

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“Hidrólisis enzimática de Seroalbúmina
Bovina. Producción de péptidos bioactivos.”**

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

REBECA FERNÁNDEZ ALONSO

JULIO, 2015





PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Francisco Riera Rodríguez (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que D. Rebeca Fernández Alonso ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, curso 2014-2015.

Oviedo, 13 de Julio de 2015

D. (Tutor) *Francisco Riera*

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS.

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

A Fátima, por su paciencia, por todas las dificultades que superamos juntas y por ayudarme siempre en todo lo que necesitaba.

A mis compañeros de laboratorio Eva, Rocío, Ángela y Adrián por amenizarme las duras horas de trabajo y siempre estar cuando se os necesitaba.

A mi familia, especialmente a mis padres, que me han dado esta oportunidad, por su cariño y apoyo constante, y por estar siempre a mi lado tanto en los buenos como en los malos momentos.

A Rubén, por aguantarme, escucharme y ser capaz de animarme en todo momento.

Y por último, a mis amigos, especialmente a Gema, cuyos ánimos y ayuda me han permitido soportar mejor los largos días de trabajo.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

1. Resumen.....	6
2. Abstract.....	7
3. Lista de figuras.....	8
4. Lista de tablas.....	10
5. Introducción	11
6. Consideraciones teóricas.....	14
6.1. Proteínas alimentarias	15
6.2. Fuentes de proteínas alimentarias	15
6.2.1. El lactosuero	16
6.2.2. La sangre.....	20
6.3. Bioactividad de péptidos.....	21
6.4. Seroalbúmina bovina (BSA).	23
6.4.1. Descripción	23
6.4.2. Estructura de la BSA	24
6.4.3. Composición aminoacídica	24
6.4.4. Estructura primaria, secundaria y terciaria de la BSA.....	24
6.4.5. Puentes disulfuro	26
6.4.6. Funciones de la BSA	27
6.4.7. Cambios conformacionales según el pH	27
6.5. Hidrólisis de la BSA.	28
6.6. Proteasas.....	29
6.6.1. Descripción.	29
6.7. Pepsina.	30
6.7.1. Estructura de la pepsina.	31
6.7.2. Mecanismo de reacción de la pepsina	32

6.8. Métodos para la separación y fraccionamiento de péptidos.....	33
6.8.1. Técnicas con membranas.	33
6.9. Cromatografía líquida de reparto en fase reversa.	40
6.10. Escala semipreparativa.....	42
6.11. Medida de grado de hidrólisis (DH): métodos.....	42
6.11.1. Determinación de los grupos α -amino libres.....	43
6.11.2. Determinación de los protones liberados mediante potenciometría.....	44
6.12. Espectrometría de masas (LC-ESI-MS/MS).	44
6.13. Herramientas virtuales de proteómica.....	45
7. Materiales y métodos.....	46
7.1. Hidrólisis y determinación analítica de péptidos de la BSA.....	47
7.1.1. Hidrólisis de la BSA.....	47
7.1.2. Determinación de péptidos.....	49
7.2. Fraccionamiento del hidrolizado mediante técnicas con membranas.	52
8. Resultado y discusión.....	55
8.1. Etapa de hidrólisis de la BSA.....	57
8.2. Obtención de fracciones.....	59
8.3. Identificación de péptidos.....	62
8.4. Análisis de permeado y concentrados.....	74
9. Conclusiones.....	83
10. Abreviaturas.....	85
11. Bibliografía.....	89

1. RESUMEN.

En los últimos años, se ha incrementado el interés por el aprovechamiento de los subproductos de la industria alimentaria, especialmente la industria láctea y cárnica, cuyos subproductos, el lactosuero y la sangre, han demostrado tener importantes aplicaciones tecnológicas, industriales y nutricionales.

Existen numerosas líneas de investigación con respecto a este tema, una de las más destacadas es la hidrólisis enzimática de las proteínas presentes en estos subproductos y su posterior fraccionamiento mediante membranas con el objetivo de obtener péptidos bioactivos.

Este trabajo se centra en el estudio de la seroalbúmina bovina (BSA) que tras ser hidrolizada con pepsina e identificados sus péptidos, se separaron mediante membranas variando el valor de pH.

2. ABSTRACT.

In the last years, there has been a growing interest for the use of byproducts in food industry, specially in lacteal and meat industry, which byproducts, lactoserum and blood, have proved having important technological, industrials and nutritional applications.

There are several lines of research about it, one of the most important is the separation with membranes of the possible bioactive peptides.

This paper is focused in the BSA study (bovine serum albumine), that after being hydrolyzed with pepsin and identified the peptides, they were separated by membranes.

3. LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Secuencia aminoacídica y estructura secundaria de la BSA.....	25
Figura 2. Representación de los dominios y estructuras secundarias de la BSA, cada dominio representado por un color distinto y cada subdominio por un tono distinto...	26
Figura 3. Estructuras de la BSA en función del pH.....	28
Figura 4. Activación del pepsinógeno gástrico como ejemplo de retroalimentación positiva (feedback).....	31
Figura 5. Mecanismo del paso por membrana.....	34
Figura 6. Procesos con membranas cuya fuerza impulsora es la diferencia de presión..	36
Figura 7. Perfil de concentración debido a la polarización, sin formación de capa gel..	37
Figura 8. Perfil de concentración debido a la polarización debido a la polarización, con formación de capa gel.....	37
Figura 9. Causas de ensuciamiento de las membranas.....	38
Figura 10. Disminución de la densidad de flujo de permeado debido al ensuciamiento y a la polarización por concentración.....	39
Figura 11. Phmetro Crison Ph-Burette 24.....	48
Figura 12. Cromatógrafo Agilent 1200.....	50
Figura 13. Cromatógrafo HPLC semipreparativo.....	51
Figura 14. Sistema de membranas.....	52
Figura 15. Regulador de pH conectado al biorreactor.....	54
Figura 16: Cromatograma BSA nativa.....	57
Figura 17: Cromatograma BSA hidrolizada con pepsina tras 180 minutos.....	58
Figura 18: Porcentaje de hidrólisis obtenido a lo largo del tiempo para un ratio de E/S del 4%.....	59

Figura 19: Cromatograma(HPLC semipreparativo) del hidrolizado de BSA.....	60
Figura 20: Péptidos teóricos de la hidrólisis de BSA con pepsina.....	62
Figura 21: Cromatograma del permeado de la membrana de 1 kDa a pH 2.....	74
Figura 22: Cromatograma del permeado de la membrana de 1kDa a pH 10.....	75
Figura 23: Cromatograma del concentrado de la membrana de 1kDa a pH 2.....	75
Figura 24: Cromatograma del concentrado de la membrana de 1kDa a pH 10.....	75
Figura 25: Cromatograma del permeado de la membrana de 5 kDa a pH 2.....	76
Figura 26: Cromatograma del permeado de la membrana de 5 kDa a pH 10.....	76
Figura 27: Cromatograma del concentrado de la membrana de 5kDa a pH 2.....	77
Figura 28: Cromatograma del concentrado de la membrana de 1kDa a pH 10.....	77
Figura 29: Transmisión de los péptidos en función de su PM en la membrana de 1kDa.....	78
Figura 30: Transmisión de los péptidos en función de su PM en la membrana de 5kDa.....	79
Figura 31: Transmisión peptídica en función del punto isoeléctrico en la membrana de 1kDa.....	80
Figura 32: Transmisión peptídica en función del punto isoeléctrico en la membrana de 5kDa.....	81

4. LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Composición nutricional de suero dulce y suero ácido.....	18
Tabla 2. Composición proteica del lactosuero.....	19
Tabla 3. Composición aminoacídica de las proteínas del lactosuero.....	19
Tabla 4. Funciones de los péptidos del lactosuero.....	22
Tabla 5. Tipos de proteasas y características.....	30
Tabla 6. Clasificación de los procesos con membranas en función de la fuerza impulsora responsable de la separación.....	35
Tabla 7. Método empleado en HPLC.....	51
Tabla 8. Método empleado en HPLC semipreparativo.....	52
Tabla 9: Total de péptidos identificados en el hidrolizado y en el concentrado de BSA ordenados de menor a mayor PM.....	65
Tabla 10. Péptidos capaces de permear ordenados de menor a mayor PM.....	71

5. Introducción

Las proteínas presentes en el suero y en la sangre se caracterizan por ser muy utilizadas en la industria alimentaria. Cada una de estas proteínas posee unas características biológicas, nutricionales y funcionales determinadas que hacen que adquieran importancia a la hora de comercializarlas. Además, pueden poseer actividad opiácea, inmunomodulante, antimicrobiana, antitrombótica, quelante de minerales y antihipertensiva que hace que su valor se incremente.

Al gran valor biológico y nutricional que se les atribuye a estas proteínas, se ha unido en los últimos años un mayor conocimiento sobre su funcionalidad tanto en su forma nativa, como a través de los denominados péptidos bioactivos. Este último término hace referencia a segmentos proteicos específicos, inactivos dentro de la secuencia de la proteína inactiva y que pueden ser liberados por medio de la hidrólisis enzimática o fermentación microbiana y que tienen un impacto positivo en las funciones corporales, pudiendo también tener beneficios sobre la salud.

Por otro lado, también se debe tener en cuenta que debido a la composición que estos excedentes poseen, presentan una gran cantidad de materia orgánica y por tanto una elevada demanda biológica de oxígeno pudiendo causar graves problemas medioambientales. El problema ambiental más importante de la industria láctea y cárnica lo representa la generación de aguas residuales, tanto por su volumen como por la carga contaminante que contienen. Como solución a estos problemas y por su alto valor biológico, nutritivo y funcional en los últimos años cobra especial importancia las posibilidades de aprovechamiento que éste posee tratando de recuperar el subproducto como materia prima para generar productos de valor añadido (Loaiza, 2011).

Debido a todo lo descrito anteriormente, los objetivos principales de este trabajo Fin de Máster son principalmente dos:

- Aprovechar/encontrar utilidad a los excedentes procedentes de la industria alimentaria, y por consiguiente reducir de la contaminación ambiental y el gasto económico que supone manejar los residuos.
- Obtener productos funcionales a partir de éstos excedentes.

En el presente trabajo se ha desarrollado un proceso para la obtención de péptidos bioactivos a partir de la hidrólisis de la seroalbúmina bovina mediante la enzima pepsina.

El objetivo de la primera etapa de este trabajo fue determinar las condiciones a las cuáles tendría que ocurrir la hidrólisis para alcanzar un mayor grado de hidrólisis.

En la siguiente etapa, de lo que se trató fue de filtrar el hidrolizado a través de las membranas, para tratar de fraccionar dicho hidrolizado en una corriente enriquecida en los péptidos, usando diferentes valores de pH para observar las diferencias los distintos resultados obtenidos.

Por último, se llevó a cabo un análisis con la finalidad de determinar los péptidos obtenidos.

6. Consideraciones teóricas

6.1. Proteínas alimentarias.

Las proteínas son macromoléculas que están constituidas por uno o más polipéptidos. Cada uno de estos polipéptidos se basan en una cadena de aminoácidos que están unidos mediante enlaces peptídicos.

Las proteínas, una vez que están sintetizadas se pliegan de tal forma que adquieren una estructura tridimensional determinada. La conformación adquirida depende de la secuencia de aminoácidos por la que está formada y va a estar estabilizada por numerosas interacciones débiles.

Uno de los procesos más conocidos que pueden sufrir las proteínas es el fenómeno de desnaturalización, que consiste en la pérdida de su estructura tridimensional y por tanto de su actividad. Esta desnaturalización, es provocada por los agentes desnaturalizantes los cuáles pueden ser de dos tipos:

- **Físicos:** fuerzas mecánicas y calor
- **Químicos:** detergentes, disolventes orgánicos, pH, fuerza iónica.

La desnaturalización puede provocar diversos efectos en la disolución proteínica como es:

- Aumento de la viscosidad y disminución del coeficiente de difusión.
- Disminución de la solubilidad
- Pérdida de su actividad.

6.2. Fuentes de proteínas alimentarias.

Existen numerosas fuentes de proteínas alimentarias. Este trabajo se centró principalmente en dos importantes subproductos de la industria alimentaria como son:

- El lactosuero.
- La sangre.

Las ventajas que posee utilizar este tipo de subproductos de la industria alimentaria son varias, algunas de ellas son que al reutilizar este tipo de efluentes se contribuye a reducir la contaminación medioambiental ya que estos subproductos debido a su

composición poseen una elevada demanda biológica de oxígeno (DBO). Por otro lado, estos subproductos poseen generalmente un valor bajo que se verá incrementado mediante la obtención de péptidos bioactivos.

6.2.1 El lactosuero.

Aproximadamente el 90% del total de la leche utilizada en la industria quesera es eliminada como lactosuero. En los últimos años la producción mundial de queso ha ido aumentando y por consiguiente la del lactosuero. Como ya se había comentado este producto residual genera grandes problemas ambientales (Londoño, 2006), no obstante también puede tener beneficios ya que se trata de un efluente que constituye una importante fuente nutricional incluyendo un perfil completo de minerales, proteínas con un alto valor biológico y representa una gran fuente de carbohidratos.

El suero contiene alrededor del 50% de los nutrientes de la leche original como son proteínas solubles, lactosa, vitaminas y sales minerales.

Este suero de la leche se obtiene durante el proceso de elaboración del queso, cuando a la leche líquida se le añade el cuajo. El cuajo es un fermento natural presente en el estómago de los rumiantes que posee una enzima que provoca la coagulación de las caseínas. El proceso es llevado a cabo en tanques especiales que se encuentran a unos 30°C y de los cuáles se obtiene una masa semisólida rica en caseína y grasa que posteriormente se dejará madurar y secar obteniéndose queso. Al retirar la masa semisólida de las cubas, siempre quedará en ellas un líquido de color amarillo verdoso con sabor ácido, éste líquido es el lactosuero.

Existirán distintos tipos de suero dependiendo del tipo de leche, el queso que se produzca y el método empleado para conseguirlo:

- **Suero dulce:** es el que resulta de la acción proteolítica de enzimas coagulantes sobre las micelas de caseína de la leche. Éstas catalizan la ruptura del enlace peptídico de la k-caseína entre los aminoácidos fenilalanina en la posición 105 y metionina en la posición 106, provocando la precipitación de las caseínas y obteniéndose el queso. Por lo general, es el suero más utilizado por la industria, debido a su composición química más estable y caracterizándose por tener un

pH de 5,9-6,6. Además, éste tipo de suero posee mejores características para el procesamiento y obtención de subproductos de mayor valor. Presenta aproximadamente el 70-75% de la lactosa, un 25% de proteínas y un 8% de materia grasa que contiene la leche, por lo que debido a estas características se ve realizado el interés de su uso para otros fines.

- **Suero ácido:** surge como resultado de la coagulación ácida o láctica de las micelas de caseína en su punto isoeléctrico, lo cual conlleva la desmineralización, desestabilización y precipitación de la caseína, dejando en solución solamente las proteínas séricas. Se caracteriza por presentar un pH de 4,3-4,6.

En la tabla 1, se muestra la composición nutricional del lactosuero dulce y ácido. Aquí, se puede apreciar como los macronutrientes permanecen casi en las mismas proporciones en los dos tipos de suero, sin embargo las principales diferencias se observan al comparar las cantidades de calcio y ácido láctico, estando en mayor proporción en el suero ácido. La mayor cantidad de ácido láctico en el suero ácido se produce por la acidificación de la leche para la precipitación de la caseína y la presencia de flora láctica. El contenido de lactosa en el suero ácido se ve reducido debido a la fermentación láctica.

En el caso del lactosuero dulce, tiene mayores cantidades de lactosa y proteína con respecto al ácido. Además tiene un gran riqueza de minerales como son Ca, P, K, Na, Cl, Mg y vitaminas como pueden ser la vitamina A, Tiamina, Riboflavina, Niacina, Ácido Pantoténico y nicotínico y B6. Estas composiciones pueden variar de un tipo de lactosuero a otro.

Tabla 7. Composición nutricional de suero dulce y suero ácido (Panesar et al., 2007)

Componente	Suero dulce (%)	Suero ácido (%)
Acidez (pH)	5,9-6,6	4,3-4,6
Sólidos totales	6,4-6,8	6,8
Agua	93,2-93,6	93,2-93,5
Materia grasa	0,05-0,37	0,04-0,27
Proteína sérica	0,6-1	0,6-0,8
Nitrógeno no proteico	0,18	0,18
Lactosa	4,6-5,2	4,4-4,6
Cenizas	0,5	0,8
Calcio	0,043	0,12
Fósforo	0,040	0,065
Sodio	0,05	0,05
Potasio	0,16	0,16
Cloro	0,11	0,11
Ácido láctico	0,05	0,4

Centrándonos en su composición en proteínas, se sabe que la fracción proteínica del lactosuero no constituye la más abundante, aunque unida a la lactosa es la que mayores posibilidades económicas e importancia nutricional puede tener.

Las proteínas del lactosuero son definidas como aquellas que se mantienen en solución tras precipitar la caseína en el proceso de elaboración de quesos. Las proteínas del lactosuero, representan alrededor del 20% de las proteínas de la leche de vaca y reciben el nombre de seroproteínas (Baro et al., 2001). Estas proteínas son relevantes debido a su alto valor biológico y la calidad que presentan, siendo la mayoritaria la β -lactoglobulina(β -LG) con entre un 55 y 65% del total, seguida de la α -lactoalbúmina que representa entre un 15 y un 25% del total y la albúmina sérica bovina que está presente en un 5 y 12%. A parte también contiene otras proteínas con acción enzimática como la lactoferrina, lactoperoxidasa y otras como inmunoglobulinas y glicomacropéptidos. Dicha composición está representada en la tabla 2.

Tabla 8.Composición proteica del lactosuero (Zydney, 1998).

Proteínas	Concentración (g/l)
β -lactoglobulina	2,70
α -lactoalbúmina	1,20
BSA	0,65
Inmunoglobulinas	0,40
Lactoferrina	0,1

Es importante tener en cuenta que las proteínas de este subproducto son de alto valor biológico debido a su contenido en leucina, triptófano, lisina y aminoácidos azufrados.

Tabla 9.Composición aminoacídica de las proteínas del lactosuero (Linden & Lorient, 1996).

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

El suero lácteo es el subproducto más importante de la industria láctea y como se comentó anteriormente dada a su elevada carga orgánica es uno de los contaminantes más severos ya que se desechan grandes cantidades de este subproducto. El suero de leche posee una demanda biológica de oxígeno de 40000 a 50000 mg O₂/L, tratándose por tanto de una DBO elevada por lo que se requiere la realización de tratamientos previos a su vertido, implicando un elevado coste en ellos.

Hasta el momento, el mayor aprovechamiento del suero lácteo ha sido a nivel industrial con la fabricación de derivados del suero lácteo, como es el suero en polvo, lactosa en polvo, suero en polvo desmineralizado y suero reducido en lactosa (*RLW-Reduced Lactose Whey*), proteínas concentradas de suero (*WPC- Whey Protein Concentrates*) y los aislados proteicos del suero (*WPI-Whey Protein Isolates*).

Estas proteínas presentan una gran funcionalidad tecnológica y pueden ser utilizadas en diversos sectores alimentarios y de bebidas y como alternativa a otros ingredientes tradicionales.

