

Fraccionamiento Campo-Flujo aplicado al análisis de proteínas

Joseantonio Godoy,^{*,1} Judith Jaimez,¹ Ana María Botana²

¹ Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Carr. Pachuca-Tulancingo Km. 4.5, Pachuca, Hgo. México. Tel. 771-7172000 ext. 6501. jgodoy@uaeh.reduaeh.mx

² Universidad de Santiago de Compostela. Campus Lugo. Lugo, España.

Resumen. La técnica de Fraccionamiento Campo-Flujo (FFF) ha experimentado un gran crecimiento en los últimos años aplicándose a diversas áreas analíticas. La detección mediante Luz Láser Dispersada (MALLS) se muestra como uno de los pocos métodos absolutos de caracterización que acoplado a un sistema de separación constituyen una poderosa herramienta para el análisis. Se presenta un panorama general de las bases teóricas y experimentales de la FFF. Se exponen los resultados obtenidos en el análisis de muestras de suero de queso y requesón.

Palabras clave: Fraccionamiento Campo-Flujo, proteínas, suero de queso

Abstract. The Field Flow-Fractionation (FFF) technique has experienced a great development in the last years and has being applied to diverse analytical areas. The detection system by Light Scattering (MALLS) is one of the few absolute methods of characterization, which coupled to a separation system constitutes a powerful tool in the analytical area. In this work, a general panorama of the theoretical and experimental basis of the FFF technique are given. We present the results obtained in the analysis of cheese whey samples.

Key words: Field Flow Fractionation, proteins, cheese whey

Introducción

La idea básica de la técnica de Fraccionamiento Campo-Flujo (Field-Flow Fractionation, FFF) surgió en 1966 con la comunicación hecha por Giddings [1], en la cual describe un nuevo concepto de fraccionamiento. La aplicación de este concepto a macromoléculas es de especial interés puesto que estos materiales son difíciles de separar cromatográficamente, lo anterior es debido a que muestran una precaria distribución y un equilibrio lento entre las dos fases en la separación cromatográfica. Las técnicas basadas en la cromatografía por exclusión de tamaños (SEC) son las que se han utilizado más ampliamente para la caracterización de materiales poliméricos, dado que esencialmente proporcionan información acerca del tamaño molecular y la distribución de la muestra en el disolvente elegido para el análisis. No obstante la amplia variedad de aplicaciones de estas técnicas, tienen algunos inconvenientes como la limitación en cuanto al rango de masas moleculares que se pueden resolver mediante una columna SEC determinada. Otro inconveniente encontrado son las altas presiones a las que son sometidas las moléculas a su paso a través de estas columnas, lo que origina cierta degradación de los polímeros, estudios realizados en un canal de FFF utilizando muestras de 2×10^7 gmol⁻¹ mostraron que el proceso es esencialmente no destructivo [2].

Desde que la técnica de Fraccionamiento Campo-Flujo fue desarrollada [1], se han investigado una variedad de subtécnicas las cuales difieren entre ellas en la naturaleza del campo aplicado para fraccionar los solutos (macromoléculas) [3-5]. La subtécnica Flow FFF (FFFF) es la más universal de todas las técnicas de FFF y puede ser aplicada a partículas dispersas o solubles dentro de las que se encuentran las proteínas [6-10]. La separación por FFFF está basada en el coeficiente

de difusión D de las muestras [11], la separación obtenida por FFFF abarca un amplio rango en masas moleculares desde $\sim 10^4$ hasta $\sim 10^{12}$ (gmol⁻¹) y solamente requiere que la muestra sea soluble o esté dispersa en la fase móvil [12].

Para el fraccionamiento y análisis de proteínas en la leche se han empleado una variedad de técnicas de las cuales las más comunes han sido electroforesis [13-18] y HPLC [18-21]. Para el análisis de productos lácteos por medio de FFF se han empleado principalmente las subtécnicas de flujo [22-24] y sedimentación [23-27], de los trabajos referidos se han estudiado principalmente las micelas de las caseínas en diferentes tipos de muestra como son leche desnatada, crema, leche en polvo, helado, y extractos proteicos de caseína, en este trabajo se realiza un análisis de diferentes muestras de suero de queso y requesón liofilizadas, obtenidas después de una serie de filtrados y con las cuales se estudiará el fraccionamiento obtenido con la columna de FFFF y la detección con un sistema multiangular de luz láser (MALLS), con la finalidad de caracterizar las muestras eluyentes.

