de 2000Da

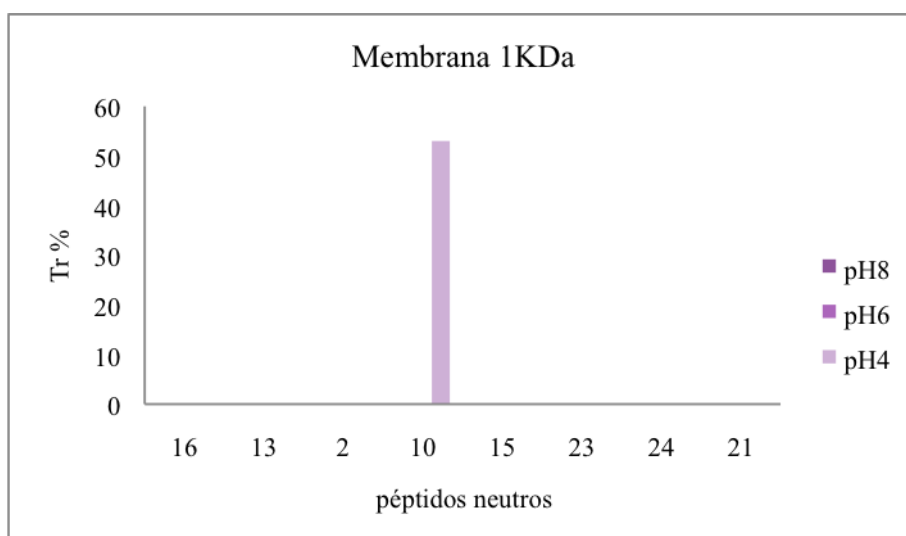
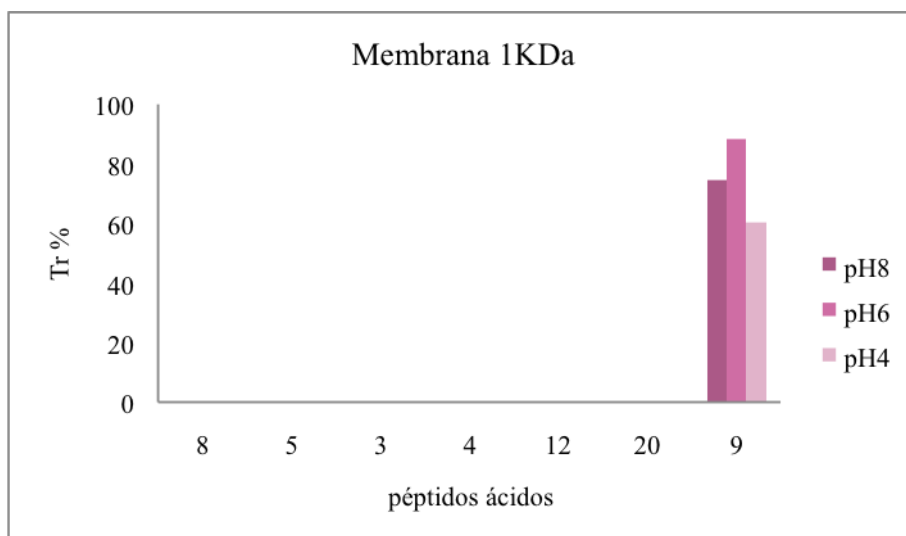


Figura 44. Transmisión peptídica en función del pI para la membrana de 1000Da.

5. CONCLUSIONES

1. Se ha abierto una nueva línea de trabajo de hidrólisis enzimática de BSA sobre la que existe poca literatura.
2. Mediante técnicas de HPLC QQQ se ha identificado un 30% de los péptidos obtenidos en la hidrólisis parcial (sobre un total de 75 péptidos). Aunque la técnica utilizada ofrece información interesante de los péptidos presentes, es más recomendable la utilización de técnicas de identificación, como MALDI-TOF, que permiten la secuenciación de aminoácidos. Este equipo no ha podido ser utilizado en este trabajo.
3. Se demuestra la dificultad de hidrólisis completa de la BSA utilizando tripsina como enzima en las condiciones estudiadas. Los consumos de enzima necesarios para una hidrólisis completa de la proteína resultan antieconómicos (relación S/E = 5) por lo que es necesario buscar nuevos métodos. Se propone la posibilidad de desnaturalizar previamente la BSA mediante pre-tratamientos térmicos moderados con el fin de que la proteína pierda parcialmente su configuración globular responsable de su resistencia a la hidrólisis.
4. Pese a trabajar con un hidrolizado parcial, se ha observado la posibilidad de fraccionamiento de péptidos mediante las membranas utilizadas. Mediante la membrana de 1000 Da de cut-off se han obtenido 2 únicos péptidos en el permeado (VASLR y DDSPDLPK) mientras que con las membranas de 2000 y 5000 Da el número de péptidos obtenidos en los permeados han 10 y 12 respectivamente.
5. En la operación con membranas se ha trabajado a bajas velocidades superficiales por lo que los valores de las densidades de flujo de permeado han sido reducidas, no obstante, no se han detectado importantes efectos de ensuciamiento de las membranas.