Algunas de las aplicaciones que pueden tener los derivados del suero lácteo son las que se citan a continuación: (Loaiza, 2011)

- Elaboración de productos lácteos por parte de la misma empresa como puede ser el desarrollo de quesos basados en la coagulación de proteínas lactoséricas y en presencia de calcio (ricota, ricottone y requesón).
- Elaboración de suero en polvo dulce y ácido para la elaboración de batidos proteicos destinados a deportistas con el fin de beneficiar el metabolismo asociado a la hipertrofia muscular.
- Utilización de las proteínas del suero en la alimentación infantil debido a sus características nutricionales.
- Obtención de cristales de lactosa a partir del suero lácteo los cuales pueden ser empleados en la industria farmacéutica para el recubrimiento de medicamentos y a nivel dietético por su menor valor edulcorante.
- Para la producción de piensos para el consumo animal.
- Para su empleo en productos panificados, confitería, productos cárnicos, pescados, pasta y cremas debido a las propiedades emulsificantes, estabilizantes y con capacidad de retención de agua que hacen que el lactosuero será adecuado

6.2.2. La sangre.

Otra importante fuente de proteínas es la sangre. Es por tanto muy interesante la recuperación de las proteínas de la sangre procedente de mataderos, ya que al igual que en el caso del lactosuero a la vez que estamos reduciendo la contaminación también estaremos incrementando el valor de un subproducto de la industria alimentaria.

El plasma está compuesto por proteínas que poseen un elevado valor nutricional (7%), siendo la BSA la que se encuentra en mayor proporción, agua (91%) y diferentes tipos de sales y compuestos de bajo peso molecular (1%). A excepción de la hemoglobina, que se encuentra en la fracción celular, todas las proteínas de la sangre se localizan en el plasma.

6.3. Bioactividad de péptidos.

Además de las posibles funciones industriales que tienen las proteínas del suero lácteo, en los últimos años han tenido una gran importancia los péptidos bioactivos.

En el año 1950 fueron mencionados por primera vez por Mellander (Mellander, 1950).

Los péptidos bioactivos se han definido como fragmentos específicos de proteínas que tienen un impacto positivo en las funciones o condiciones del cuerpo y en última instancia pueden influir en la salud (Kitts & Weiler, 2003).

Este tipo de péptidos suelen presentar un pequeño tamaño (< 1000 Da) y pueden permanecer inactivos en la secuencia de la proteína, pero pueden activarse al ser liberados a través de la proteólisis por enzimas digestivas o por enzimas derivadas de microorganismos o plantas (Hui, 2007; Korhonen, 2006).

Numerosos estudios reconocen que las proteínas de la dieta (especialmente las proteínas de la leche) representan una importante fuente de péptidos biológicamente activos. Estas actividades de estos péptidos bioactivos más estudiadas en los últimos años son: (Clare, 2000; Urista et al., 2011).

- Efectos sobre el sistema cardiovascular.
- Propiedades hipocolesterolémicas.
- Propiedades opioides y anti-opioide.
- Efectos sobre el sistema gastrointestinal.
- Propiedades anticáncer.
- Efectos sobre el sistema inmune.

Tabla 4. Funciones de los péptidos del lactosuero

Proteína	secuencia de aminoácidos	Bioactividad	efectos farmacológicos	Producción	estudios "in vivo"	referencias
BSA	AKFAWAVAR [BSA #208-216]: Albúmina A	Opiode 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
	YGFNA [BSA #399-404]: Serofina	Opiode				Tani et al, 1993; Meisel and Schlimme, 1996
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; Beuchar et al, 1994; Brody et al, 2000; Malkoski et al, 2001
	MAIPPKKNQDK [α-CN #106-116]	Antibiótico a	inhibe agregación plaquetaria		[Mambou et al, 1991]	Jolles et al, 1986
LF	FKCRRWQWRMKKLGAPSICVRRAF [LF #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; Wakabayashi et al, 2003; Samuelson et al, 2004
	APRKNVRWCTISQPEW-FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAFALECIRA [LF #1-16]S-S(17-48)]	Antimicrobiano	Contra <i>Escherichia coli</i>	LF + quimosina		Hoek et al, 1997
	APRKNVRWCTISQPEW-CIRA [LF #1-16]S-S(45-48)]	Antimicrobiano	Contra <i>Micrococcus flavus</i>	LF + pepsina		Recio and Visser, 1999
	APRKNVRWCTI-FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAFALECIR [LF #1-11]S-S(17-47)]	Antimicrobiano	Contra <i>Micrococcus flavus</i>	LF + pepsina		Recio and Visser, 1999
	FKCRRWQWRMKKLGAPSITCV [LF #17-30]	Antimicrobiano	Contra oral pathogenic bacteria	Péptido sintético		Groenink et al, 1999
	PEWSKCYQWQRMRKLGAPSITCVRRTS [LF ^d #14-42]	Antimicrobiano	Contra <i>Micrococcus flavus</i>	LF + pepsina		Recio and Visser, 1999
	SKCYQWQRMRKLGAPSITCVRRTS [LF ^d #17-41]	Antimicrobiano	Contra <i>Escherichia coli</i>	Péptido sintético		Vorland et al, 1999
	DLIWKLLSKAQEKFGENKRS [LF #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

6.4. Seroalbúmina bovina (BSA).

6.4.1. Descripción.

La BSA es una de las proteínas que forma parte del lactosuero y la mayoritaria en la sangre. A continuación se procede a hablar de ella con más detalle ya que se trata de la proteína empleada como sustrato en este trabajo.

La información sobre ésta proteína se ha recopilado en “UniProtKB”, una base de datos en la cual se recoge información funcional y estructural sobre las proteínas, siendo coherente y rica. Se trata de una de las bases de datos más completas y se caracteriza por ser muy poco redundante. Además de la captura de los datos básicos obligatorios para cada entrada (principalmente, la secuencia de aminoácidos, proteínas nombre o descripción, datos taxonómicos y de información de la cita), “UniProtKB” añade más información aún. Esto incluye ontologías ampliamente aceptadas biológicas, clasificaciones y referencias cruzadas e indicaciones claras de la calidad de la anotación en forma de pruebas atribución de los datos experimentales y computacionales.

La albúmina sérica bovina (también conocida como BSA o fracción “V”) es una de las proteínas más ampliamente estudiadas.

La albúmina sérica, es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo con una concentración de 0,65g/L, tiene una buena capacidad de unión para el agua, ácidos grasos, hormonas, bilirrubina y las drogas. Su función principal es la regulación de la presión osmótica coloidal de la sangre. Es también el mayor transportador de zinc en el plasma, por lo general se une alrededor del 80% del total de zinc en plasma.

Otra de sus características, en éste caso negativa, es que puede comportarse como un alérgeno estimulando reacciones de hipersensibilidad en humanos, por esto la ventaja adicional de hidrolizarla, ya que sus péptidos no provocan este tipo de reacciones.

Se trata de una proteína relativamente grande, su peso molecular es de 66.382 Da y está formada por una cadena de 607 aminoácidos, de los cuales entre el 19 y el 22 son un propéptido, por lo que su secuencia real empieza en el aminoácido 23.

La BSA presenta un punto isoeléctrico comprendido entre 4,7 y 4,9 (Almécija, 2007; Zydney, 1998) además de presentar una temperatura de desnaturalización de 64 °C (Ryan, 2011; Hollar, 1995).

6.4.2. Estructura de la BSA.

En un principio eran numerosos estudios los que apoyaban que la seroalbúmina era un elipsoide achatado con dimensiones de 140x40Å.

Más adelante, se realizaron ensayos con la técnica de la resonancia magnética nuclear de protón, estos estudios ayudaron a deducir que la BSA tenía una forma similar a la de un corazón (Bos et al., 1989). Finalmente, esta estructura fue confirmada con la técnica cristalográfica de Rayos-X (Majorek, 2012).

Su estructura tridimensional consta de 3 dominios (I: 19-209, II: 210-402 Y III: 8403-600) que se dividen en 9 bucles (L1-L9) unidos por 17 puentes disulfuro. Los bucles en cada dominio se componen de una secuencia de bucles que forman triplete. Cada dominio a su vez es el subproducto de dos dominios.

6.4.3. Composición aminoacídica.

Las albúminas se caracterizan por presentar un bajo contenido de triptófano y metionina y un alto contenido en cisteína y aminoácidos cargados, como los ácidos glutámico y aspártico, lisina o arginina. El contenido en glicina e isoleucina en la BSA es más bajo que en el resto de proteínas.

6.4.4. Estructura primaria, secundaria y terciaria de la BSA.

La BSA como se dijo anteriormente está compuesta por 3 dominios homólogos (I, II, III), éstos, a su vez están divididos en 9 bucles (L1-L9) que se encuentran unidos mediante puente disulfuro. En cada dominio, existe una secuencia variada de bucles y a su vez cada dominio es el producto de dos subdominios (IA, IB, etc.)

La técnica cristalográfica de rayos X demuestra que la estructura de la albúmina es predominantemente alfa-helicoidal (67%) siendo el polipéptido restante una mezcla de regiones flexibles entre subdominios sin hojas beta.

10 20 30 40 50
 MKWVTFISLL LLFSSAYSRG VFRRDTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLIA
 60 70 80 90 100
 FSQYLQQCPF DEHVKLVNEL TEFAKTCVAD ESHAGCEKSL HTLFGDELCK
 110 120 130 140 150
 VASLRETYGD MADCCEKQEP ERNECFLSHK DDSPDLPLK PDPNTLCDEF
 160 170 180 190 200
 KADEKKFWGK YLYEIARRHP YFYAPPELLYY ANKYNGVFQE CCQAEDKGAC
 210 220 230 240 250
 LLPKIETMRE KVLASSARQR LRCASIQKFG ERAKAWSSVA RLSQKFPKAE
 260 270 280 290 300
 FVEVTKLVD LTKVHKECCH GDLLECADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE
 310 320 330 340 350
 CCDKPLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCK NYQEAKDAFL
 360 370 380 390 400
 GSFLYEYSRR HPEYAVSVLL RLAKEYEATL EECCAADDPH ACYSTVFDKL
 410 420 430 440 450
 KHLVDEPQNL IKQNCQDFEK LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS
 460 470 480 490 500
 RSLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL NRLCVLHEKT PVSEKVTKCC
 510 520 530 540 550
 TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP DTEKQIKKQT
 560 570 580 590 600
 ALVELLKHKP KATEEQLKTV MENFVAFVDK CCAADDKEAC FAVEGPKLVV

 STQTALA

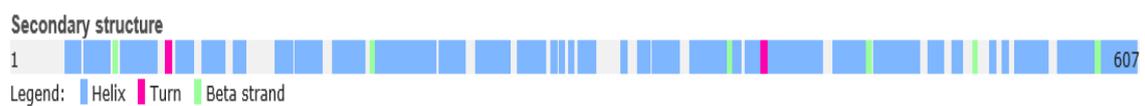


Figura 7. Secuencia aminoacídica y estructura secundaria de la BSA. (UniProtKB)

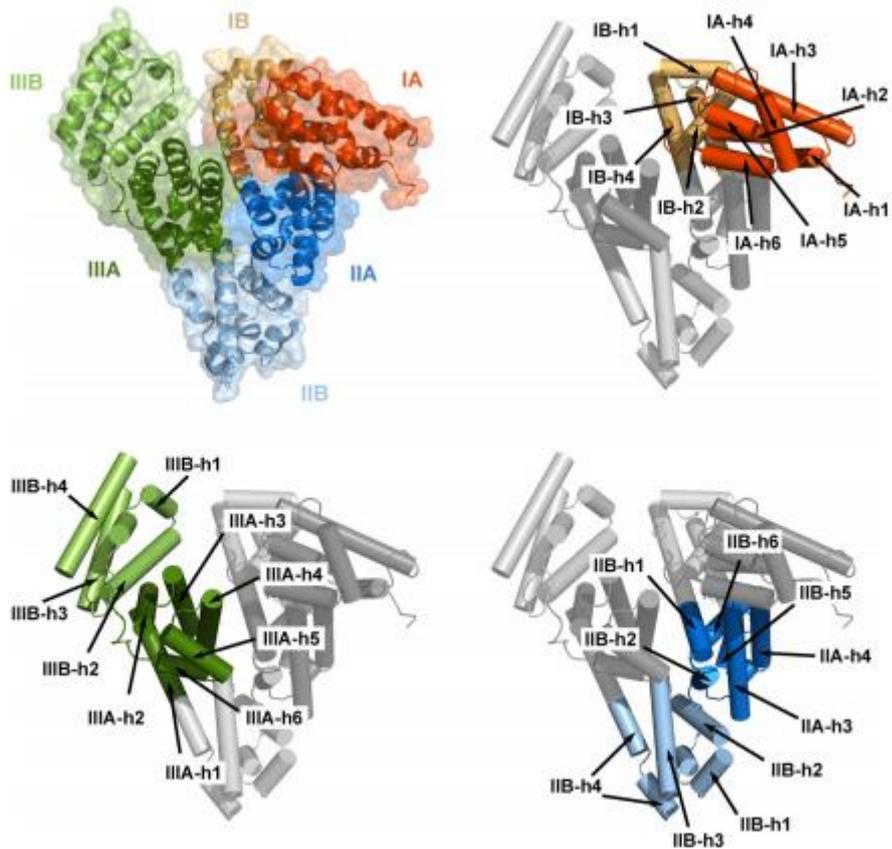


Figura 8. Representación de los dominios y estructuras secundarias de la BSA, cada dominio representado por un color distinto y cada subdominio por un tono distinto (Surgio et al., 1999)

6.4.5. Puentes disulfuro.

Los puentes disulfuro son uniones que mantienen unidos los bucles. En la BSA los puentes disulfuro se encuentran en las posiciones siguientes:

- (1)77-86;(2)99-115;(3)114-125;(4)147-192;(5)191-200;(6)223-269;(7)268-276;
 (8)288-302;(9)301-312;(10)339-384;(11)383-392;(12)415-461;(13)460-471;(14)484-
 500; (15)499-510;(16)537-582;(17)581-590.

Los puentes disulfuro están protegidos de los agentes reductores a pH neutro, ya que ninguno de éstos es accesible a los agentes reductores en el rango de pH 5-7, pero a medida que el pH aumenta o disminuye van haciéndose progresivamente más accesibles.

6.4.6. Funciones de la BSA.

La BSA desempeña múltiples funciones. Una de las funciones más relevantes es la de actuar como ligando es decir, es la principal portadora de ácidos grasos que son insolubles en el plasma sanguíneo, tiene efecto secuestrante de radicales libres de oxígeno y de diversos metabolitos tóxicos (Emerson, 1989).

La albúmina se caracteriza por presentar una alta afinidad por los ácidos grasos, hematina, bilirrubina y una amplia afinidad por compuestos aromáticos cargados negativamente así como algunos metales. En la actualidad esta capacidad de ligando está siendo ampliamente estudiada ya que podría tener gran importancia en la industria farmacéutica ya que puede actuar como secuestrante de tóxicos.

A la BSA también se le ha asociado la capacidad de la inhibición de crecimiento tumoral existiendo pruebas que demuestran su efecto sobre el cáncer de mama humano.

Otra importante propiedad es su capacidad antioxidante, pudiendo tener esta una gran aplicación para la salud.

6.4.7. Cambios conformacionales según el pH.

La BSA se caracteriza por no estar cargada uniformemente dentro de su estructura primaria. La estructura y propiedades de la BSA en solución dependen del pH, la fuerza iónica, la presencia de iones, etc.

Foster (Foster, 1960) ha clasificado la BSA como:

Forma:	E	F	N	B	A
pH transición:	2,7	4,3	8	10	10

La seroalbúmina se ve sometida a isomerizaciones conformacionales reversibles con cambios en el pH. La forma N es la más estable. Ferrer et al. (Ferrer et al., 2001) han demostrado que la BSA (forma N) tiene una estructura globular comprimida con forma de corazón triangular. A pH 4,3 se produce la transición hacia la forma F, esta forma F

se caracteriza por un aumento espectacular de la viscosidad, menos solubilidad y una pérdida significativa en el contenido helicoidal (Foster, 1960).

A valores de pH inferiores a 4 (en un rango de pH de 3,4 a 2,75) la albúmina se ve sometida a otra expansión con pérdida de las hélices intra-dominio, esta forma expandida se conoce como la forma E. A pH 9, la albúmina se ve sometida a cambios de conformación a su forma básica, B, la cual después de 3 o 4 días produce otra isomerización conocida como forma A.

Las distintas formas a las que se puede encontrar la BSA en función del pH son de vital importancia a la hora de llevar a cabo la hidrólisis, ya que unos enlaces quedarán expuestos a la enzima mientras que otros estarán protegidos por la propia forma de la BSA dificultando por lo tanto que estos sean hidrolizados.

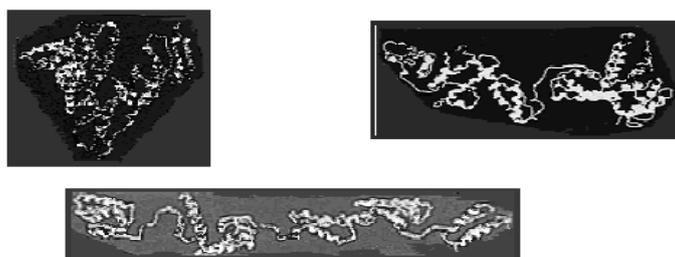


Figura 9. Estructuras de la BSA en función del pH.

6.5. Hidrólisis de la BSA.

El proceso de hidrólisis de una proteína consiste en la ruptura de los enlaces peptídicos (enlace tipo amida: $-\text{COO}-\text{HN}_2-\text{N}$) en presencia de agua.

De la ruptura se obtendrán péptidos de longitud variable, de bajo peso molecular y aminoácidos libres. Para llevar a cabo este proceso de hidrólisis puede hacerse de diversas maneras:

- Hidrólisis química, la cual se hace en presencia de álcalis o ácidos.
- Hidrólisis enzimática, la cual se hace en presencia de enzimas

Este trabajo se ha centrado en la hidrólisis enzimática, ya que se trata de una hidrólisis más fácil de controlar, además la hidrólisis química libera aminoácidos además de otras

sustancias no recomendables. Las enzimas son biocatalizadores de las reacciones químicas que tienen lugar en los seres vivos. Estas enzimas tienen un gran poder catalítico aumentando la velocidad de la reacción, 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 comprendido en 3 fases:

- Formación del complejo enzima-sustrato.
- 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

6.6. Proteasas.

6.6.1. Descripción.

Cuando hablamos de proteasas nos referimos a las enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas. Pueden romper enlaces peptídicos específicos dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la proteína o simplemente romper un péptido completo en aminoácidos.

Estas enzimas están implicadas en numerosos procesos, desde la digestión de las proteínas de los alimentos hasta otros procesos más complejos.

Existen diferentes tipos de proteasas. Actualmente en el mercado se pueden encontrar proteasas de grado alimenticio (tabla 5).

Tabla 10.Tipos de proteasas y características.