Un método absoluto para determinar pesos moleculares es aquel que no requiere el uso de polímeros estándares para realizar una recta de calibrado. Uno de los pocos métodos absolutos para cuantificar masas molares es la técnica de Dispersión Multiangular de Luz Láser (Multiangle Laser Light Scattering, MALLS), la cual abarca un amplio rango de detección en masas molares [28]. Sin embargo, esta técnica requiere la separación de las especies a analizar, si existe una mezcla de moléculas, el resultado será el promedio del peso molecular M_w de las especies presentes [29].

Entonces, con el acoplamiento de una técnica de separación como la FFFF con un detector MALLS se obtiene una herramienta poderosa para la separación e identificación de una gran variedad de compuestos.

Teoría

El mecanismo de separación de la técnica FFF es fundamentalmente cromatográfico, sin embargo, técnicamente hablando no pertenece a este tipo de separaciones [30] debido a que el efecto de partición ocurre en una sola fase, no en dos como en la cromatografía.

La técnica FFF es un método de separación donde los solutos son fraccionados al pasar por un canal; sin embargo, no existe una fase estacionaria que cause la retención y separación de las moléculas. Dicha separación se lleva a cabo en un canal sin relleno mediante una fuerza externa aplicada [31], que es la única responsable de dicho fraccionamiento. El término “columna” empleado en cromatografía, se sustituye aquí por el de “canal”, debido a la geometría característica del mismo [32].

La Fig. 1 muestra una vista lateral del canal empleado, en el cual se mueve un flujo laminar con un perfil de tipo parabólico.

Si se inyectan diferentes tipos de moléculas o partículas en un canal abierto y solamente se aplica un flujo unidireccional a lo largo del mismo, se puede esperar una separación pequeña o nula de las especies debido a la ausencia de fuerzas que induzcan la migración diferencial de las moléculas. Sin embargo, todo esto cambia si se aplica una fuerza que provoque el fraccionamiento de las especies. El objetivo de aplicar dicha fuerza, denominada aquí *campo*, es dirigir a las diferentes partículas o macromoléculas a diferentes posiciones en el flujo parabólico, de forma que sean eluidas a diferentes velocidades y salgan así a diferentes tiempos del canal.

La mayoría de los canales en FFF son estructuras estrechas en forma de cinta como lo muestra la Fig. 2. El flujo parabólico necesario se encuentra situado entre las paredes superior e inferior del canal; la pared inferior se denomina *pared de acumulación* puesto que es ahí donde se depositan las partículas que posteriormente serán separadas.

Tan pronto como la muestra entra al canal de FFF queda expuesta al campo y es forzada a moverse hacia la pared de acumulación para minimizar su energía potencial. Adquiere así un estado estable de velocidad U , proporcional a la fuerza

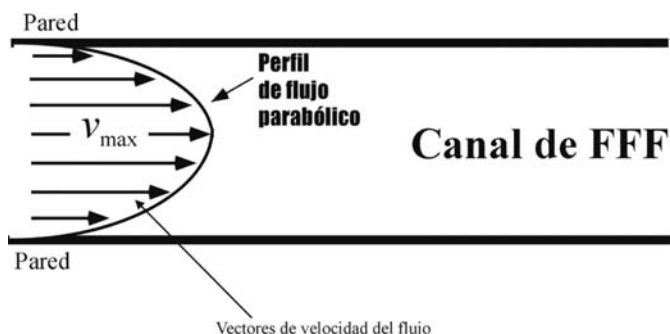


Fig. 1. Vista transversal de un canal de Fraccionamiento Campo-Flujo.