6. El análisis de transmisión de los distintos péptidos identificados reflejó que la carga de los mismos es uno de los factores más influye, encontrándose menor transmisión a medida que aumenta el pH del medio, al tornarse la carga más negativa y mostrando repulsiones electrostáticas debidas a la carga negativa propia de la membrana, especialmente para la membrana de 5000 Da; por ello fueron los péptidos neutros los que mostraron mayores transmisiones.
7. En cuanto a la membrana de 2000Da, se vio especialmente influenciada por los efectos del pI e hidrofobicidad, ya que el PM no era un factor tan limitante en este caso, así fueron los péptidos neutros y a valores de pH más bajos los que presentaron mayores valores de transmisión. Con respecto a la hidrofobicidad hay que señalar que fueron los péptidos más hidrofílicos los que mostraron mayores valores de transmisión, esto es debido al propio carácter ligeramente más hidrófilo de la membrana.
8. El efecto del peso molecular es especialmente determinante en la membrana de 1kDa.
9. Por todo ello se puede concluir que ninguno de los efectos por sí solo es totalmente significativo en la transmisión, sino que es el efecto conjunto de varios factores el que determina que se produzca una mayor separación de los péptidos .

6. SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

AcN	Acetonitrilo
BAEE	Unidad de actividad enzimática
bar	Bares
BSA	Sero-albúmina bovina
cm	Centímetro
CMP	Caseínomacropéptido
C_{pi}	Concentración de un componente i en el permeado
C_{pr}	Concentración de un componente i en el retenido
Da	Dalton
DAD	Detector “Diode array”
F	Fracción
g	gramo
h	hora
HCl	ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
J	Densidad de flujo de permeado
KDa	kilodalton
L	Litro
m^2	Metro cuadrado
mg	miligramo
min	minuto
mL	mililitro
MWCO	Peso molecular de corte a partir del cual la membrana retiene al menos el 90% de los sólidos de dicho peso
NaOH	Hidroxido de Sodio
NF	Nanofiltración
Nm	Nanómetro

P	Presión
PESU	Polietilsulfona
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
Ri	Fator de retención
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
S	Segundo
T	Tiempo
T°	Temperatura
TFA	Ácido trifluoroacético
Tr	Transmisión
UF	Ultrafiltración
UV	Ultravioleta
WPC	Concentrado de proteínas de lactosuero

α -La	α -lactoalbúmina
β -Lg	β -lactoglobulina
μ L	Microlitro
μ m	Micrometro

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteina
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutámico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina

K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina

7. BIBLIOGRAFIA

- Bai, H., Ge, S.J., and Zhang, L.X., (1999). *Total hydrolysis of food proteins by the combined use of soluble and immobilized protease*, Int. J. Food Sci. Technol., 34(1), 95-99,
- Baro, L., J. Jiménez, A. Martínez y J. Bouza. (2001). *Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales*. J. Ars. Pharmaceutica. 42(3-4): 135-145.
- Bernal, V. and Jelen, P. (1985). *Thermal Stability of Whey Proteins-A Calorimetric Study*. J. Dairy Sci. 68; 2847-2852.
- Bos, O. J. M., Labro, J. F. A., Fischer, M. J. E., Witling, J., and Janssen, L. H. M. (1989). *The molecular mechanism of the Neutral-to-Base Transition of Human Serum Albumin*. J. Biol. Chem. 264; 953-959.
- Brown J.R. (1975). *Structure of Bovine serum albumin*. Fed. Proc. 34; 591-591.
- Carter, D. C. and Ho, J. X. (1994). *Structure of Serum Albumin*. Adv. Protein Chem. 45; 153-203.
- Chen, S.X., Swaisgood, H.E., and Foegeding, E.A., (1994). *Gelation of β -lactoglobulin treated with limited proteolysis by immobilized trypsin*, J. Agric. Food Chem., 42, 234-239
- Cornelly, V.D., Gruppen, H., de Bont D.B.A., and Voragen, A.G.J., (2001). *Reversed phase and size exclusion chromatography of milk protein hydrolysates: relation between elution from reversed phase column and apparent weight distribution*, International Dairy Journal, 11, 83-92.
- de Wit, J. N. (1989). *Functional properties of whey proteins*. Dairy chemistry. In P. F. Fox (Ed.). Functional milk proteins (Vol. 4). London: Applied Science.
- Emerson, T. E., Jr. (1989). *Unique features of albumin: A brief review*. CRC Crit. Care Med. 17; 690-694.