Tipo de proteasa	Nombre	Fuente	Temp. (°C)	Intervalo de pH	Sitio de acción catalítica	
<i>Serinproteasa</i>	• Animal	Tripsina	30-60	7-9	-*Lis (o Arg) ---	
		Quimotripsina	45-55	8-9	-*Trp (o Tir, Fe, Leu) --	
		Elastasa		6-8	-	
	• 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	
<i>Cisteinproteasas</i>	• Plantas	Papaína	Papaya	40-75	5-8	-*Fe (o Val, Leu)-
		Bromelaina	Piña	20-65	5-8	AAhf ---
		Ficina	Látex de Ficus		5-8	
<i>Aspartato proteasas</i>	• Animal	Pepsina	Porcino, bovino		1-4	-Fe (o Tir, Leu)*-Trp
		Quimosina	Becerro		4-6	(o Fe, Tir)
	• Fúngica	Aspergilopeptidasa 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
<i>Metaloproteasas</i>	• Animal	Carboxipeptidasa A	Páncreas		7-8	*Carbonilo del AA terminal del péptido, excepto Pro, Arg, Lis
		• Bacteriana	Neutrasa®	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	40-55	6-7,5
		Termolisina	<i>B. thermoproteolyticus</i>		7-9	-Ile, Leu, Val, Fe*---

6.7. Pepsina.

La pepsina se encuentra comúnmente en el estómago de muchos organismos. La principal función digestiva del estómago es convertir los alimentos en quimo solubles, esto, se produce gracias al jugo gástrico que se caracteriza por estar compuesto principalmente por HCl y por consiguiente por poseer un pH inferior a 2 y por la presencia de proteasas de la familia pepsina (existen también otras enzimas para funciones específicas pero en cantidades mucho menores).

El ácido sirve para matar a los microorganismos que llegan al estómago y también para desnaturalizar a las proteínas y hacer que mediante esta desnaturalización las proteínas sean más susceptibles a la hidrólisis por proteasas.

La pepsina activa se genera a partir del proenzima pepsinógeno (masa molecular de aproximadamente 40kDa) por la eliminación de 44 aminoácidos del segmento amino-terminal (segmento precursor).

La digestión ocurre espontáneamente a pH ácido. El segmento precursor es muy básico, mientras que la pepsina es ácida. El centro activo de la pepsina está formado por dos

residuos de aspartamo, uno ácido y otro básico, que están protegidos en el segmento precursor de 44 aminoácidos. Al bajar el pH quedan protonados varios residuos carboxilados y consecuentemente, se rompen los puentes salinos entre el segmento precursor y el resto de la proteína, ocurre un cambio conformacional, los restos catalíticos quedan liberados y se separa el precursor de la pepsina activa.

Existen dos métodos para la generación de la pepsina, uno, cuando se han alcanzado las condiciones favorables haciendo que el pepsinógeno se convierta en pepsina mediante autoactivación y, otro, mediante una autocatálisis, es decir, la misma pepsina activa también al pepsinógeno siendo un ejemplo de retroalimentación positiva, que conduce a la conversión rápida y completa del pepsinógeno en pepsina (Sernka, 1981).

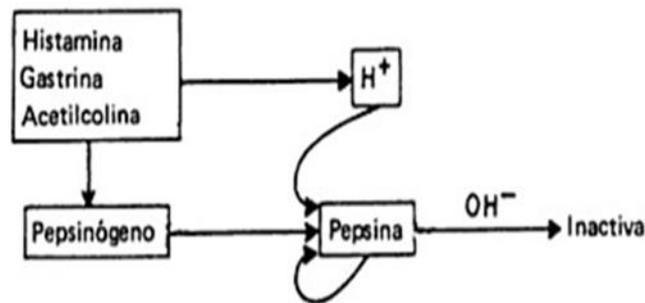


Figura 10. Activación del pepsinógeno gástrico como ejemplo de retroalimentación positiva (feedback) (Sernka, 1981).

6.7.1. Estructura de la pepsina.

La pepsina está constituida por una cadena polipeptídica sencilla que contiene 327 restos aminoácidos con un peso molecular de 34644.

El enzima presenta una preferencia por los aminoácidos hidrofóbicos en cualquiera de los lados del enlace escindible. Una inspección estadística de las roturas de los enlaces en las proteínas demuestra que hay especificidad por la leucina, fenilalanina, triptófano y glutamato en el sitio S1 (residuo N-terminal para el enlace peptídico escindido) y por triptófano, tirosina, isoleucina y fenilalanina en el sitio S'1 (residuo C-terminal para el enlace peptídico escindido).

La pepsina raramente hidroliza ésteres, siendo la excepción los del ácido L-B-fenil-láctico y algunos del ácido sulfuroso y rara vez rompe después de histidina y lisina a menos que estén adyacentes a la leucina, fenilalanina.

Además de los aminoácidos en el S1 y S'1, otros residuos que se aproximan al sitio activo, pueden desempeñar un papel en la especificidad. Factores tales como el pH de la digestión, la cantidad de tiempo de exposición, la concentración de la pepsina en la relación con la proteína que se digiere, la conformación de las proteínas en condiciones ácidas juegan un papel importante en los péptidos que se producen, por tanto es necesario mantener las condiciones de la digestión para que la pepsina pueda actuar. La temperatura y el pH son factores importantes en la actividad de una enzima hasta tal punto que la velocidad de una reacción enzimática se incrementa al aumentar la temperatura en parte porque los sustratos colisionan con los centros activos con mayor frecuencia cuando las moléculas se mueven con rapidez, hasta cierta temperatura que la reacción enzimática cae abruptamente. La temperatura óptima para la pepsina está comprendida entre los 35 y los 40 °C y el pH óptimo es en torno a 2, ya que a éste pH es cuando la pepsina está más activa.

La pepsina se activa rápidamente y comienza la digestión. De esta digestión se producen diferentes tipos de péptidos, muchos de los cuales son de corta longitud y pueden presentarse en superposición con otros péptidos, por tanto hace que sean difíciles de caracterizar e identificar, especialmente cuando digerimos proteínas grandes o complejos de proteínas.

En el caso de la hidrólisis con BSA, debido a su conformación nativa, la forma globular protege a la estructura interna, por tanto si la pepsina no consigue con la hidrólisis de los enlaces externos desnaturalizar lo suficiente la proteína como para desplegar parte de la estructura interna, el enzima no es capaz de seguir actuando sobre ella y por tanto no se produciría una hidrólisis completa

6.7.2 Mecanismo de reacción de la pepsina.

En la pepsina hay dos residuos catalíticamente activos, el Asp-32 y el Asp -215. Sus ionizaciones se observan en el perfil de actividad frente al pH que se presenta un óptimo de pH 2-3 y que depende de la forma ácida de un grupo de pka cercano a 4,5 y de la

forma básica de un grupo de pka de alrededor 1,1. Los valores de pka han sido asignados según las reacciones de inhibidores irreversibles diseñados para reaccionar específicamente con grupos carboxilo ionizados o no ionizados. Compuestos diazo, tales como N-diazoacetil-L-fenil-alanina metil éster, que reacciona con carboxilos no ionizados, reacciona específicamente con el Asp-215 hasta un PH de 5. Los epóxidos que reaccionan específicamente con carboxilos ionizados, modifican el Asp-32.

La dependencia de la velocidad de modificación con respecto al pH demuestra que su pka es inferior a 3. En la estructura cristalina a alta resolución se ve que los grupos carboxilo de los restos de aspartato están unidos entre sí por puentes de hidrógeno. Esto es semejante a la ionización del ácido maleico que tiene valores de pka de 1,9 y 6,2.

Cualquier mecanismo que se proponga para la pepsina ha de tener en cuenta la observación de que se forma tanto un aminoenzima como un acilenzima durante la reacción. La existencia del aminoenzima se obtuvo a partir de experimentos en los que se encontró que la pepsina catalizaba tanto la transpeptidación como la hidrólisis (Fersht, 1980).

6.8. Métodos para la separación y fraccionamiento de péptidos.

Tras el hidrolizado de la proteína son varios los métodos que se pueden emplear para poder separar los péptidos y posteriormente identificarlos. Este trabajo se ha centrado en los que se mencionan a continuación:

6.8.1. Técnicas con membranas.

Una vez obtenido el hidrolizado proteico, estos deben ser fraccionados para la separación de los péptidos bioactivos de la proteína no digerida o de los no activos.

En los últimos años una de las técnicas que ha cobrado gran importancia es el tratamiento con membranas debido a las numerosas ventajas que estas poseen y a la posibilidad de la implantación a nivel industrial. Entre las ventajas que estas poseen podemos citar:

- Los procesos con membranas son más rápidos y más económicos que las técnicas de separación más convencionales.

- Son procesos que pueden ser llevados a cabo a temperatura ambiente, por lo que permite el tratamiento de disoluciones sensibles a la temperatura ambiente sin que sus constituyentes se dañen o sufran alteraciones químicas.
- Existen distintos tipos de membranas (natural o sintética, homogénea o heterogénea, simétrica o asimétrica, neutra, con cargas positivas o negativas etc.) con lo cual pueden adaptarse a cada tipo de producto
- Pueden ser empleadas a nivel industrial.

Una membrana es una región que actúa como una barrera permitiendo el paso exclusivo y/o de forma controlada de una o más especies a través de ella.

Su espesor puede variar entre menos de 100nm y más de 1cm y su resistencia puede variar entre varios megaohmios y menos de un ohmio. El transporte a través de ella puede estar producido por convección o por difusión de moléculas individuales, inducido por un campo eléctrico o por un gradiente de concentración, presión o temperatura.



Figura 11. Mecanismo del paso por membrana.

Los procesos de separación de membranas se producen como resultado de las diferencias de las velocidades de transporte de las especies químicas a través de la membrana, por tanto, se trata de procesos controlados por la velocidad. La velocidad de transporte depende de la fuerza o fuerzas impulsoras que actúan sobre los componentes individuales y de su movilidad y concentración dentro de la membrana. La movilidad viene determinada principalmente por el tamaño molecular del soluto y la estructura física del material de la membrana, mientras que la concentración del soluto en la membrana depende de la compatibilidad entre el soluto y el material de la membrana.

Tabla 11. Clasificación de los procesos con membranas en función de la fuerza impulsora responsable de la separación.

PRESIÓN	PRESIÓN PARCIAL
Microfiltración(MF) Ultrafiltración (UF) Nanofiltración(NF) Ósmosis inversa (OI)	Separación de gases(SG) Pervaporación (P) Permeación de vapores(PV)
CONCENTRACIÓN	POTENCIAL ELÉCTRICO
Diálisis(D) Diálisis Donnan(DD) Contactores con membranas (CM)	Electrodiálisis (ED) Electrodiálisis con membranas(EM)

En este trabajo la fuerza impulsora que se empleó fue una diferencia de presión. Estos procesos generalmente se clasifican en 4 grupos 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 se hace mayor y la presión aplicada (fuerza impulsora) debe aumentarse apropiadamente.

- Microfiltración (0,05-10 μ m) Es el proceso con membranas que más se parece a la filtración convencional.
- Ultrafiltración (0,1-0,001 μ m) Permite la separación de moléculas relativamente grandes, las moléculas pequeñas, tales como sales y compuestos orgánicos de bajo peso molecular, permean libremente a través de la membrana.
- Nanofiltración (0,005-0,0005 μ m) Permite retener moléculas orgánicas de bajo peso molecular.
- Ósmosis inversa (<0,0005 μ m) Retiene moléculas de bajo peso molecular.

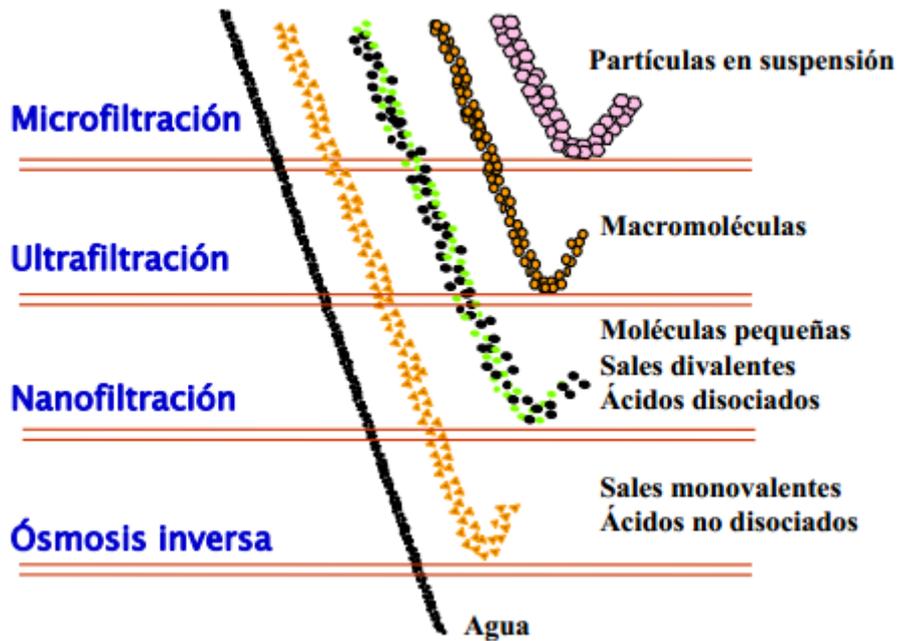


Figura 12. Procesos con membranas cuya fuerza impulsora es la diferencia de presión.

Sin embargo, las membranas también presentan una serie de inconvenientes como son:

- Polarización de concentración.
- Ensuciamiento de la membrana.
- Ningún proceso puede conseguir la eliminación completa del agua.
- Baja vida media de las membranas.
- Baja selectividad.

De estos inconvenientes, los principales son la polarización de concentración y el ensuciamiento de la membrana, ya que darán lugar a la disminución del flujo de permeado. A continuación se procederá a hablar de ellos con mayor detalle:

La polarización de concentración se trata de un fenómeno que 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.

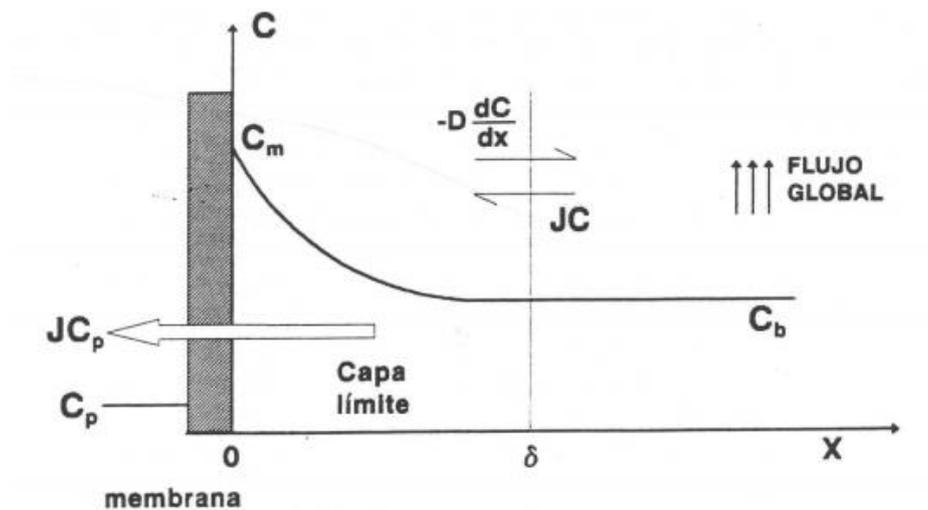


Figura 7. Perfil de concentración debido a la polarización, sin formación de capa gel.

La concentración de soluto sobre la superficie de la membrana puede aumentar hasta alcanzar un valor límite, este valor dependerá de la naturaleza de soluto, correspondiente a la concentración en la que el soluto pasa a la forma de gel, quedando las moléculas parcialmente inmovilizadas. Esta capa de gel dificulta aún más la transferencia de materia a través de la membrana. Alcanzada la concentración de gel, un incremento posterior de la presión sólo aumentará el espesor de la capa.

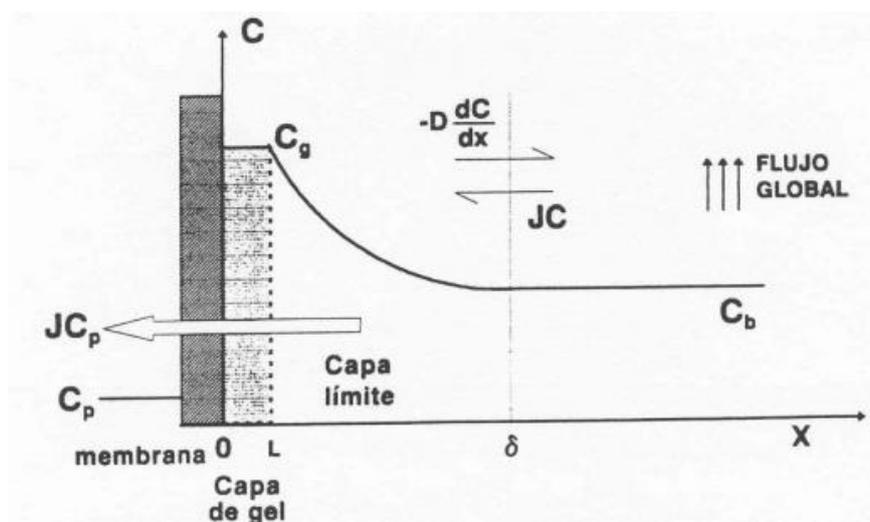


Figura 8. Perfil de concentración debido a la polarización debido a la polarización, con formación de capa gel.

La polarización por concentración no puede evitarse, aunque sí que pueden reducirse sus efectos al mínimo. Para combatirla se utiliza el sistema de filtración tangencial en el cual el fluido va circulando de forma paralela a la interfase, atravesada por el permeado en dirección perpendicular así se consigue evitar los posibles depósitos, mientras que los ya existentes son arrastrados y la capa gel se reduciría.

Otro importante inconveniente del tratamiento con membranas sería el ensuciamiento, éste se trata de un 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 los fenómenos son de naturaleza físico-química y son debidos a una o varias de las siguientes causas:

- Bloqueo total o parcial de los poros.
- Adsorción de solutos sobre la superficie de la membrana
- Interacciones entre el soluto y la membrana
- Precipitación y depósito de las partículas sobre la superficie de la membrana.

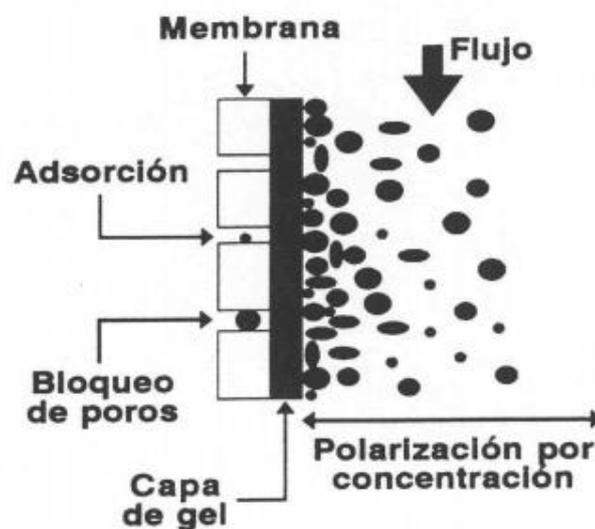


Figura 9.Causas de ensuciamiento de las membranas

Al contrario que la polarización por concentración, el ensuciamiento de la membrana suele ser un fenómeno irreversible que debe evitarse, ya que ocasiona una disminución

de la densidad de flujo de permeado y un deterioro de las membranas, que pueden hacer económicamente inviable el proceso.

Por regla general, la capa de polarización es la que se elimina mediante lavado con agua, mientras que lo que queda corresponde al ensuciamiento.