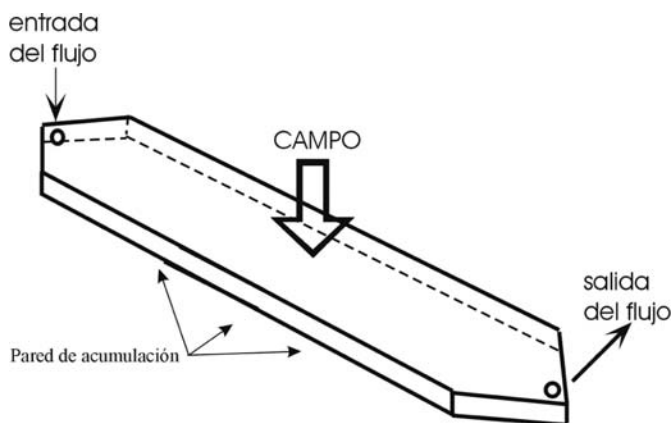


Fig 2. Vista de un canal típico empleado en FFF.

de interacción con el campo aplicado. Puesto que la muestra es incapaz de atravesar la pared de acumulación, comienza a concentrarse sobre la misma hasta alcanzar un equilibrio de distribución. La capa formada tiene una distribución de concentración de tipo exponencial, cuyo grosor viene determinado por la fuerza del campo y por el coeficiente de difusión D de la muestra.

La siguiente ecuación muestra la citada distribución de concentración:

$$c = c_0 e^{-x/l} \tag{1}$$

donde c representa la concentración a una distancia x de la pared de acumulación; c_0 es la concentración en la pared cuando $x=0$ y l es el grosor promedio de la capa formada [2]. La Fig. 3 es una representación esquemática de la formación exponencial de la capa de soluto. El grosor de la capa representado por el parámetro l viene definido por:

$$l = \frac{D}{U} \tag{2}$$

Esta ecuación muestra cómo l se establece como un balance entre dos influencias que se neutralizan mutuamente: el proceso de difusión ($D =$ coeficiente de difusión), el cual tiende a incrementar l y el movimiento de la partícula hacia la pared. Puesto que las diferentes especies tienen diferentes valores de U y D , cada una tendrá un valor dado de l , lo que origina que estén situadas en distintas secciones del flujo y sean eluidas a diferentes velocidades como ya se ha mencionado anteriormente.

Para relacionar matemáticamente la teoría y la experimentación [33], se introdujo el parámetro de retención λ el cual es esencialmente una forma adimensional de l :

$$\lambda = \frac{l}{w} = \frac{D}{Uw} \tag{3}$$

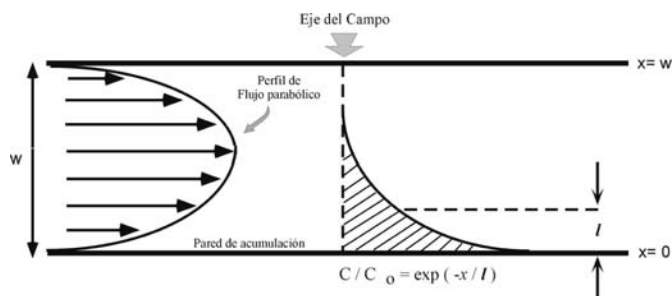


Fig. 3. Formación exponencial de la capa.

donde w es el grosor del canal. Puesto que l está relacionada con el grosor de la capa, y dicho grosor determina la separación, l es el parámetro fundamental más importante en FFF.

Si se utiliza la relación existente entre U y la fuerza del campo F como muestra la siguiente ecuación:

$$U = \frac{F}{f} \tag{4}$$

donde f es el coeficiente de fricción molar, y la ecuación de Stokes-Einstein para el coeficiente de difusión D :

$$D = \frac{kT}{f} \tag{5}$$

donde k es la constante de Boltzman, y T es la temperatura absoluta, al sustituir las Ecs. 4 y 5 en la Ec. 3 se obtiene la siguiente expresión para el parámetro de retención:

$$\lambda = \frac{kT}{Fw} \tag{6}$$

Esta ecuación muestra que l es la relación adimensional entre dos energías: la energía térmica kT y la energía utilizada en mover una partícula a través del grosor del canal w .