Fernández, A. (2012). *Fraccionamiento y producción de preteínas y péptidos activos a partir de sueros lácteos y derivados*. Tesis doctoral, Universidad de Oviedo

Ferry, J.D., (1998). *Ultrafilter and ultrafiltration*, Chem. Rev., 11, 376

Fievet, P., Szymczyk, A., Aoubiza, B., and Pagetti J., (2000). *Evaluation of three methods for the characteritaton of the membrane-solution interface: streaming potencial, membrane potencial and electrolyte conductivity inside pores*, Journal of Membrane Science, 168, 87-100.

Figge, J., Rossing, T. H. and Fencl, V. (1991). *The Role of serum-proteins in Acid-Base Equilibria*. J. Lab. Clin. Med. 117; 453-467.

Foster, J. F. (1960). *The Plasma Proteins* (F. W. Putnam, ed.), Vol. Academic Press, New York.1, pp.179-239.

Ghosh, R. And Cui, Z.F., (2000). *Protein purification by ultrafiltration with pre-treated membrane*, J. Membrane Sci., 167, 47-53,

Hermansson, A. M. (1979a). *Aggregation and Denaturation Involved in Gel Formation. In "Functionality and Protein Structure"* (Ed. A. Pour-El.) American Chemical Society, Washington D.C. Series 92; pp. 81-104

Hermansson, A.M. (1978). *Physico-Chemical Aspects of Soy Proteins Structure Formation. J. Texture Studies*9; 33-58.

Hirayama, K., Akashi, S., Furuya, M., and Fukuhara, K. I. (1990). *Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and FRIT-FAB LC/MS*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*173; 639-646.

Hui, Y.H. (2007). *Handbook of food products manufacturing*. New York: John Wiley and Sons, .

Itoh, T., Wada, Y. and Nakanishi, T. (1976). *Differential Thermal Analysis of Milk proteins*. *Agr. Biol. Chem.*40; 1083-1086.

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

Kitts. D.D. and Weiler, K.(2003). *Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery*. *Curr. Pharm. Des.*, 9, 1309-1323.

Korhonen, H. and Pihlanto-Leppälä, A. (2001) *Milk protein-derived bioactive peptides-novel opportunities for health promotion*. *IDF Bull.*, , 363, 17-26.

Korhonen, H. and Pihlanto-Leppälä, A. (2006) *Bioactive peptides: Production and functionality*. *Int. Dairy J*, 16, 945-960.

Kuznetsow, A. N., Ebert, B., Lassmann, G. and Shapiro, A. B. (1975). *Adsorption of small molecules to Bovine serum Albumin studied by the Spin-Probe method*. *Biochim. Biophys. Acta*379; 139-146.

Lapointe, J.F., Gauthier, S.F., Pouliot, Y., & Bouchard, C.R., (2005) *Characterization of interactions between of β -lactoglobulin tryptic peptides and a nanofiltration membrane: Impact on surface membrane properties as determined by contact angle measurements*, J. Membr. Sci., 261, 36-48.

Laursen, I., Briand, P., & Lykkesfeldt, A. E. (1990). *Serum albumin as a modulator of the human breast cancer cell line MCF-7*. Anticancer Research, 10, 343–352.

Lin, V. J. C. and Koenig, J. L. (1976). *Raman studies of bovine serum albumin*. Biopolymers 15; 203-218.

Linden, G. and D. Lorient. (1996). *Bioquímica Agroindustrial: revalorización alimentaria de la producción agrícola*. Editorial Acribia, Zaragoza. España. 454 p.

Liu, X., K. Chung, S. Yang and A. Yousef. (2005). *Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized Lactococcus lactis*. Journal Process Biochemistry 40: 13-24.