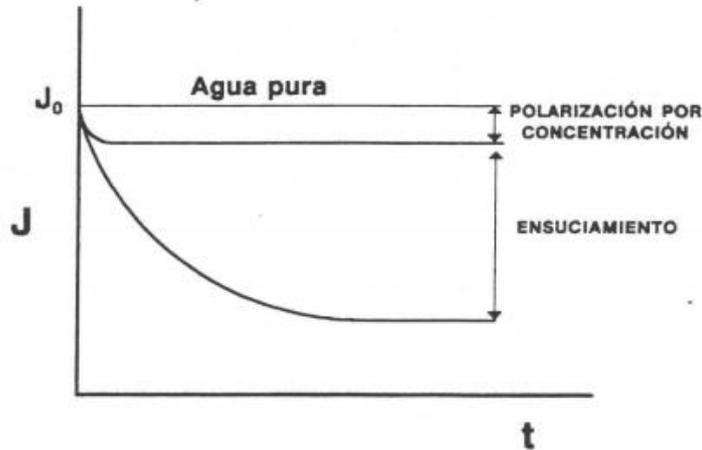


Figura 10. Disminución de la densidad de flujo de permeado debido al ensuciamiento y a la polarización por concentración.

La única forma de eliminar el ensuciamiento es mediante la limpieza de la membrana. La limpieza es un proceso donde tiene lugar la eliminación de sustancias que no forman parte de la membrana. El objetivo es recuperar la densidad del flujo inicial, J_0 , o llegar al 95% del mismo. La limpieza puede ser física, en la cual se destaca el retrolavado, esto consiste en enviar permeado o aire a presión durante corto tiempo, a una presión determinada y en sentido contrario al flujo normal, química que se basa en lavar la membrana con agentes de limpieza química, como ácidos, bases, tensioactivos, detergentes, etc, o biológica pueden utilizar enzimas como agentes de limpieza.

También se debe tener en cuenta que existen diferentes factores que pueden afectar a la obtención de péptidos con la técnica de membranas como son el tamaño y la carga del péptido (Ferry, 1935).

Otro de los factores a tener en cuenta es la influencia del pH en las membranas (Tsuru y col., 1994). El pH tiene un efecto crucial en la transferencia de péptidos a través de la membrana ya que en función de su punto isoeléctrico los aminoácidos se pueden

clasificar en ácidos, neutros o básicos, es por esto por lo que la carga neta de los péptidos dependerá en gran medida del pH del medio (Fievet et al., 2000).

Por último otro de los factores que debe ser considerado es la fuerza iónica ya que afectará al proceso. Un aumento de esta producirá una disminución del potencial de membrana y por tanto una menor movilidad electroforética (Nau et al., 1995). La fuerza iónica también puede afectar al tamaño de partícula.

6.9. Cromatografía líquida de reparto en fase reversa.

La cromatografía líquida de alta resolución (High performance liquid chromatography) es una técnica de separación muy empleada en proteínas, drogas, carbohidratos, ácidos nucleicos etc.

Se trata de una técnica de elevada sensibilidad, que es ideal para la separación de especies no volátiles.

En esta técnica, un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido (fase estacionaria). Al introducir la muestra en la corriente de la fase móvil, sus componentes empiezan a distribuirse entre las dos fases (estacionaria y móvil). El aporte continuado de fase móvil, que contiene una porción de la muestra, hace que ésta avance por la columna, donde sigue teniendo lugar un reparto del analito entre la fase móvil y las porciones frescas de la fase estacionaria a las que va accediendo, por tanto los analitos avanzan mediante una serie de transferencias continuas entre fases. Una vez terminado el análisis, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá a distinto tiempo por lo que se producirá una separación de éstas. 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).

Los componentes básicos de un cromatógrafo son: dispositivo de suministro y mezclador de fases, inyector de muestra, columna y detector.

Esta técnica se puede clasificar en dos importantes grupos atendiendo a la polaridad de la fase estacionaria:

- Cromatografía en fase normal: En este caso la fase estacionaria está constituida por un líquido de carácter polar. Como fase móvil se emplean mezclas de disolventes apolares con disolventes polares. Se suele emplear para la separación de compuestos muy polares.
- Cromatografía en fase reversa: la fase estacionaria está constituida por un líquido de carácter apolar. Como fase móvil se empleará mezclas de agua con disolventes polares miscibles, como metanol o acetonitrilo, siendo la fase móvil más polar que la fase estacionaria. La fase estacionaria más frecuente está formada por sílice a la que se unen grupos de carácter no polar, de los cuales los grupos orgánicos serán los más utilizados, $-\text{CH}_3$ - C_8H_{17} y $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$, de ellos la cadena de 18 carbonos es la más empleada, siendo utilizada en el presente trabajo. Este tipo de cromatografía se suele emplear para la separación de mezclas de compuestos de baja polaridad. La separación ocurre como consecuencia de las diferencias en la superficie apolar de los compuestos de la muestra. Los compuestos menos polares serán más solubles en la fase estacionaria que los polares. Por tanto, al contrario que en fase normal, los compuestos más polares estarán menos retenidos que los polares. Los tiempos de retención disminuyen cuando menor sea la proporción de agua en el disolvente. El tiempo de elución dependerá también de la hidrofobicidad (más hidrofobicidad cuanto mayor sea el tiempo de retención), así como también dependerá del pH que podrá afectar tanto a la muestra como a la degradación de la columna (Rubinson & Rubinson, 2000). En algunos casos se adiciona TFA (ácido trifluoroacético) para mejorar la resolución de los picos.

Esta técnica posee una serie de ventajas con respecto a la cromatografía clásica:

- Elevada resolución, obteniéndose picos más estrechos.
- Mayor velocidad de análisis.
- Columnas de HPLC pueden ser reutilizadas sin regeneración
- Mayor reproductibilidad debido al mayor control de los parámetros que afectan a la eficiencia de separación
- Fácil automatización.

6.10. Escala semipreparativa.

La cromatografía líquida de alta resolución en escala semipreparativa se basa en los mismos aspectos que el HPLC tradicional. La principal diferencia es que para este tipo de cromatografía se requiere una mayor cantidad de muestra y de fases móviles, ya que en este caso no se pretende únicamente la separación de los componentes de la muestra sino también la obtención de las fracciones de esa separación.

En nuestro caso, en el HPLC analítico las muestras serán eliminadas por el colector de residuos mientras que el semipreparativo pasa al colector de fracciones. Cada una de estas fracciones será uno de los picos obtenidos durante la separación de la muestra en la columna.

Por tanto la principal ventaja de la escala semipreparativa es que el analito puede ser recolectado en mayor cantidad y como principal desventaja tendrá el gasto de disolventes en cada análisis.

6.11. Medida de grado de hidrólisis (DH): métodos.

El grado de hidrólisis un parámetro clave para el seguimiento y control de las reacciones de hidrólisis de proteínas. Representa la proporción de enlaces peptídicos hidrolizados sobre el número total de enlaces. Se calcula de acuerdo con la ecuación [1], donde h es el número total de enlaces peptídicos hidrolizados y h_{tot} es el número de enlaces peptídicos presentes en la proteína nativa. Ambos h y h_{tot} son expresados en meq/g. (Nissen, 1986).

$$DH = (h/h_{tot}) \cdot 100\% \quad [1]$$

Existen distintos tipos de métodos para medir el grado de hidrólisis. Los diferentes métodos se basan: (Benítez et al., 2008).

- En la determinación de grupos amino libres.
- En la determinación de nitrógeno soluble tras precipitar la proteína con ácido tricloroacético.
- En la valoración del protón liberado tras la ruptura de un enlace peptídico a determinados valores de pH.

6.11.1. Determinación de los grupos α -amino libres:

La cantidad de grupos α -amino liberados puede ser medida usando reactivos que reaccionen específicamente con grupos amino, produciendo derivados que pueden ser detectados espectrofotométricamente. Para ello puede utilizarse la valoración con formol (A.O.A.C., 2001) aunque debido al gran número de interferencias que presenta éste método se desaconseja en el caso de hidrolizados de proteína, por tanto no sería válido en el caso de este trabajo.

Otro método basado en la determinación de grupos α -amino libres es el TNBS (Nissen, 1979) este se basa en la reacción de grupos amino primarios con el ácido trinitrobenzenosulfónico. Después de la incubación de las muestras con tiempos entre 15 y 60 minutos y a temperaturas entre 30 y 50°C se mediría la absorbancia a 420nm. En este caso, el método TNBS ha sido utilizado por diferentes autores para el análisis de hidrolizados de proteínas (Camacho et al., 1992).

Este método también se ha descartado para medir el grado de hidrólisis en este Trabajo Fin de Máster debido a los múltiples inconvenientes que posee, de los cuales algunos se citan a continuación:

- Se trata de un método largo y tedioso.
- Inestabilidad del reactivo.
- Riesgo de explosión.
- Alto valor de los blancos.
- La contaminación del reactivo con ácido pícrico.
- Interferencia de azúcares reductores y amonio.
- La no reactividad de la prolina e hidroxiprolina.
- Alteración de los resultados por la reacción de los grupos α -amino de lisina con el reactivo.

Otros autores sin embargo prefieren el método OPA (Church et al., 1983; Nielsen et al., 2001) tanto por su rapidez como por su seguridad. Sin embargo este método tiene el inconveniente de no reaccionar con prolina y solo parcialmente con cisteína (Panasiuk et al., 1998) por lo que fue descartado también para este trabajo ya que sino obtendríamos resultados infravalorados ya que la BSA es rica en estos aminoácidos.

6.11.2. Determinación de los protones liberados mediante potenciometría.

Algunos autores monitorean el DH adicionando una base (o un ácido, dependiendo del pH inicial de la hidrólisis) para mantener el pH de la hidrólisis constante. La cantidad de base /ácido es proporcional al DH. Sin embargo, este consumo no está relacionado de una forma simple con el grado de hidrólisis alcanzado, siendo necesario el conocimiento del pK medio de los grupos α -amino liberados en la hidrólisis (Nissen, 1986; Camacho et al., 2001).

Finalmente, este método (pH stat para medios ácidos) es el que ha sido elegido para determinar el grado de hidrólisis en este trabajo debido a que es el método más rápido, sencillo y tras una serie de pruebas experimentales realizadas el que mejores resultados ofrece.

6.12. Espectrometría de masas (LC-ESI-MS/MS).

El equipo primero separa los analitos como un HPLC, y según van eluyendo, los seca con un atomizador (ESI) que dispersa el analito en gotitas. Debido a esto el analito se carga con uno o varios protones. Luego esos analitos son sometidos a un campo eléctrico que los separa en función de su masa-carga, y los resultados que da son en el eje de ordenadas la intensidad de la señal y en el eje de abscisas la relación M/Z (masa/carga). Después a partir de estas masas se buscan los péptidos a los que corresponden.

El analizador de cuadrupolo (Q) también conocido como filtro de masa, está formado por cuatro barras metálicas posicionadas de forma precisa en cada una de las esquinas de un cuadro imaginario. Entre estas barras diagonalmente opuestas se aplica un voltaje de corriente continua (CC) con una radio frecuencia (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.

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

6.13. Herramientas virtuales de proteómica.

Se han utilizado dos herramientas virtuales de proteómica para llevar a cabo la identificación de los péptidos las cuáles se describen a continuación:

- “Protein Prospector” se trata de un programa de la Universidad de California, San Francisco, con el cuál se pueden gestionar datos de espectrometría de masas. Dentro de este programa se utilizará “MS-Digest”.
“MS-Digest” se trata de un software en el cual se introduce la proteína que va a ser hidrolizada, la peptidasa utilizada, la mínima longitud que queremos que tengan los péptidos y la masa entre la que deben de estar comprendidos éstos. A partir de aquí, este software realizará una digestión virtual. Con este programa se conseguirá obtener una vista de todos los péptidos que se obtienen de esa digestión teórica con su masa correspondiente y todas las modificaciones posibles.
- “Findpept” para completar el anterior análisis se utilizará esta herramienta. En este software se introducirá la proteína utilizada (BSA) con las masas obtenidas con el espectrómetro de masas, indicaremos la proteína utilizada y realizará una digestión enzimática mostrándonos todos los péptidos obtenidos durante esa hidrólisis, pero no sólo los teóricos debido al corte específico de nuestra enzima, sino también los posibles debidos a cortes inespecíficos y cortes de contaminantes comunes, además de la propia autólisis de la proteína.

7. Material y métodos

7.1. Hidrólisis y determinación analítica de péptidos de la BSA.

7.1.1. Hidrólisis de la BSA.

Para llevar a cabo este trabajo la materia prima empleada fue la seroalbúmina bovina (BSA).

Ésta ha sido suministrada por FEDESA laboratorios, y se obtuvo a partir de plasma bovino ultrafiltrado y purificado por tratamiento térmico y precipitación con disolventes orgánicos. Posteriormente se trató con microfiltración y ultrafiltración y finalmente se liofilizó obteniéndose después de todos estos procesos un producto de color amarillento en forma de escamas con un grado de pureza superior al 90%.

Para la preparación de las disoluciones se empleó agua ultrapura.

A continuación, se realizó una disolución de la materia prima en esta agua ultrapura. Para ello se empleó un reactor en el que se añadió un volumen de 200 ml a la vez que se tenía la posibilidad de controlar pH y la temperatura, hasta alcanzar las condiciones idóneas para la actuación de la pepsina antes de su adición (37°C y pH 2).

Una vez alcanzadas estas condiciones iniciales se añadió la pepsina. Esta pepsina procedente de la mucosa gástrica porcina, fue suministrada por Sigma y tuvo que ser conservada en el congelador para evitar su autólisis.

Para decidir la relación enzima/substrato se buscó documentación previamente publicada, no encontrándose información útil por lo que se procedió a realizar estudios preliminares de la relación más adecuada. Finalmente, se tomó como relación óptima para estos experimentos la de 3g/l de proteína y un ratio E/S del 4%.

Durante el proceso de hidrólisis, se mantuvieron siempre constantes las condiciones óptimas para la actuación de la enzima, para lo cual se empleó una solución de HCL 2M para contrarrestar la alcalinización del medio que iba teniendo lugar con el transcurso del tiempo debido a la actuación de la enzima, este control fue llevado a cabo por un regulador de pH Crison Ph-Burette 24 que requirió una calibración previa a cada análisis (figura 11).



Figura 11. Phmetro Crison Ph-Burette 24

Una vez comenzada la hidrólisis, se tomaron muestras a intervalos de tiempos (cada 5 minutos los primeros 15 minutos, ya que al principio es cuando la enzima actúa con mayor rapidez y después a intervalos de 15 minutos durante 3 horas) al mismo tiempo se iba llevando un registro del consumo de HCL para posteriormente poder conocer el grado de hidrólisis mediante el método pH Stat para medios ácidos, A la vez, este valor también permitió comprobar que la enzima continúa actuando, debido que al hidrolizar la proteína tuvo lugar la alcalinización del medio, por lo que era necesario ir adicionando HCL.

Para el seguimiento y control de la hidrólisis fue necesario evaluar el grado de hidrólisis (DH) que como ya se comentó en el anterior apartado, se define como: [2]

$$DH = \frac{n^{\circ} \text{de enlaces peptídicos hidrolizados}}{n^{\circ} \text{total de enlaces peptídicos}} \times 100 \quad [2]$$

Tras realizar diferentes experimentos con distintos métodos para determinar el grado de hidrólisis, el que mejor se ajustaba para este trabajo ha sido el método pH Stat para medios ácidos (Nissen, 1986; Camacho et al., 1998).

El grado de hidrólisis es calculado a partir del ácido consumido durante el proceso de hidrólisis acorde con la ecuación [3]:

$$DH = \left[\frac{ANa}{(1-\alpha)h_{tot}M_p} \right] \times 100 \quad [3]$$

Donde A es el ácido consumido en ml, Na es la normalidad del ácido, α es el grado de disociación de los grupos α -carboxílico, M_p es la masa de la proteína en gramos, h la hidrólisis en meqv/g de proteína y h_{tot} es el número de enlaces peptídicos en la proteína sustrato (Qi, 2007).

En nuestro caso se utilizarán los siguientes valores:

- α tiene un valor de 0,675. Este valor fue determinado mediante la fórmula [4]: (Figuroa, 2012).

$$\alpha = \frac{10^{pH-pk}}{1+10^{pH-pk}} \quad [4]$$

- Para h_{tot} , previamente algunos autores han calculado su valor, siendo éste de 8'8. Este valor resulta del cálculo de la composición aminoacídica de la proteína (Figuroa, 2012).

A las muestras que iban siendo tomadas se les adicionó 100µl de NaOH 0,1M con la finalidad de alcalinizar el medio, de manera que quede 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.

7.1.2. Determinación de péptidos.

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 cuántos péptidos se producían y si había diferencias entre las distintas hidrólisis.

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



Figura 12. Cromatógrafo Agilent 1200

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

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

Para el análisis se emplearon dos tipos de fases móviles en distinta proporción: agua ultrapura y acetonitrilo (ACN) de grado HPLC (99,9%), ambas fases móviles contenían además 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA). Las funciones del TFA son las siguientes: mantener el pH ácido, ya que a pH ácido los péptidos van a estar protonados y por tanto con el TFA va a formar un par iónico, unirse a grupos silanol libres que estén en la columna, evitando así que el analito quede retenido por algunos de ellos.

Para conocer las diferentes proporciones de fases móviles y los tiempos de análisis se realizaron diferentes ensayos con distintos porcentajes. Finalmente, los parámetros que han resultado ser los más adecuados son los que se indican en la tabla 7.

Tabla 7.Método empleado en HPLC.

TIEMPO	% CANAL B
0	5
1	5
10	15
40	20
50	30
55	40
60	70
65	90

El tiempo total de análisis fue de 90 minutos dejándose un *post-time* entre muestras para que se puedan recuperar las condiciones iniciales de proceso de la columna antes del siguiente análisis.

A continuación, una vez realizado el análisis con el RP-HPLC se llevó a cabo fraccionamiento de los distintos péptidos para su posterior análisis. Para este análisis se empleó el equipo RP-HPLC Semipreparativo modelo ProStar Varian inc. (Palo Alto, California, USA).



Figura 13.Cromatógrafo HPLC semipreparativo modelo ProStar Variant.

Este modelo se caracteriza por estar equipado con dos bombas de un solo canal, una columna de fase reversa Waters Xbridge C18 y un detector visible ultravioleta. El equipo estaba conectado a un colector de fracciones donde se recogieron las distintas muestras para su posterior análisis.

El volumen de muestra inyectado en este caso fue de 2 ml para una buena detección y recolección suficiente.

Con respecto a las fases móviles se emplearon las mismas que para el RP-HPLC analítico: agua ultrapura y acetonitrilo grado HPLC con TFA.

En este caso fue necesario crear un nuevo método específico para la proteína empleada, para esto se emplearon distintas proporciones de fases móviles a lo largo del tiempo.

Tabla 8.Método empleado en HPLC semipreparativo.

TIEMPO	% CANAL B
0	5
1	5
30	20
80	25
90	60

A medida que va transcurriendo el tiempo en el método se irá aumentando la proporción de acetonitrilo con el fin de evitar que queden en la columna restos de proteínas y a su vez conseguir una mayor separación de los picos.

A continuación, una vez que se separaron las fracciones de los péptidos, tuvo lugar la identificación de las masas de estas fracciones. Para conseguirlo se empleó un HPLC Cuadrupole, modelo Agilent Infinity 1290, con una columna Zorbax Eclipse plus C18 (50x2, 1 mm, 1,8µm). Para ello como fase A se empleó 0,1% de ácido fórmico y como fase B acetonitrilo con un 0,1% de ácido fórmico. La velocidad de flujo fue de 0,25 ml/min y una temperatura de la columna de 30°C. El gradiente de inicio (durante 2 minutos) de B fue del 2% y a continuación el gradiente pasó de 2 al 80% durante 23 minutos para posteriormente mantener este 80% de B.

El modelo de masas empleado fue Agilent 6460 triple Quad. Se utilizó un sistema de detección en electrospray en modo positivo, con una temperatura del gas de nebulización de 300°C y un flujo de 5L/min.

7.2. Fraccionamiento del hidrolizado mediante técnicas con membranas.

Para comenzar con el fraccionamiento del hidrolizado mediante membranas se debe de preparar un litro de disolución de BSA con una concentración de 3g/l. Una vez finalizada la hidrólisis, esta será vertida en un reactor de vidrio encamisado (figura 14) al cual externamente se encuentra acoplado el sistema de membranas.



Figura 14. Sistema de membranas.

En este proceso se controlarán los valores de pH y temperatura. En lo que se refiere al pH se emplearán dos pHs distintos (pH2 y pH10) medidos con un pHmetro-conductivímetro (pH Crison 28) para de esta forma comprobar si este parámetro influye en el paso de péptidos a través de la membrana y en lo que se refiere a la temperatura se mantendrá a 37°C mediante un baño termostatzado.

El contenido del biorreactor se bombea a través del sistema de membranas. En el proceso se mantuvieron constantes la temperatura, la presión y el pH correspondientes siendo recirculados al tanque tanto el concentrado como el permeado, pero extrayéndose muestras de ambas corrientes cada 15 min durante 1 hora.

Para controlar que la presión fuese constante en este proceso se hizo mediante la válvula de concentrado.

Para estos experimentos se emplearon dos membranas con la misma superficie (0,1m²) pero con distinto tamaño de poro:

- Membrana con un MWCO de 5kDa. Membrana Pellicon Biomax de Millipore PES.
- Membrana con un MWCO de 1kDa. Sartorius Stedim Biotech PES.

Previamente a estos experimentos, estas membranas fueron caracterizadas con agua destilada en distintas condiciones de temperatura y presión.

Por tanto, el proceso de trabajo fue el siguiente:

Se añadió el hidrolizado al tanque de vidrio encamisado manteniéndose una presión constante (TMP 2bar). Esto se hizo a recirculación completa durante una hora, en este tiempo se fueron tomando muestras del permeado y el concentrado con la disolución de pH 2, repitiendo el procedimiento cada 15 minutos, a su vez se fue midiendo el flujo de permeado obtenido que será expresado como J (L/hm²).

Este mismo procedimiento fue repetido modificándose el valor del pH a 10. Para regular este proceso se utilizó un pHmetro conectado al equipo (CRISON pH28) que se muestra en la figura 15.



Figura 15. Regulador de pH conectado al biorreactor.

Por último, las muestras obtenidas de ambas corrientes, se analizaron con el HPLC analítico. A continuación, estas muestras fueron fraccionadas mediante RP-HPLC Semipreparativo y una vez obtenidas estas fracciones, sus masas fueron identificadas mediante el HPLC Cuadrupole, para ya finalmente ser identificadas.

8. *Resultados y discusión.*

En este apartado se irán comentando y discutiendo todos los resultados obtenidos durante el trabajo de experimentación. Para ello se dividirá en varias partes para facilitar de esta forma la comprensión de todos los estudios y ensayos llevados a cabo.

Primero, se comentará ampliamente y con detalle el estudio que llevaba por objetivo conseguir el máximo rendimiento de la BSA, es decir, la mayor hidrólisis de esta proteína pero con el menor gasto de enzima y durante un tiempo no excesivo. Para ello, se realizaron varios experimentos previos a la misma, para poder fijar las condiciones óptimas para poder realizar posteriormente la segunda parte de los experimentos de fraccionamiento con membranas.

A continuación, se comentará la obtención de fracciones y la posterior identificación de los péptidos, para ello se elaboró una tabla donde se muestran los datos físicos-químicos de los péptidos identificados tras la hidrólisis de la BSA, estos datos aportan la información necesaria para la correcta interpretación de los experimentos.

Para finalizar, se pasará a comentar e interpretar los distintos resultados obtenidos del tratamiento de las membranas.

8.1. Etapa de hidrólisis de la BSA

Como ya se expuso en el apartado “*Material y métodos*”, se recopilieron múltiples artículos de los cuales se recogió información sobre las condiciones óptimas para la actuación de la pepsina.

Los experimentos que se llevaron a cabo, se realizaron en las condiciones de pH y de temperaturas que estos artículos recomendaban, utilizándose por tanto un pH de 2 y una temperatura de 37°C. El ratio E/S con el que se trabajó también fue determinado a través de estos experimentos y fue del 4%.

En estas condiciones de pH y temperatura, se puede observar como la hidrólisis no se ha completado totalmente, pero si consigue aproximarse a sus valores máximos.

La figura 16 representa la BSA nativa, es decir cuando aún no ha comenzado el proceso de hidrólisis. Al final de este cromatograma se puede ver un pico que corresponde a la BSA. El cromatograma indica también la elevada pureza de la proteína utilizada ya que no aparecen otros picos en el mismo.



Figura 16 : Cromatograma BSA nativa.

La figura 17, representa el cromatograma de la hidrólisis de la BSA con pepsina después de 180 minutos. En este caso se puede apreciar como a lo largo del cromatograma, van apareciendo diferentes picos que representan los diversos péptidos que se van obteniendo durante la hidrólisis. Otro dato representativo que muestra el cromatograma se encuentra al final de éste, ya que se puede apreciar como el pico de la BSA ha disminuido considerablemente, por tanto, no se ha obtenido el grado de hidrólisis máxima debido ya que aún aparecerá este pequeño pico representando la parte no hidrolizada de la proteína.

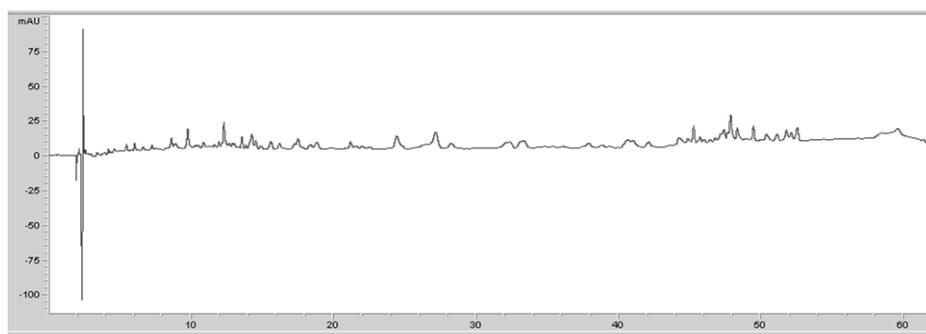


Figura 17: Cromatograma BSA hidrolizada con pepsina tras 180 minutos.

A partir de las fórmulas ya descritas en el apartado de “*Material y métodos*” se obtuvo un grado de hidrólisis del 16,84% mediante el método de pH Stat para medios ácidos, siendo un 22,68% el grado de hidrólisis máximo teórico, por tanto obtendríamos una hidrólisis total de un 74,23%. El porcentaje del área del pico de la BSA que ha desaparecido es del 88,21%.

En la figura 18, se puede observar como el grado de hidrólisis evoluciona a lo largo del tiempo. A los 10 minutos ya se ha hidrolizado un 11,78% de los enlaces atacables por pepsina y a partir de aquí ya va aumentando lentamente hasta el final del experimento. A partir de este momento, prácticamente se mantiene constante hasta el final, pasando de un 15,5% a un 16,84%. Esto se debe a que la pepsina adicionada ya atacó a todos los enlaces potencialmente atacables que tenía accesibles.

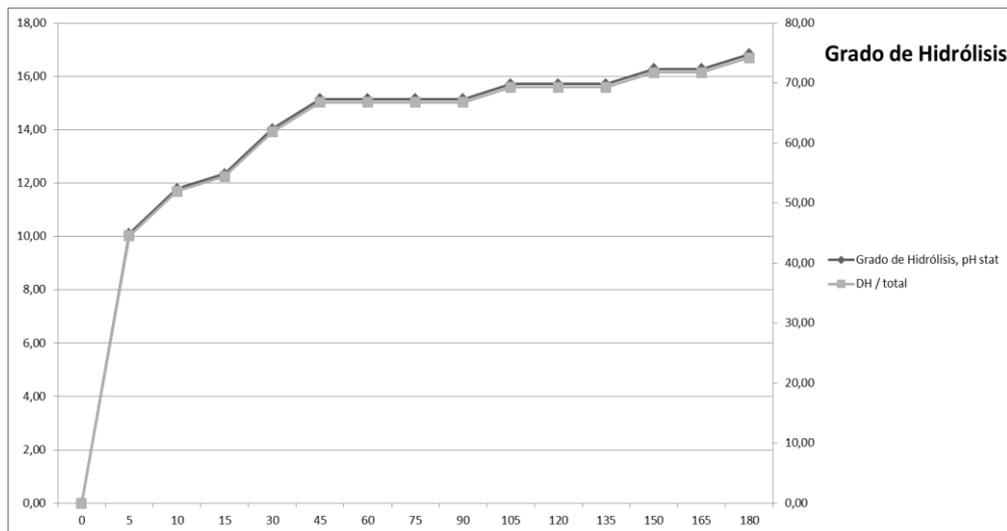


Figura 18: Porcentaje de hidrólisis obtenido a lo largo del tiempo para un ratio de E/S del 4%.

El motivo por el que no se consigue un grado de hidrólisis completo puede ser por varias razones:

- La forma que posee 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 otros péptidos.
- Otra causa posible es debida a la existencia de 17 enlaces disulfuro, ya que se tratan de un tipo de enlaces muy resistentes al efecto de las proteasas.
- Posibilidad de inactivación de la enzima.

8.2 Obtención de fracciones.

Una vez conseguido el hidrolizado, se llevó a cabo la separación de sus fracciones, mediante el método explicado en el apartado de “*Material y métodos*”, para su posterior identificación.

El cromatograma obtenido se muestra en la figura 19, se lograron separar 18 picos correspondientes a posibles péptidos, los cuáles se encuentran numerados sobre la figura.

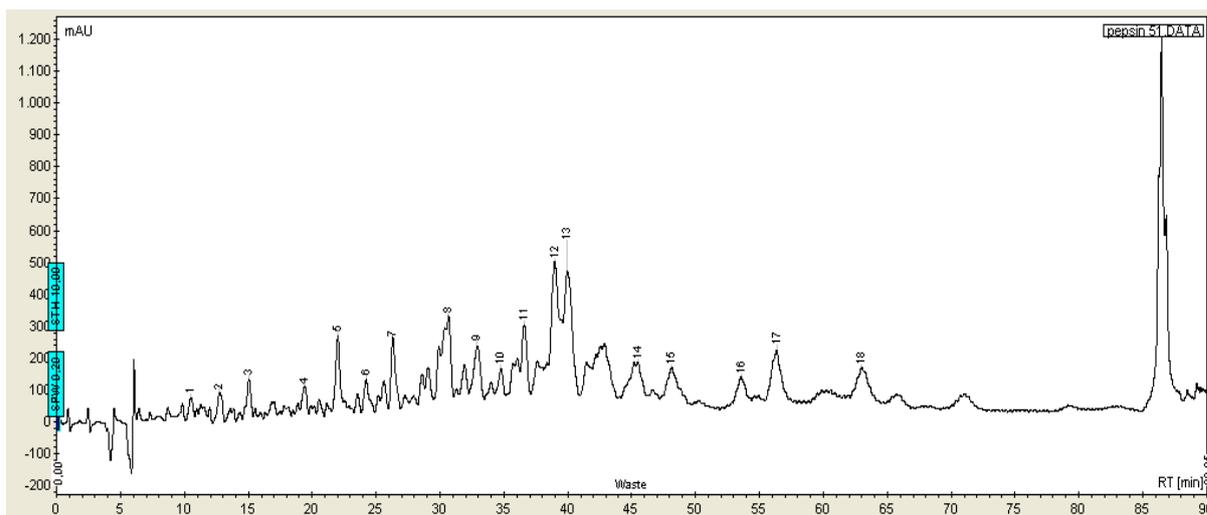


Figura 19: Cromatograma (HPLC semipreparativo) del hidrolizado de BSA.

Los péptidos teóricos esperados de un ataque de la pepsina sobre la BSA se muestran en la figura 20:

Position of cleavage site	Name of cleaving enzyme(s)	Resulting peptide sequence (see explanations)	Peptide length [aa]	Peptide mass [Da]
13	Pepsin (pH>2)	DTHKSEIAHRFD	13	1583.724
18	Pepsin (pH>2)	LGEEH	5	583.599
19	Pepsin (pH>2)	F	1	165.192
21	Pepsin (pH>2)	KG	2	203.241
23	Pepsin (pH>2)	LV	2	230.307
24	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
26	Pepsin (pH>2)	IA	2	202.253
27	Pepsin (pH>2)	F	1	165.192
29	Pepsin (pH>2)	SQ	2	233.224
30	Pepsin (pH>2)	Y	1	181.191
31	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
35	Pepsin (pH>2)	QQCP	4	474.532
42	Pepsin (pH>2)	FDEHVKL	7	887.003
45	Pepsin (pH>2)	VNE	3	360.367
46	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
48	Pepsin (pH>2)	TE	2	248.236
49	Pepsin (pH>2)	F	1	165.192
65	Pepsin (pH>2)	AKTCVADESHAGCEKS	16	1635.784
68	Pepsin (pH>2)	LHT	3	369.421
70	Pepsin (pH>2)	LF	2	278.351
73	Pepsin (pH>2)	GDE	3	319.271
74	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
79	Pepsin (pH>2)	CKVAS	5	506.618
80	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
84	Pepsin (pH>2)	RETY	4	567.599
101	Pepsin (pH>2)	GDMADCCERQEPERNEC	17	1957.107
102	Pepsin (pH>2)	F	1	165.192
103	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
112	Pepsin (pH>2)	SHKDDSPDL	9	1013.029
121	Pepsin (pH>2)	FKLKPDPNT	9	1009.170
122	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
125	Pepsin (pH>2)	CDE	3	365.358
126	Pepsin (pH>2)	F	1	165.192
132	Pepsin (pH>2)	KADERK	6	717.820

136	Pepsin (pH>2)	FWGK	4	536.631
137	Pepsin (pH>2)	Y	1	181.191
139	Pepsin (pH>2)	LY	2	294.351
148	Pepsin (pH>2)	EIARRHPYF	9	1188.354
153	Pepsin (pH>2)	YAPEL	5	591.662
154	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
155	Pepsin (pH>2)	Y	1	181.191
156	Pepsin (pH>2)	Y	1	181.191
159	Pepsin (pH>2)	ANEK	3	331.372
160	Pepsin (pH>2)	Y	1	181.191
163	Pepsin (pH>2)	NGV	3	288.304
164	Pepsin (pH>2)	F	1	165.192
176	Pepsin (pH>2)	QECCQAEDRGAC	12	1284.396
178	Pepsin (pH>2)	LL	2	244.334
188	Pepsin (pH>2)	FKIETMREKV	10	1230.488
197	Pepsin (pH>2)	LTSSARQRL	9	1031.180
204	Pepsin (pH>2)	RCASIQK	7	804.963
205	Pepsin (pH>2)	F	1	165.192
209	Pepsin (pH>2)	GERA	4	431.449
212	Pepsin (pH>2)	LKA	3	330.428
218	Pepsin (pH>2)	WSVARL	6	730.865
222	Pepsin (pH>2)	SQKF	4	508.575
227	Pepsin (pH>2)	PKAEF	5	590.677
232	Pepsin (pH>2)	VEVTK	5	574.675
233	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
236	Pepsin (pH>2)	VTD	3	333.342
237	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
249	Pepsin (pH>2)	TKVHKECCHGDL	12	1369.576
250	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
259	Pepsin (pH>2)	ECADDRADL	9	1007.040
261	Pepsin (pH>2)	AK	2	217.268
262	Pepsin (pH>2)	Y	1	181.191
273	Pepsin (pH>2)	ICDNQDTISSK	11	1223.320
274	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
281	Pepsin (pH>2)	KECCDKP	7	821.962
283	Pepsin (pH>2)	LL	2	244.334
307	Pepsin (pH>2)	EKSHCIAEVERDAIPENLPLTAD	24	2619.926
308	Pepsin (pH>2)	F	1	165.192
317	Pepsin (pH>2)	AEDKDVCRN	9	1021.110
325	Pepsin (pH>2)	YQEKADF	8	971.034
326	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
328	Pepsin (pH>2)	GS	2	162.145
329	Pepsin (pH>2)	F	1	165.192
330	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
331	Pepsin (pH>2)	Y	1	181.191
332	Pepsin (pH>2)	E	1	147.131
333	Pepsin (pH>2)	Y	1	181.191
340	Pepsin (pH>2)	SRRHPEY	7	944.018
344	Pepsin (pH>2)	AVSV	4	374.437
345	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
346	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
348	Pepsin (pH>2)	RL	2	287.362
351	Pepsin (pH>2)	AKE	3	346.384
355	Pepsin (pH>2)	YEAT	4	482.491
356	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
369	Pepsin (pH>2)	EECCARDDPHACY	13	1483.605
372	Pepsin (pH>2)	STV	3	305.331
373	Pepsin (pH>2)	F	1	165.192
375	Pepsin (pH>2)	DK	2	261.278
376	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
378	Pepsin (pH>2)	KH	2	283.330
385	Pepsin (pH>2)	LVDEFQN	7	813.863
386	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
393	Pepsin (pH>2)	IKQNCQ	7	847.941
394	Pepsin (pH>2)	F	1	165.192
396	Pepsin (pH>2)	EK	2	275.305
397	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
399	Pepsin (pH>2)	GE	2	204.183
400	Pepsin (pH>2)	Y	1	181.191

401	Pepsin (pH>2)	G	1	75.067
402	Pepsin (pH>2)	F	1	165.192
405	Pepsin (pH>2)	QNA	3	331.329
406	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
410	Pepsin (pH>2)	IVRY	4	549.671
422	Pepsin (pH>2)	TRKVFQVSTFTL	12	1326.559
428	Pepsin (pH>2)	VEVSRS	6	675.740
450	Pepsin (pH>2)	LGVGTRCCTKPESERMFCTED	22	2440.805
451	Pepsin (pH>2)	Y	1	181.191
452	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
453	Pepsin (pH>2)	S	1	105.093
454	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
455	Pepsin (pH>2)	I	1	131.175
456	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
459	Pepsin (pH>2)	NRL	3	401.466
461	Pepsin (pH>2)	CV	2	220.287
462	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
479	Pepsin (pH>2)	HERTFVSEKVKRCCTES	17	1906.156
480	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
487	Pepsin (pH>2)	VNRRPCF	7	891.059
489	Pepsin (pH>2)	SA	2	176.172
495	Pepsin (pH>2)	LTFDET	6	674.706
500	Pepsin (pH>2)	YVFKA	5	576.693
504	Pepsin (pH>2)	FDEK	4	537.570
505	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
507	Pepsin (pH>2)	FT	2	266.297
508	Pepsin (pH>2)	F	1	165.192
515	Pepsin (pH>2)	HADICTL	7	771.886
527	Pepsin (pH>2)	FDTEKQIKKQTA	12	1386.568
528	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
530	Pepsin (pH>2)	VE	2	246.263
531	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
532	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
542	Pepsin (pH>2)	KHKPRATEEQ	10	1195.341
543	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
549	Pepsin (pH>2)	KIVMEN	6	720.839
550	Pepsin (pH>2)	F	1	165.192
552	Pepsin (pH>2)	VA	2	188.227
553	Pepsin (pH>2)	F	1	165.192
566	Pepsin (pH>2)	VDRCCAADDKEAC	13	1370.530
567	Pepsin (pH>2)	F	1	165.192
574	Pepsin (pH>2)	AVEGPKL	7	712.844
581	Pepsin (pH>2)	VVSTQTA	7	704.778
582	Pepsin (pH>2)	L	1	131.175
583	end of sequence	A	1	89.094

Figura 20: Péptidos teóricos de la hidrólisis de BSA con pepsina (Peptide cutter).