Londoño, M. (2006). *Aprovechamiento del suero ácido de queso doble crema para la elaboración de quesillo utilizando tres métodos de complementación de acidez con tres ácidos orgánicos. Perspectivas en nutrición humana*. Revista Perspectivas en Nutrición Humana-Escuela de Nutrición y Dietética-Universidad de Antioquia 16: 11-20.

Madureira, A.R., Tavares, T., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E., and Malcata, F.X., (2010). *Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins*, J. Dairy Sci., 93, 437-455,

McGillivray, R.T.A., Chung, D.W. and Davie, E.W. (1979). *Biosynthesis of bovine plasma proteins in a cell-free system*. Amino-terminal sequence of prealbumin. Eur. J. Biochem. 98; 477-485.

Mellander, O. (1950). *The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts II. Peroral calcium dosage of infants*. Acta of the Society of Medicine of Uppsala. 55, 247-255.

Muro, C.; Álvarez, R.; Riera-Rodríguez; F.; Arana, A.; Téllez, A. (2011). *Production and functionality of active peptides from milk*. Review. Food Sci. Technol. Int., 17, 293-317.

Nau, F., Kerhervé, F.L., Léonil, J., and Daufin, G.,(1995). *Selective separation of typtic β -casein peptides through ultrafiltration membranas: influence of ionic interactins*, Biotechnology and Bioengineering, 46, 246-253

Oakes, J. (1976). *Thermally Denatured Proteins*. J. Chem. Soc. Faraday I72; 228-237

Olsen, K., Otte, J., and Skibsted, L.H., (2000). *Steady-state kinetics and termodinámicas of hydrolysis of β -lactoglobulin by trypsin*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 3086-3089,

Panesar, P., J. Kennedy, D. Gandhi and K. Bunko. (2007). *Bioutilisation of whey for lactic acid production*. Food Chemistry 105: 1-14.

Park, O., Swaisgood, H.E., and Allen, J.C., (1998). *Calcium binding of phosphopeptides derived from hydrolysis of alpha-casein or beta-casein using immobilized tripsina*, J. Dairy Sci., 81(11), 2850-2857,

Patterson, J.E., and Geller, D.M. (1977). *Bovine microsomal albumin: Amino terminal sequence of bovine proalbumin*. Biochem. Biophys. Res. Commun.74;1220-1226.

Pérez, H., (2010), *Identificación de péptidos procedentes de la hidrólisis de proteínas lácteas*, Proyecto de investigación, Universidad de Oviedo,

Prádanos, P., Hernández A., Calvo., J.I., and Tejerina F., (1996). *Mechanisms of pretein fouling in cross-flow UF through an asymmetric inorganic membrane*, J. Membrane Sci., 114, 115-126,

Reed, R.G., Putnam, F.W. and Peters, T. Jr. (1980). *Sequence of residues 400-403 of bovine serum albumin*. *Biochem. J.* 191;867-868.

Rubinson, K.A., and Rubinson, J.F., (2001). *Análisis instrumental*, Pearson educación S.A., Madrid

Ruegg, M., Moor, U. and Blanc, B. (1977). *A calorimetric study of the thermal denaturation of whey proteins in simulated milk ultrafiltrate*. *J. Dairy Res.* 44; 509-520

Snyder, L.R., and Kirkland, J.J., (1976). *Introduction to modern liquid chromatography*, Wiley-Interscience Publication.

Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., Kobayashi, K., (1999). *Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution*. *Protein Engineering* 12, 439–446.

Tong, L. M., Sasaki, S., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). *Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1473–1478.

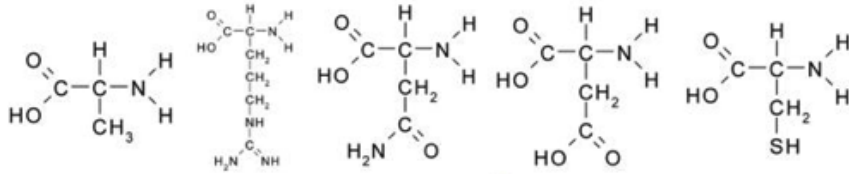
Tsuru, T., Shutou, T., Nakao, S.I., and Kimura S., (1994). *Peptide and aminoácido separation with nanofiltration membranas*, *Separation Science and Technology*, 29(8), 971-984

Zydney, A.L., (1998). *Protein separation using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation*, *Int. Dairy J.*, 8, 243-250.