8.3. Identificación de péptidos.

Todas las fracciones obtenidas en el hidrolizado, permeado y concentrado obtenidos con las membranas se analizaron a continuación mediante el LC-MS (Liquid Chromatography Mass Spectrometry), aunque no todas ellas sirvieron para la identificación de péptidos.

Con dichas fracciones, en base a los pesos moleculares que contenían los compuestos se consiguió identificar los péptidos que se muestran en las tablas 9 y 10.

Como ya se explicó en el apartado de “*Material y métodos*” las herramientas empleadas para su uso fueron:

- “Protein Prospector” del cual se utilizó el software “MS-Digest” para conseguir una digestión virtual de la enzima.
- “Findpept” con el cual se completó el anterior análisis, ya que además de los péptidos teóricos debido al corte específico de la enzima, muestra también los posibles debidos a cortes inespecíficos, cortes por contaminantes y los resultantes de la propia autólisis de la proteína.

En la tabla 9, se han ordenado los péptidos obtenidos en el hidrolizado y en los concentrados de la BSA y la pepsina, en la tabla 10 se han ordenado los péptidos que son capaces de permear. Ambas tablas se han ordenado de menor a mayor peso molecular, ya que se trata de un dato importante para poder comprender el comportamiento de los péptidos durante los experimentos de fraccionamiento con membranas. También se ha incluido el punto isoeléctrico de cada péptido. Para la obtención de estos parámetros se empleó la herramienta *Pi/Mw* de la base de datos *ExPASy*. Del mismo modo, ha sido estimada la hidrofobicidad de cada péptido, para este cálculo se ha empleado la herramienta *GRAVY calculator*. Por último se ha calculado la carga de cada péptido a pH 2 y a pH 10. Estos valores también son importantes ya que se espera que la transmisión de péptidos a través de las membranas sea el resultado de una combinación de tamaño y carga eléctrica a cada pH. En esta tabla, se puede observar como los péptidos obtenidos poseen tamaños diversos, ya que están comprendidos desde los 331 Da hasta los 3626 Da. También se puede apreciar como no hay una mayoría de un mismo grupo, si no que existe un equilibrio bastante proporcionado entre la cantidad de péptidos ácidos, neutros y básicos. En cuanto a la hidrofobicidad, este puede ser también un factor determinante a la hora de la trasmisión. En este caso se puede observar en las tablas 9 y 10, como la mayoría de los péptidos identificados son hidrofílicos, debido a que sus valores predominantes en la hidrofobicidad son los negativos.

Ya por último, realizando una comparación de los péptidos teóricos con los identificados realmente, se puede observar como una mayoría de los péptidos identificados se corresponden con los teóricos, existiendo alguna excepción que puede

ser debida a fallos que se producen en los cortes con pepsina o también puede ser producido debido a que la BSA puede estar sufriendo una hidrólisis ácida al mismo tiempo.

Tabla 9: Total de péptidos identificados en el hidrolizado y en el concentrado de BSA ordenados de menor a mayor PM.

FRACCIÓN	PÉPTIDO	PUNTO ISOELÉCTRICO	PESO MOLECULAR	CARGA pH2	CARGA pH 10	HIDROFOBICIDAD	GRUPO	ACTIVIDAD POTENCIAL
f(141-148)	IARRHPYF	10,84	105,24	3,9	0,5	-0,75	básico	Inhibidora ACE y antioxidante
f(20-22)	KGL	8,75	316,4	1,9	-0,5	-0,17	básico	
f(7-9)	LSL	5,52	331,41	0,9	-1	2,27	neutro	
f(551-553)	VAF	5,49	335,4	0,9	-1	2,93	neutro	Inhibidora DDP-IV, inhibidora ACE y antioxidante
f(529-531)	VEL	4	359,42	0,9	-2	1,5	ácido	
f(380-382)	VDE	3,67	361,35	0,9	-3	-0,93	ácido	
f(355-357)	TLE	4	361,4	0,9	-2	-0,13	ácido	
f(28-30)	SQY	5,24	396,4	0,9	-1,5	-1,87	neutro	Inhibidora ACE y antioxidante
f(50-52)	SKY	8,31	396,44	1,9	-0,5	0,13	básico	Inhibidora ACE y antioxidante
f(346-348)	LRL	9,75	400,52	1,9	0	1,03	básico	

f(497-500)	VPKA	8,72	413,52	1,9	-0,5	0,13	básico	Inhibidora ACE, inhibidora DPP-IV y antioxidante
f(158-160)	NKY	8,59	423,47	1,9	-1	-2,9	básico	Inhibidora ACE y antioxidante
f(43-46)	VNEL	4	473,53	0,9	-2	0,25	ácido	
f(131-134)	SITY	5,24	482,53	0,9	-1,5	0,425	neutro	Inhibidora ACE y antioxidante
f(39-42)	HVKL	8,76	495,62	2,9	-0,5	0,23	básico	
f(502-505)	DEKL	4,37	503,55	1,9	-2,5	-1,78	ácido	
f(400-403)	YGFQ	5,52	513,55	0,9	-1,5	-0,6	neutro	
f(281-2869)	TGPTSA	5,19	532,55	0,9	-1	-0,4	neutro	Antioxidante
f(354-359)	ATLEE	3,8	561,59	0,9	-3	-0,42	ácido	Inhibidora DPP-IV
f(99-103)	VPSVY	5,49	563,65	0,9	-1,5	0,94	neutro	Inhibidora ACE y antioxidante
f(395-399)	EKLGE	4,53	574,63	1,9	-2,5	-1,5	ácido	
f(523-527)	KKQTA	10	574,68	2,9	0	-2,04	básico	
f(130-134)	LSITY	5,52	595,69	0,9	-1,5	1,1	neutro	Inhibidora ACE y antioxidante
f(355-360)	TLEECC	3,79	696,79	0,9	-4,9	0,18	ácido	
f(114-119)	KLKPDP	8,59	696,84	2,9	-1	-1,78	básico	Inhibidora

								ACE y antioxidante
f(575-581)	VVSTQTA	5,49	704,78	0,9	-1	0,64	neutro	
f(568-574)	AVEGPKL	6,05	712,84	1,9	-1,5	0,06	neutro	Inhibidora DPP-IV y antioxidante
f(20-26)	KGLVLIA	8,75	712,93	1,9	-0,5	1,97	básico	
f(203-209)	GLVSQDL	3,8	730,82	0,9	-2	0,51	ácido	
f(290-296)	AEVEKDA	4,14	760,8	1,9	-3,5	-0,94	ácido	Inhibidora DPP-IV
f(495-501)	TYVPAKF	8,26	824,98	1,9	-1	0,19	básico	Antioxidante
f(262-270)	TIACSGGCQ	5,18	838,95	0,9	-2,9	0,61	neutro	
f(56-63)	DESHAGCE	4,13	846,82	1,9	-5	-1,13	ácido	
f(322-329)	KDAFLGSF	5,84	884	1,9	-1,5	0,33	neutro	Inhibidora ACE y antioxidante
f(239-246)	NWVPVSVE	4	929,04	0,9	-2	0,29	ácido	Antioxidante
f(122-129)	LCDEFKAD	4,03	940,04	1,9	-4,5	-0,44	ácido	
f(495-502)	TYVPAKFP	5,5	940,06	1,9	-2	-0,28	neutro	Inhibidora ACE y antioxidante
f(213-220)	WSVARLSQ	9,75	946,07	1,9	0	-0,09	básico	
f(362-369)	KDDPHACY	5,21	948,02	2,9	-4	-1,59	neutro	Inhibidora ACE y antioxidante
f(22-29)	VRKKSLRQ	12,02	1014,24	4,9	2	-1,64	básico	
f(334-341)	SRRHPEYA	8,49	1015,1	3,9	-0,5	-2,2	básico	Inhibidora ACE y antioxidante

f(35-145)	GTGSMTGILGY	5,52	1056,2	0,9	-1,5	0,46	neutro	Inhibidora ACE y antioxidante
f(205-213)	VSQDLFSVY	3,8	1057,17	0,9	-2,5	0,57	ácido	Inhibidora ACE y antioxidante
f(337-346)	DDDSCTSGFE	3,37	1075,03	0,9	-6	-1,14	ácido	
f(165-173)	TEPGSFLYY	4	1076,17	0,9	-3	-0,33	ácido	Inhibidora ACE y antioxidante
f(433-442)	GTRCCTKPES	8,06	1081,23	2,9	-2,4	-1,11	básico	
f(116-125)	NPDDSSTFEA	3,49	1082,05	0,9	-4	-1,33	ácido	Inhibidora ACE y antioxidante
f(161-170)	NGVFQECCQA	4	1098,21	0,9	-3,9	-0,06	ácido	Antioxidante
f(83-92)	TYGDMADCCE	3,49	1107,19	0,9	-6,4	-0,42	ácido	Antioxidante
f(201-210)	DQGLVSQDLF	3,56	1121,21	0,9	-3	-0,06	ácido	
f(113-122)	PKLKPDPNTL	9,01	1122,33	2,9	-1	-1,27	básico	Antioxidante
f(17-26)	EHFKGLVLIA	6,85	1126,36	2,9	-1,5	0,99	neutro	Antioxidante
f(155-164)	YYANKYNGVF	8,43	1238,36	1,9	-2	-0,64	básico	Inhibidora ACE y antioxidante
f(482-492)	NRRPCFSALTP	10,35	1261,46	2,9	0	-0,57	básico	Inhibidora ACE y antioxidante
f(373-385)	DRANNKVGLAPVA	8,75	1324,5	2,9	-0,5	-0,25	básico	Inhibidora ACE y antioxidante

f(331-340)	YEYSRRHPEY	6,76	1399,49	3,9	-2,5	-2,55	neutro	Inhibidora ACE y antioxidante
f(568-581)	AVEGPKLVVSTQTA	6,05	1399,61	1,9	-1,5	0,35	neutro	Inhibidora DPP-IV y antioxidante
f(551-564)	VAFVDKCCAADDKE	4,23	1513,7	2,9	-5,9	-0,01	ácido	Inhibidora DPP-IV y antioxidante
f(126-137)	FKADEKKFWGKY	9,4	1546,79	4,9	-1,5	-1,48	básico	Inhibidora ACE y antioxidante
f(61-74)	GCEKSLHTLFGDEL	4,65	1548,73	2,9	-4,5	-0,23	ácido	Antioxidante
f(374-386)	DKLKHLVDEPQNL	5,38	1548,76	3,9	-3	-1,12	neutro	
f(57-72)	AALIGDEPLENYLDTE	3,39	1762,89	0,9	-6,5	-0,34	ácido	Inhibidora DPP-IV y antioxidante
f(394-409)	FEKLGEYGFQNALIVR	6,14	1884,16	2,9	-2	-0,05	neutro	Antioxidante
f(123-137)	CDEFKADEKKFWGKY	6,21	1894,13	4,9	-4,5	-1,49	neutro	Inhibidora ACE y antioxidante
f(1-17)	DTHKSEIAHRFKDLGEE	5,39	2012,17	5,9	-4	-1,48	neutro	Antioxidante
f(490-506)	LTPDETYVPKAFDEKLF	4,32	2013,27	2,9	-4,5	-0,5	ácido	Inhibidora ACE y antioxidante
f(205-225)	VSQDLFSVYLSSNDDSGSVV	3,42	2231,4	0,9	-4,5	0,33	ácido	Antioxidante
f(215-238)	SSNDDSGSVVLLGGIDSSYY TGSL	3,42	2393,5	0,9	-5	-0,01	ácido	Antioxidante

f(167-188)	CCQAEDKGACLLPKIETMREKV	6,23	2465,94	4,9	-5,4	0,32	neutro	Antioxidante
f(151-171)	PELLYYANKYNGVFQECCQA	4,25	2482,76	1,9	-6,9	-0,53	ácido	Antioxidante
f(32-57)	IKNGKLDLFLKTHKHNPASK YFPEAA	9,88	2983,47	8,9	-0,5	-1,04	básico	Antioxidante
f(436-466)	CCTKPESERMPCTEDYLSLI LNRLCVLHEKT	5,59	3626,25	5,9	-7,4	-0,31	neutro	Antioxidante

Tabla 10. Péptidos capaces de permear ordenados de menor a mayor PM.

FRACCIÓN	PÉPTIDO	PUNTO ISOELÉCTRICO	PESO MOLECULAR	CARGA Ph2	CARGA Ph10	HIDROFOBICIDAD	GRUPO	ACTIVIDAD POTENCIAL
f (551-553)	VAF	5,49	335,4	0,9	-1	2,93	neutro	Inhibidora ACE, Inhibidora DPP-IV y antioxidante
f(50-52)	SKY	8,31	396,44	1,9	-1	-2	básico	Inhibidora ACE y antioxidante
f (177-180)	DGIL	3,8	416,47	0,9	-2	1,1	Ácido	
f (158-160)	NKY	8,59	423,47	1,9	-1	-2,9	básico	Inhibidora ACE y antioxidante
f (131-134)	SITY	5,24	482,53	0,9	-1,5	0,425	neutro	Inhibidora ACE y antioxidante
f(400-403)	YGFQ	5,52	513,55	0,9	-1,5	-0,6	neutro	Inhibidora ACE y antioxidante
f(281-2869)	TGPTSA	5,19	532,55	0,9	-1	-0,4	neutro	Antioxidante
f(149-153)	YAPEL	4	591,66	0,9	-2,5	-0,16	Ácido	Inhibidora DPP-IV y antioxidante

f(50-55)	AKTCVA	8,27	591,72	1,9	-1,5	0,95	básico	
-----------------	--------	------	--------	-----	------	------	--------	--

Cada fracción obtenida con el HPLC semipreparativo se relacionó también con un perfil cromatográfico determinado por el RP-HPLC, con la finalidad de asegurar que los péptidos identificados se corresponden con los picos del cromatograma original.

Como ya se ha indicado en las tablas 9 y 10, algunos de estos péptidos identificados, podrían ser potencialmente bioactivos. De acuerdo con una revisión bibliográfica las principales actividades potenciales de estos péptidos podrían ser:

- Actividades inhibitoras ACE. Esta es la enzima convertidora de angiotensina. Es la encargada de controlar la presión arterial, tratándose de un potente vasoconstrictor que aumentará la presión arterial debido a la formación de angiotensina II y por la degradación de la bradiquinina.

Los péptidos que pueden presentar actividad de este tipo son aquellos que tienen aminoácidos hidrofóbicos en las 3 últimas posiciones de la secuencia (Li,2004; Quirós,2005).

- Inhibición de la DPP-IV. Esta enzima degrada las incretinas, hormonas que son las encargadas de regular el metabolismo de la glucosa. Las incretinas estimulan la secreción de insulina en respuesta a la ingesta de nutrientes. GLP1 y GIP son las dos principales incretinas conocidas hasta el momento, presentando ambas un efecto trópico sobre las células beta de los islotes pancreáticos. Estas incretinas son rápidamente inhibidas por la DPP-IV por lo que pueden ser beneficiosos para pacientes con diabetes tipo 2.

Los péptidos que pueden presentar este tipo de actividad son los que presentan una prolina o una alanina en la primera o segunda posición de su secuencia (Silveira, 2013).

- Actividad antioxidativa. Son aquellos que tienen en la secuencia aminoácidos hidrofóbicos. (Connolly, 2014).

8.4. Análisis de permeados y concentrados.

Como ya se comentó en el apartado de “*Material y métodos*” para el análisis de permeados y concentrados se empleó la técnica de RP-HPLC (cromatografía líquida en alta resolución en fase reversa). Todas las muestras necesitaron un filtrado previo al análisis en el HPLC y en los casos necesarios se realizó una dilución de la muestra para conseguir una concentración inferior a 1g/l, con la finalidad de evitar la saturación de la columna.

Para el análisis se emplearon dos tipos de fases móviles en distinta proporción: agua ultrapura y acetonitrilo (ACN) de grado HPLC (99,9%), ambas fases móviles contenían además 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA).

Además de la identificación de las fracciones, de los resultados que se obtuvieron de los ensayos con membranas también se pueden obtener las transmisiones de los péptidos (Tr), tomando las áreas bajo los picos cromatográficos de los péptidos del permeado y del concentrado.

➤ Membrana de 1kDa.

Se analizó el perfil cromatográfico de los permeados y concentrados de la membrana de 1kDa obteniéndose los siguientes resultados:

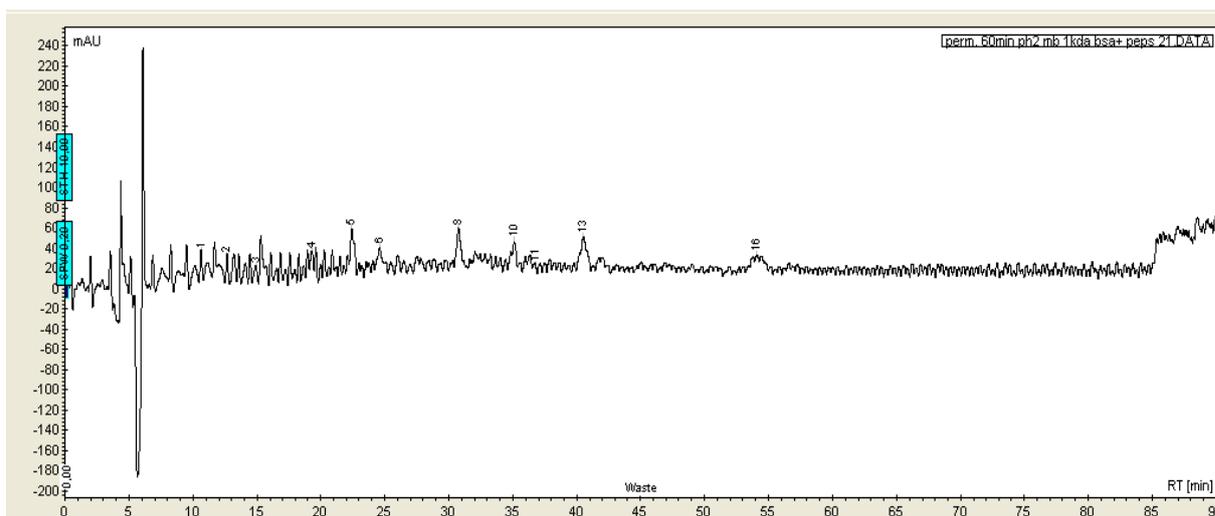


Figura 21: Cromatograma del permeado de la membrana de 1 kDa a pH 2.