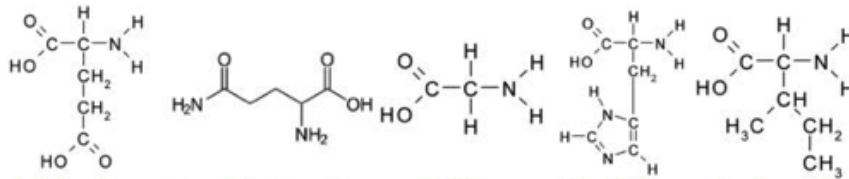
APÉNDICES

AMINOÁCIDOS

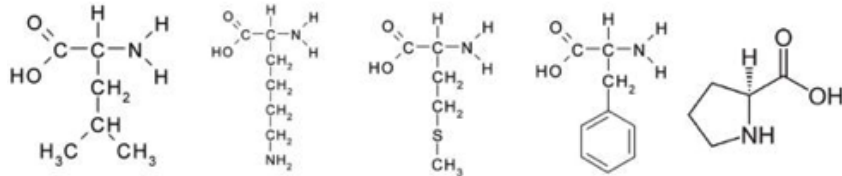
AMINOÁCIDOS



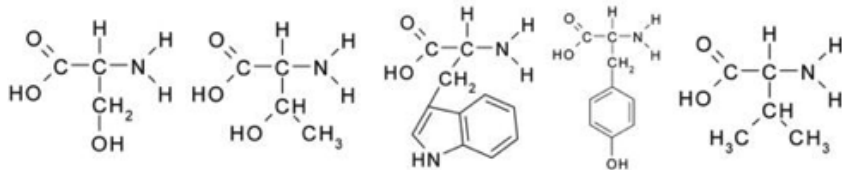
Alanina Arginina Asparagina Ácido aspártico Cisteina



Ácido glutâmico Glutamina Glicina Histidina Isoleucina



Leucina Lisina Metionina Fenilalanina Prolina



Serina Treonina Triptofano Tirosina Valina

Cálculo de las propiedades físico-químicas de los péptidos

1. Hidrofobicidad

Método propuesto por Bigelow (1967) para el cálculo de la hidrofobicidad media de una proteína, tiene como base los términos de energía libre de transferencia de las cadenas laterales de cada aminoácido desde un solvente orgánico a un solvente acuoso propuesto anteriormente por Tanford (1962)

Así la hidrofobicidad media de una proteína o péptido se calcula como:

$$H\Phi_{av} = \sum(x_i \cdot \Delta f_i) \text{ (Ec. 1)}$$

Donde x_i es la fracción molar del aminoácido i en el péptido en cuestión y Δf_i es el valor aportado por Tanford (1962) para cada aminoácido.

Aminoácido	$H\Phi_{av}$ (Kcal/res)	Aminoácido	$H\Phi_{av}$ (Kcal/res)	Aminoácido	$H\Phi_{av}$ (Kcal/res)	Aminoácido	$H\Phi_{av}$ (Kcal/res)
Triptófano	6	Lecina	2,4	Alanina	0,75	Histidina	
Isoleucina	2,95	Valina	1,7	Arginina	0,75	A. Aspártico	
Tirosina	2,85	Lisina	1,5	Treonina	0,45	A. Glutámico	
Fenilalanina	2,65	Metionina	1,3	Glicina		Amidas	
Prolina	2,6	Cisteína/2	1	Serina			

2. Carga

La evaluación de la carga eléctrica peptídica en función del pH se realizó a partir de la contribución de cada grupo lateral cargado. Teniendo en cuenta que, de acuerdo a la ecuación de Henderson-Hasselbalch, predomina la forma ácida si el pH de la disolución es menor que el pK_a del compuesto, y predomina la forma básica si el pH de la disolución es mayor que el pK_a del compuesto.

3. Punto isoeléctrico y peso molecular

Se precisaron a partir de las herramientas Compute pI/MW y PeptideMass respectivamente, ofrecidas por www.expasy.org.

MEMBRANAS

Es necesario definir algunos términos que caractericen la acción de una membrana sobre el transporte de una solución de la fase retenido a la fase permeado. Así el factor de retención (R_i) expresado en porcentaje, que describe la relación entre la concentración de un componente i en la fase permeado y la fase retenido, y que varía entre 0 y 1.

$$R_i = (1 - (C_{pi}/C_{ri})) \times 100 \text{ (Ec.2)}$$

Por el contrario la transmisión se un componente i que varía entre 0 y 1 y que se expresa también en porcentaje, viene determinado por:

$$T_{ri} = 100 - R_i \text{ (Ec.3)}$$