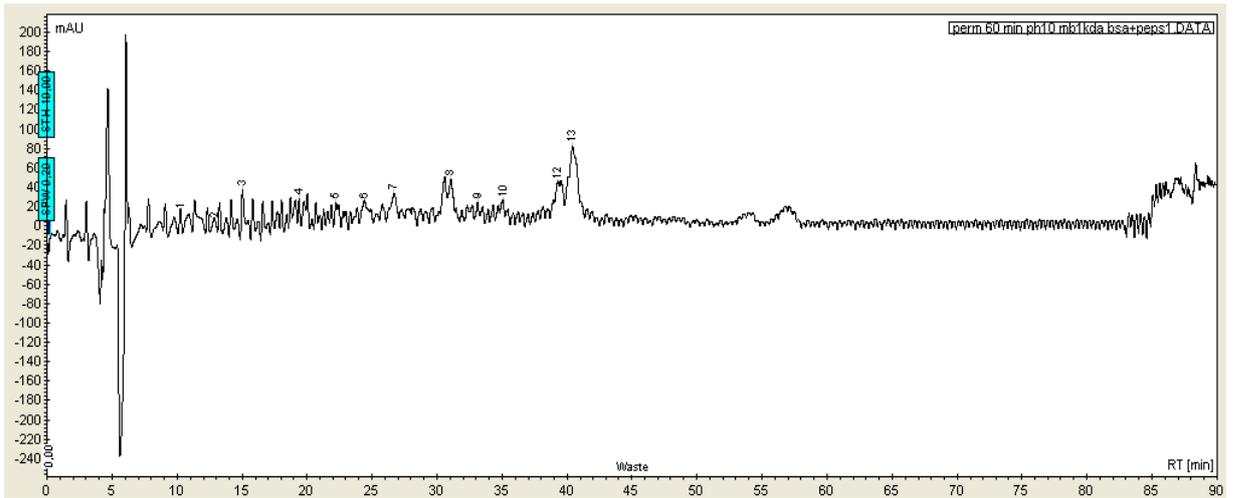


Figura 22: Cromatograma del permeado de la membrana de 1kDa a pH 10.

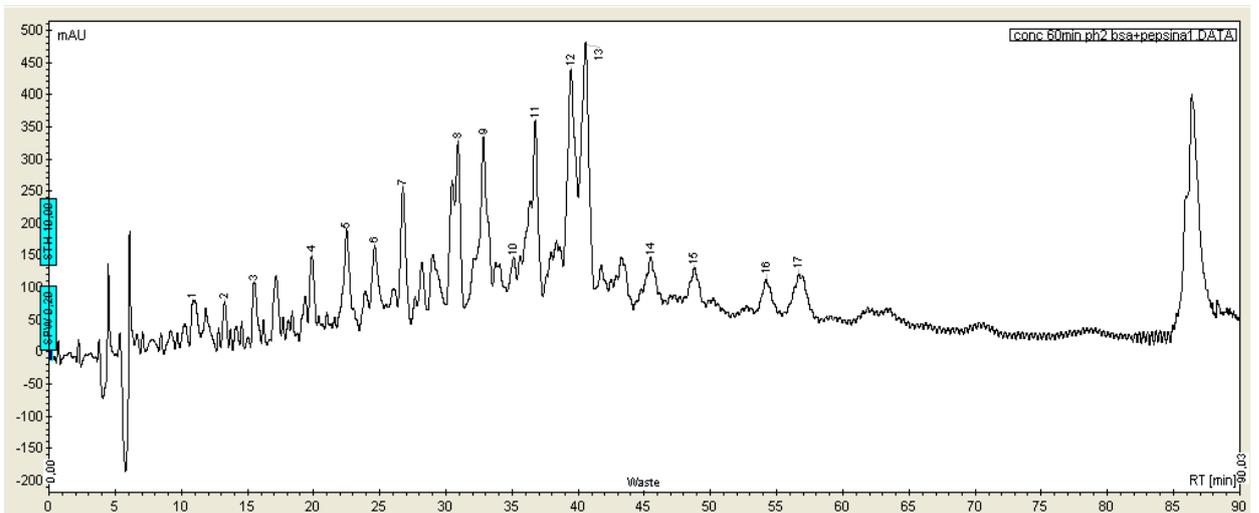


Figura 23: Cromatograma del concentrado de la membrana de 1kDa a pH 2.

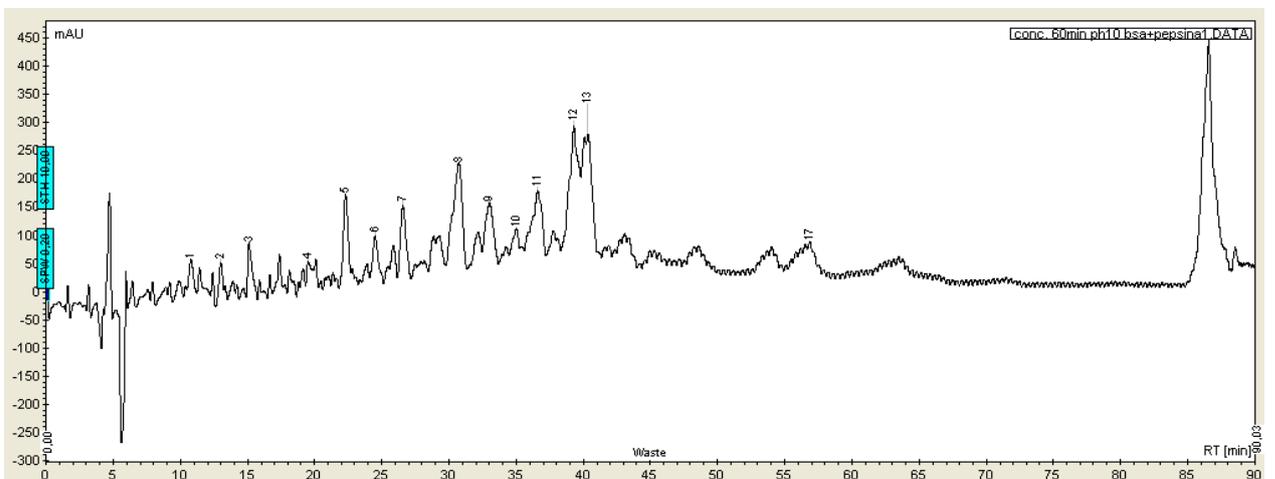


Figura 24: Cromatograma del concentrado de la membrana de 1kDa a pH 10.

Como se pudo ver en los anteriores cromatogramas, se han obtenido picos tanto en el permeado como en el concentrado, aunque la mayor parte de éstos péptidos se encuentran en el concentrado. También se puede apreciar como en el concentrado de pH 2 existe una mayor cantidad de picos que en el de pH 10.

➤ Membrana de 5kDa.

A continuación se pasa a mostrar los cromatogramas obtenidos en la membrana de 5 kDa:

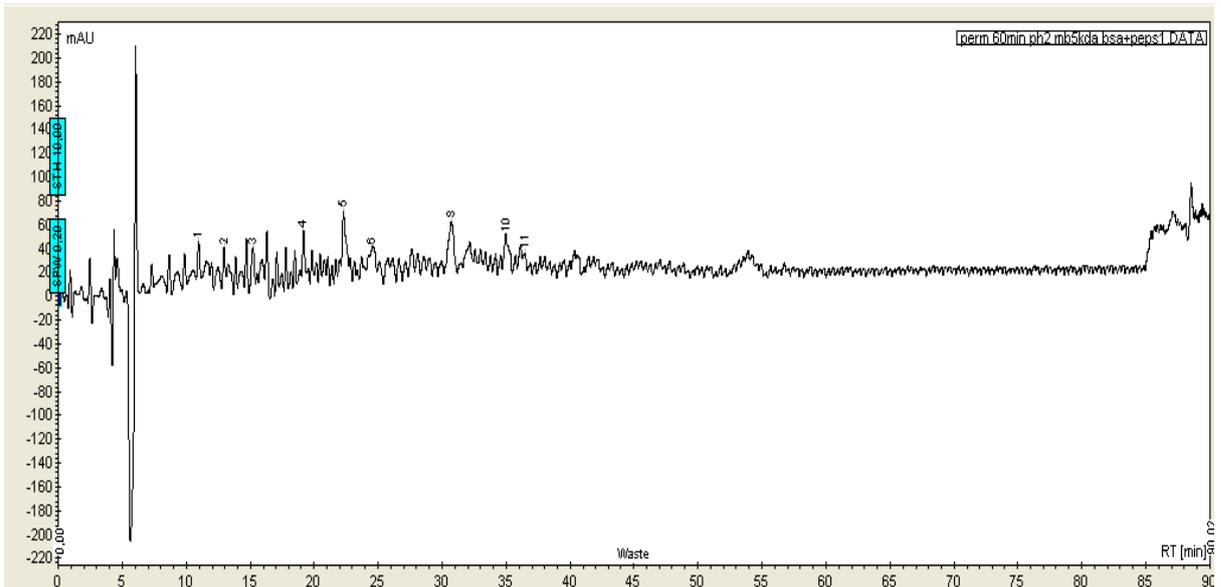


Figura 25: Cromatograma del permeado de la membrana de 5 kDa a pH 2.

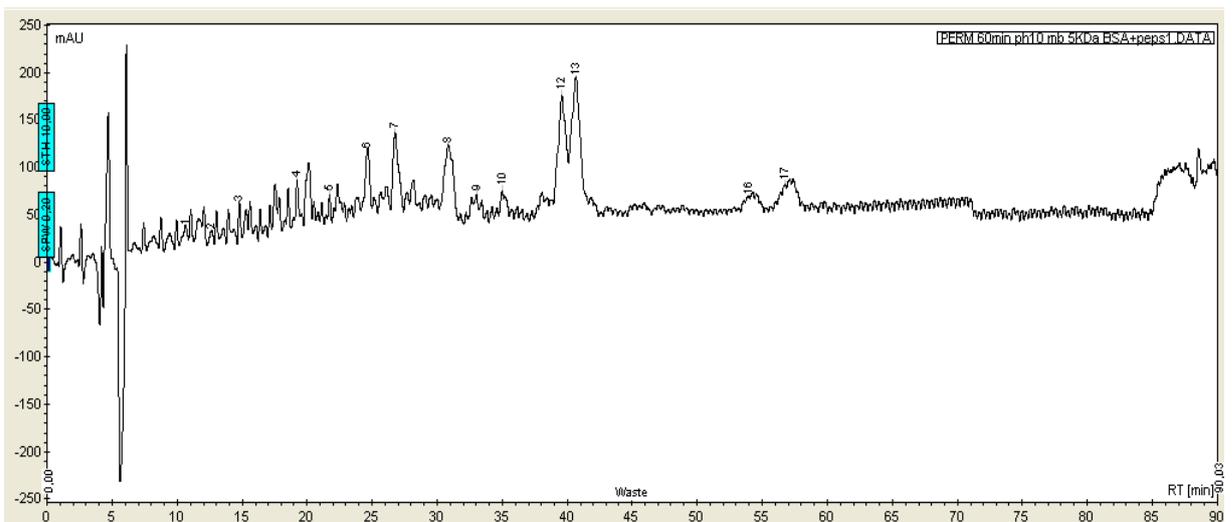


Figura 26: Cromatograma del permeado de la membrana de 5 kDa a pH 10.

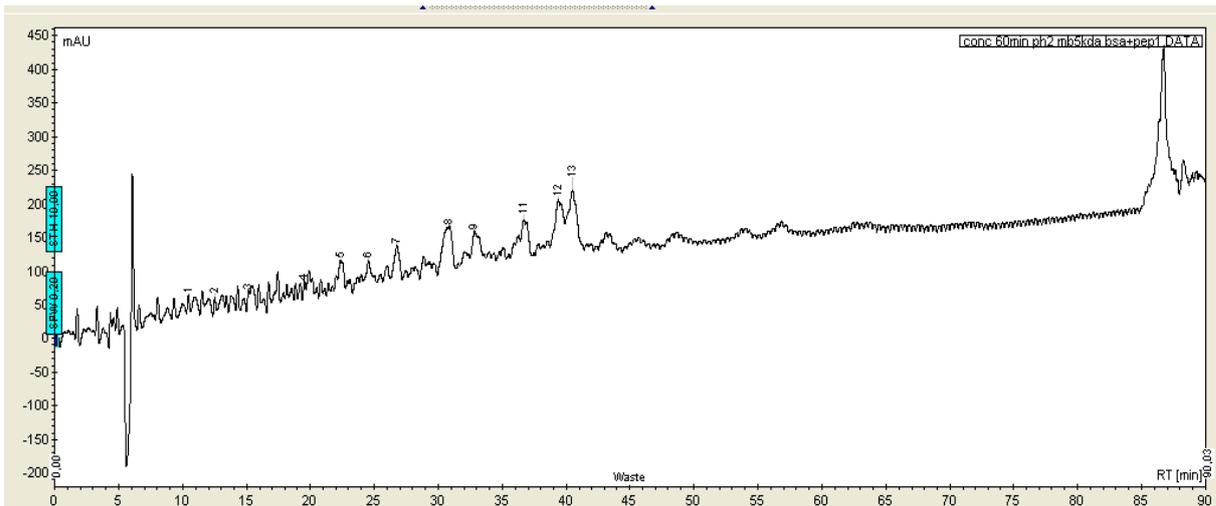


Figura 27: Cromatograma del concentrado de la membrana de 5kDa a pH 2.

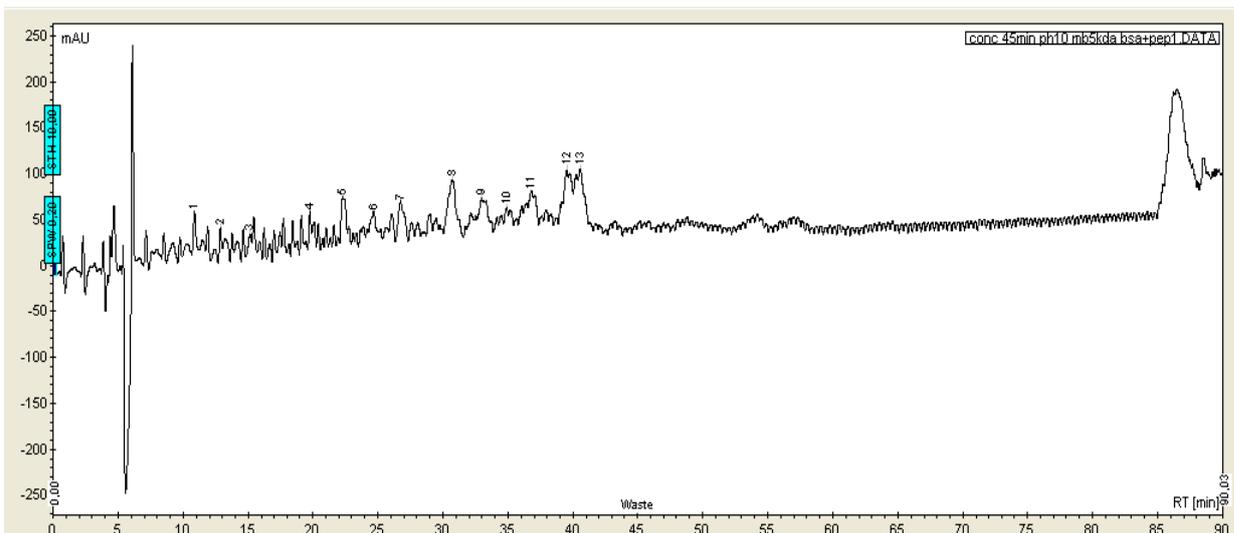


Figura 28: Cromatograma del concentrado de la membrana de 1kDa a pH 10.

En estos cromatogramas, se aprecia como en el caso de los permeados se obtienen más picos para el de pH 10, esto puede ser debido a la carga que posee la membrana y la carga que los péptidos presentan a este pH creen fuerzas de atracción y repulsión.

Con los cromatogramas expuestos anteriormente, tanto para la membrana de 1kDa como para la de 5 kDa, se calculó el valor de las transmisiones (Tr).

Resulta complejo encontrar una correlación cualitativa entre la transmisión de cada péptido, las propiedades consideradas (peso molecular y pI) y las membranas bajo las condiciones de trabajo (pH 2 y pH 10). Para la interpretación de estos resultados se

tuvo como referencia artículos de Fernández 2012, Pouliot et al.,2000 y Lapointe et al., 2003.

Las transmisiones se han obtenido teniendo en cuenta las áreas bajo los picos cromatográficos, en muchos casos, estas áreas son demasiado pequeñas lo que puede conducir a errores importantes. El método analítico proporciona en algunos casos la medición automática, pero en el caso de los picos que no están bien resueltos (líneas bases que no están bien establecidas) es el analista el que establece manualmente el área del pico, para intentar ajustar de esta forma mejor el área.

Para la correcta comprensión de las diferencias de Tr de las distintas membranas en función de su peso molecular (PM) se representan los resultados en la figura 28 y 29:

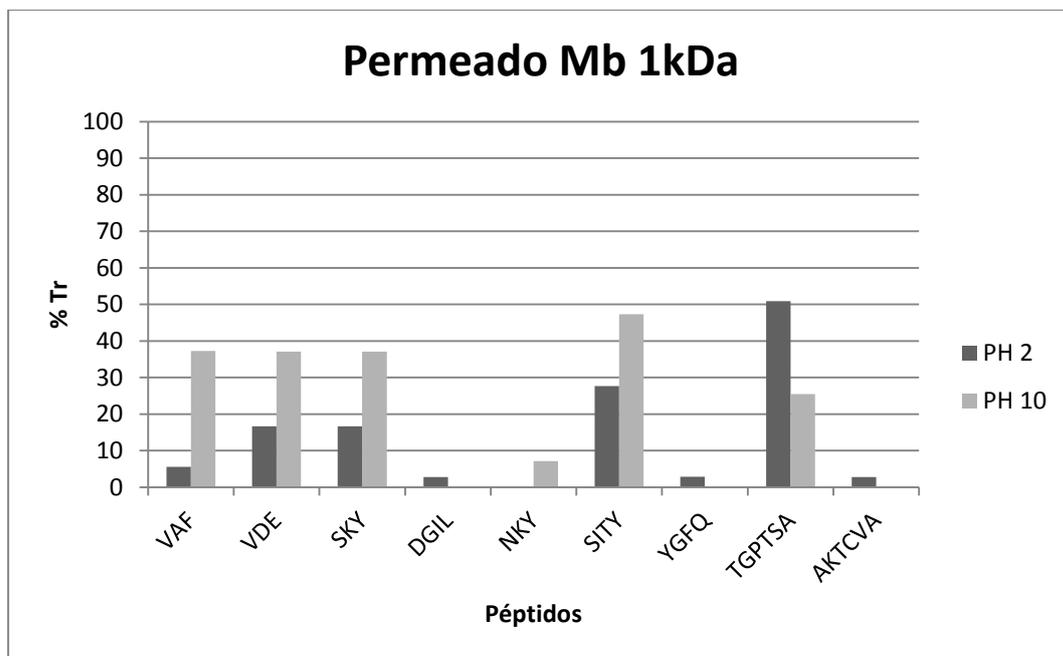


Figura 29: Transmisión de los péptidos en función de su PM en la membrana de 1kDa.

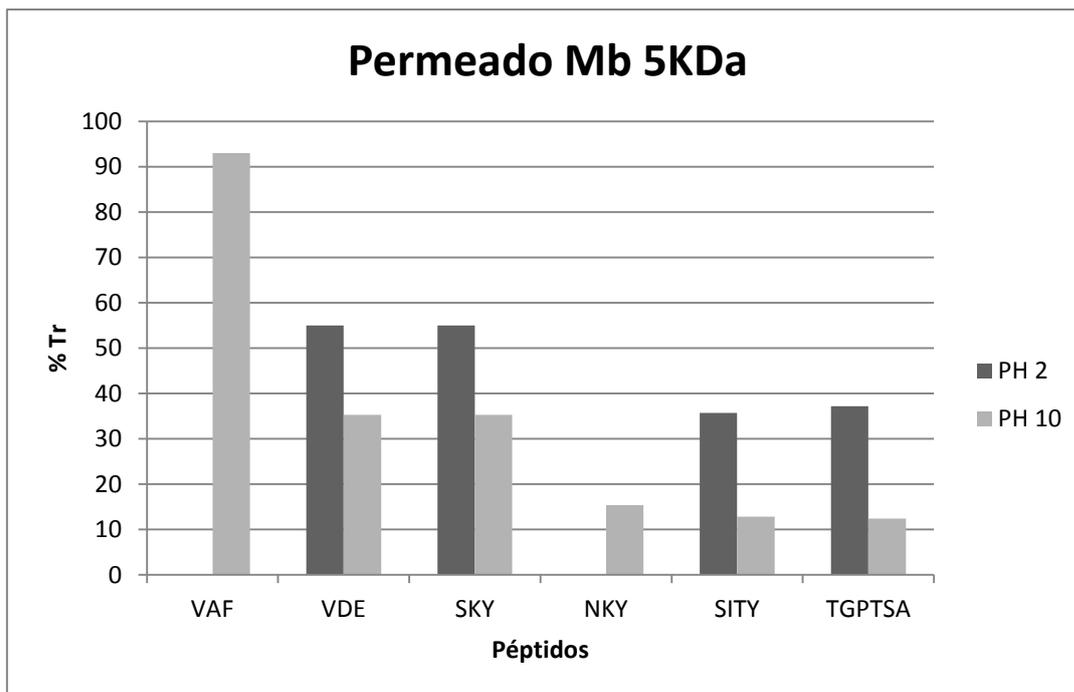


Figura 30: Transmisión de los péptidos en función de su PM en la membrana de 5kDa.

Todos los péptidos obtenidos tras la hidrólisis de la BSA con pepsina tienen un peso molecular inferior a 5000 Da por lo que teóricamente en su totalidad deberían ser transmitidos en la membrana de 5kDa, sin embargo se puede observar en las figuras 28 y 29 (en la cual los péptidos están ordenados de menor a mayor PM) como no sucede de esta forma, sino que una gran cantidad son retenidos parcialmente por la membrana.

Además en estas figuras se puede apreciar como el péptido VAF se transmite bastante bien en las dos membranas pero solo cuando se encuentran a pH 10, esto puede ser debido a que se trata de un péptido de tamaño muy pequeño e hidrofóbico. Las membranas, también son hidrofóbicas por tanto se podrían establecer interacciones que hagan que estos péptidos pasen mejor que otros que no posean esta característica.

En cuanto al resto de péptidos,(VDE, SKY,NKY,SITY,TGPTSA) se tratan de péptidos de tamaño pequeño los cuales son hidrofóbicos o muy poco hidrofílicos, por tanto puede ser debido a estas características por lo que son capaces de permear sin dificultad.

El peso molecular no es el único factor que afecta a la transmisión, existen otros factores que afectan en gran medida, estos factores dependerán de las propiedades físico

químicas de los péptidos, así como de las membranas empleadas para el experimento, por ello se procedió a estudiar otras variables.

La siguiente variable a estudiar fue el punto isoeléctrico. Para ello se dividieron los péptidos en función de su pI en tres grupos:

- Péptidos ácidos con $pI < 5$
- Péptidos neutros con pI entre 5 y 7
- Péptidos básicos cuyo pI es > 7

El resultado de dicha distribución se muestra en la figura para cada membrana, según el carácter ácido, básico o neutro que poseen los distintos péptidos en función de su pI.

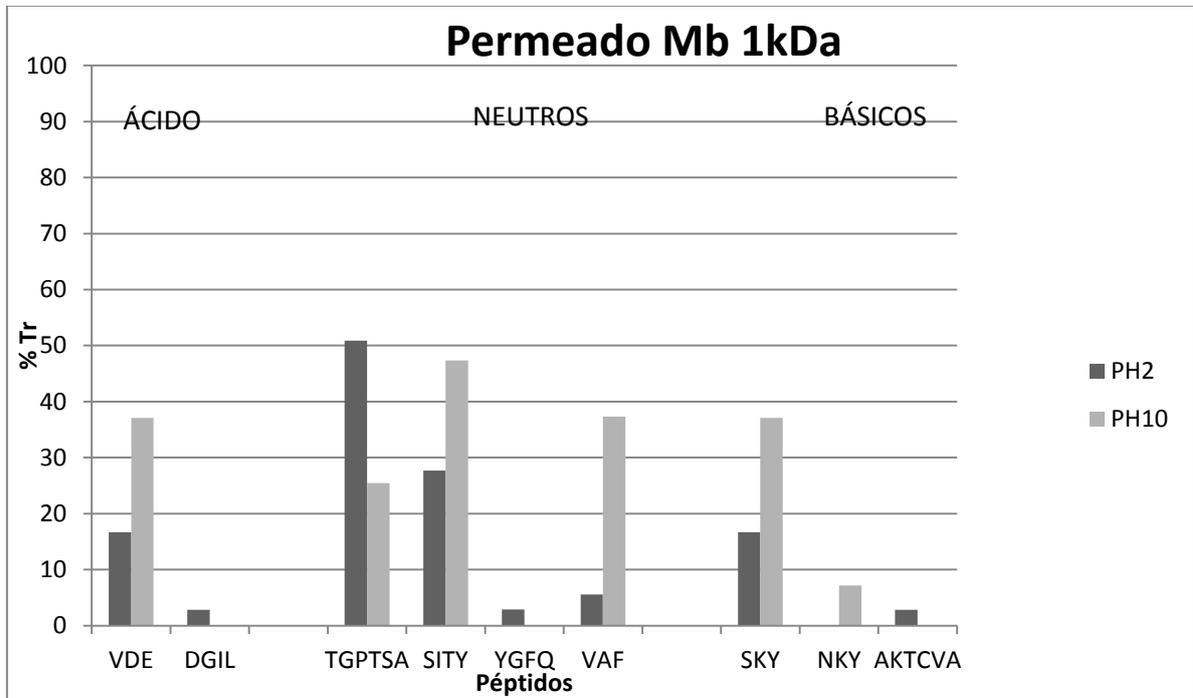


Figura 31: Transmisión peptídica en función del punto isoeléctrico en la membrana de 1kDa.

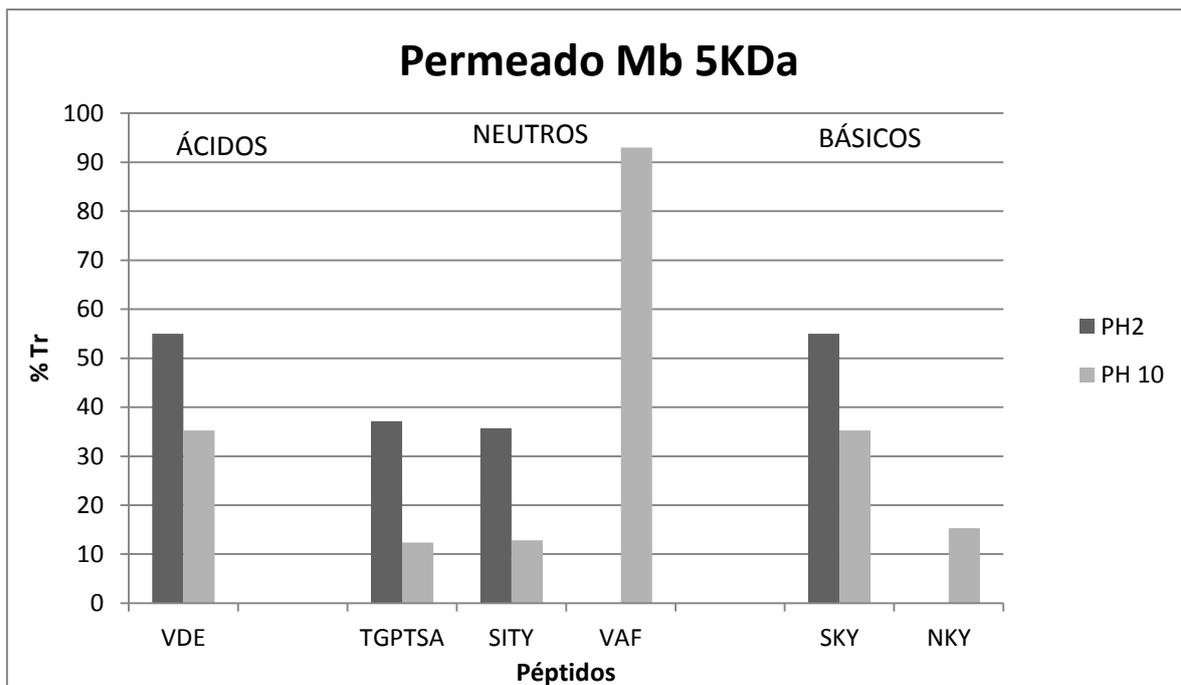


Figura 32: Transmisión peptídica en función del punto isoeléctrico en la membrana de 5kDa.

Las figuras anteriores reflejan que la mayor transmisión se obtiene para los péptidos neutros. Este resultado se ve influido a su vez por la carga de la membrana, que en el caso de la de 5kDa estará cargada negativamente a pH superiores a 4, produciéndose fuerzas de repulsión cuanto más ácido sea el péptido.

En la membrana de 1kDa, al igual que en la anterior, se obtienen mejores transmisiones para los péptidos neutros pudiendo por tanto también estar influenciada la transmisión por la carga de esta membrana. En esta membrana se obtiene una menor transmisión de los péptidos en comparación con la de 5 kDa este resultado es debido a que esta membrana está afectada en un mayor grado por el PM de los péptidos que en el caso de la de 5kDa ya que posee un tamaño de poro menor que impedirá el paso de muchos de los péptidos.

En este caso, también llama la atención como VAF es capaz de transmitirse en ambas membranas a un pH de 10. Como se explicó en el caso anterior esto puede ser debido a su pequeño tamaño y a su carácter hidrofóbico y las posibles interacciones que puede establecer con la membrana. El resto de péptidos se transmiten en ambas membranas con excepción de DGIL y AKTCVA que solo son transmitidos en la membrana de

1kDa y a pH 2, esto puede ser debido a que ambos péptidos a este pH poseen una carga positiva y son hidrofóbicos además de caracterizarse por tener un pequeño tamaño.

9. Conclusiones

1. Se ha abierto una nueva línea de trabajo de la hidrólisis de la BSA con pepsina sobre la que apenas existe información. La BSA es una proteína presente tanto en el suero de quesería como en la sangre por lo que las vías de revalorización de estos productos es un campo que merece ser explorado en el futuro.
2. Se demuestra como la BSA es un buen sustrato para la pepsina al obtenerse grados de hidrólisis elevados en tiempos relativamente cortos y cantidades de enzima moderadas.
3. Se demuestra la posibilidad de llevar a cabo el fraccionamiento de péptidos mediante membranas y los beneficios que esta técnica puede aportar como puede ser enriquecer el concentrado en péptidos de un tipo en concreto y el permeado enriquecido en otro tipo de péptidos.
4. En la operación con membranas se ha trabajado a bajas velocidades, 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.
5. En el análisis de transmisión de los distintos péptidos identificados se aprecia como la carga de estos es uno de los factores más relevantes, siendo los péptidos neutros los que mostraron mayores transmisiones.
6. El efecto del peso molecular es más determinante en la membrana de 1kDa que en la de 5kDa.
7. Ninguno de los efectos por sí solo es significativo en la transmisión, sino que lo realmente importante es el conjunto de varios factores.
8. Usando una membrana de 1kDa a pH 10 se observó cómo se pudo obtener péptidos potencialmente bioactivos. Este tipo de experimentos, en un futuro, se podrían ensayar tanto en vivo como in vitro y de esta forma continuar realizando estudios sobre los efectos de estos péptidos bioactivos.

10. Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
α-La	α -lactoalbúmina
bar	Bares
β-LG	β -lactoglobulina
BSA	Seroalbúmina bovina
Ca	Calcio
CC	Corriente continúa
Cl	Cloruro
CM	Contactores con membranas
DAD	Detector “Diode array”
DBO	Demanda biológica de oxígeno
D	Diálisis
DD	Diálisis Donnan
DH	Grado de hidrólisis
ED	Electrodiálisis
EM	Electrodiálisis con membranas
g	Gramo
HCL	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
kDa	Kilodalton
K	Potasio
L	Litro

MF Microfiltración

Mg Magnesio

min Minutos

μm Micrómetro

mm Milímetro

μL Microlitro

m² Metro cuadrado

MWCO Peso molecular de corte a partir del cual la membrana retiene al menos el 90% de los sólidos de dicho peso.

Na Sodio

NF Nanofiltración

OI Ósmosis inversa

P Fósforo

P Pervaporación

Pi Punto isoelectrico

PM Peso molecular

PV Permeación de vapores

RF Radio frecuencia

RLW Reduced Lactose Whey

RP-HPLC Cromatografía líquida en alta resolución en fase reversa

SG Separación de gases

TFA Ácido trifluoroacético

TMP Presión tras membrana

UF Ultrafiltración

WPC Whey Protein Concentrates

WPI Whey Protein Isolates

11. Bibliografía

Almécija, M.C.,(2007). ***Obtención de lactoferrina bovina mediante ultrafiltración del lactosuero.*** Tesis Doctoral,Universidad de Granada,España.

Baro, L., J. Jiménez, A. Martínez y J. Bouza (2001). ***Péptidos y proteínas e la leche con propiedadesfuncionales.***J.Ars.Pharmaceutica. 42 (3-4): 135-145.

Benítez, Ibarz, Pagan.(2008). ***Hidrolizados de proteínas: procesos y aplicaciones.*** Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana,42,227-236.

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.

Camacho F, González-Tello P, Jurado E, Guadalix E.M.(1992).***Hidrólisis enzimática de lactoalbúmina.*** An Quim.568-572.

Camacho F, González-Tello P,Paez-Dueñas MP, Guadix EM,Guadix A.(2001).***Correlation of base consumption with the degree of hydrolysis in enzymic protein hydrolysis.*** J Dairy Res.68:251-265.

Church FC, Swaisgood HE, Porter DH, Catignani GL.(1993).***Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk ans isolated milk proteins.*** J Dairy Sci 66:1219-1227.

Clare D.A. and Swaisgood H.E.(2000).***Bioactive Milk Peptides: A Prospectus.*** Department of Food Science and Biochemistry, North Carolina State University Raleigh.

Connolly A., O'Keeffe M.B., Piggott C.O., Nongonierma A.B. (2014). *Generation and identification of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from a brewer's spent grain protein isolate*. Food Chemistry, 176, 64-71.

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.

Emerson, T.E., Jr. (1989). *Unique features of Albumin: A brief review*. CRC Crit. Care Med. 17; 690-694.

Fernández A., Riera F.A. (2012). *Membrane Fractionation of a β -Lactoglobulin Tryptic Digest: Effect of the Hydrolysate Concentration*. Industrial and Engineering Chemistry Research, 51, 15738-15744.

Ferry, J.D., (1935). *Ultrafilter and ultrafiltration*. Chem. Rev., 11-376.

Fersht A., (1980). *Estructura y mecanismo de los enzimas*. Reverte.

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

Figueroa, Zapata, Gutiérrez. (2012). *Modelamiento de la cinética de hidrólisis enzimática de proteínas del plasma bovino*. Revista EIA, 17, 71-84.

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

Hollar, CM., Parris, N., Hsieh, A., Cockle, KD. (1995). *Factors Affecting the Denaturation and Aggregation of Whey Proteins in Heated Whey Protein Concentrate Mixtures*. Journal of dairy Science, 78(2), 260-267.

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

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. (2006). *Bioactive peptides: Production and functionality*. Int. Dairy J, 16, 954-960.

Lapointe J., Gauthier S., Pouliot Y., Bouchard C., (2003). *Effect of hydrodynamic conditions on fractionation of β -lactoglobulin tryptic peptides using nanofiltration membranes*. Journal of membrane Science, 212, 55-67.

Li G., Le G., Shi Y., Shrestha S., (2004). *Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects*. Nutrition Research, 24, 469-486.

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

Loaiza, M.,(2011). *Aprovechamiento del suero de leche para la elaboración de una bebida funcional*, Tesis doctoral, Universidad de las Américas.

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.

Majorek K.A., Porebski P.J.,Dayal A.,Zimmerman M.D.,Jablonska K.,Stewart A.J.,Chruszcz M., Minor W.(2012).*Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins*.(2012).Molecular immunology.52(2),174-182.

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.

Nau, F., Kerhervé, F.L., Leonil, J., and Daufin, G., (1995). *Selective separation of tryptic β -casein peptides through ultrafiltration membranes: influence of ionic interactions*, Biotechnology and bioengineering, 46, 246-253.

Nissen A. (1979).*Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulphonic acid*.Journal of Agricultural and Food Chemistry,6,1256-1262.

Nissen A., (1986). *Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins*. London and New York: Elsevier Applied Science Publishers.

Panasiuk R., Amarowicz R., Kostyra H., Sijtsma L., (1998). *Determination of alpha-amino nitrogen in pea protein hydrolysates : a comparison of three analytical methods*. Food Chem, 62, 363-367.

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

Parzanese, M., Tecnologías para la Industria Alimentaria. Procesamiento de lactosuero. Alimentos Argentinos: p.9.

Pouliot Y., Gauthier S.F., Heureux J. (2000). *Effect of peptide distribution on the fractionation of whey protein hydrolysates by nanofiltration membranes*. EDP Science, 80, 113-122.

Qi W., Su R.X., He Z.M., Zhang Y.B., Jin F.M. (2007). *Pepsin-Induced Changes in the Size and Molecular Weight Distribution of Bovine Casein During Enzymatic Hydrolysis*. J. Dairy Sci., 90, 5004-5011.

Qi W., Su R.X., He Z. (2007). *Transformation of antimicrobial into bradykinin-potentiating peptides during peptic hydrolysis of bovine haemoglobin: identification, release kinetics and reaction network of peptides*. Sci Food Agric, 87, 461-469.

Quirós A.,Hernández-Ledesma B., Ramos M.,Amigo L.,Recio I.(2005).***Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Peptides Derived from Caprine Kefir***.J.Dairy Sci.,88,3480-3487.

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

Ryan K.N.,(2011).***Modifying Whey Proteins to Improve Thermal Stability at Neutral pH***.Tesis doctoral,North California State University.

Sernka T.,Acobson E. (1981).***Fundamentos de fisiología gastrointestinal***.Reverte.

S. Surgio, A. Kashima, S. Mchizuki, M. Noda, M. Kobayashi, Crystal structure of human serum Albumin at 2.5 Å resolution, Protein Engineering, 12 (1999) 439-446.

Tsuru, T., Shutou, T., Nakao, S.L., and Kimura S., (1994). ***Peptide and amino acid separation with nanofiltration membranes***, Separation Science and Technology, 29 (8), 971-984.

Muro C., Álvarez R., Riera-Rodríguez F., Arana A. and Téllez A.,(2011).***Production and functionality os active peptides from milk***.Food Science and Technology International,17,293-317.

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