Combinando la Ec. 3 y la Ec. 6 se obtiene que el grosor promedio de la capa l viene representado por:

$$l = \frac{kT}{F} \tag{7}$$

Esta ecuación muestra que el valor de l perteneciente a cualquier especie, es inversamente proporcional a la fuerza de interacción de dichas especies con el campo aplicado: por lo tanto, diferentes fuerzas actuantes darán como resultado diferentes grosores de capa para las distintas especies (Fig. 4).

El movimiento de las especies a lo largo del canal está caracterizado por la relación de retención R , la cual podemos expresar mediante [34]:

$$R = \frac{6l}{w} \left[\coth(w/2l) - (2l/w) \right] \tag{8}$$

Por consiguiente, la retención está controlada exclusivamente por la relación existente entre el grosor de la capa l y el del canal w . La Ec. 8 puede expresarse en términos de l :

$$R = 6\lambda \left[\coth\left(\frac{l}{2\lambda}\right) - 2\lambda \right] \tag{9}$$

El término que aparece dentro de los corchetes se aproxima rápidamente a la unidad cuando el valor de l decrece, por lo tanto para muchas aplicaciones donde se tienen campos altamente interactivos, la retención se reduce a la sencilla ecuación:

$$R = 6\lambda \tag{10}$$

Experimentalmente el valor de R se obtiene mediante la medición de los volúmenes de retención V_r , o mediante los tiempos de retención t_r de las especies:

$$R = \frac{t^0}{t_r} = \frac{V^0}{V_r} \tag{11}$$

V^0 (volumen muerto) y t^0 (tiempo muerto) son calculados a partir de compuestos no retenidos mediante la siguiente ecuación:

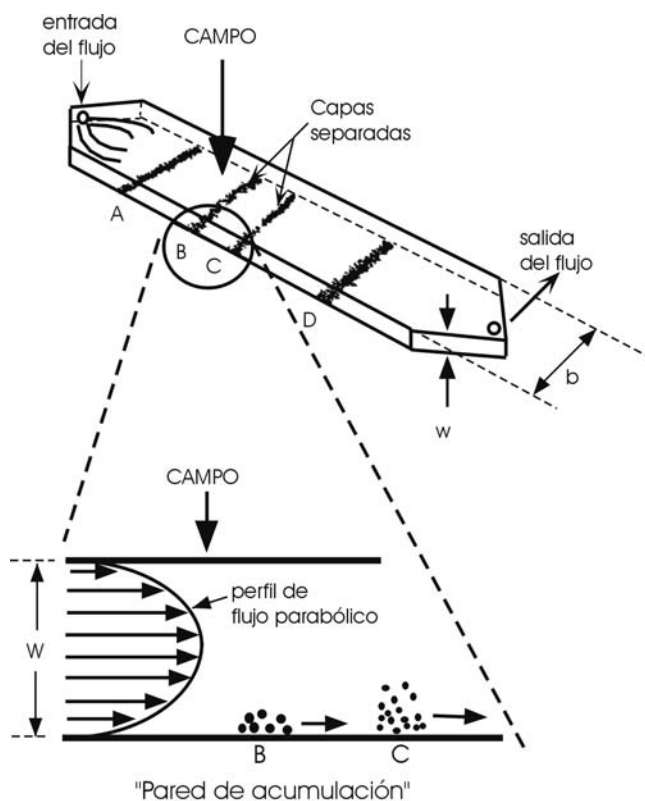


Fig. 4. Esquema de la separación llevada a cabo en un canal de FFF.

$$t^0 = \frac{V^0}{V} \quad (12)$$

donde V es el flujo a lo largo del canal.

En la subtécnica FFFF se puede relacionar el valor del tiempo de retención obtenido experimentalmente con el coeficiente de difusión mediante:

$$t_r = \frac{w^2}{6D} \cdot \frac{V_c}{V} \quad (13)$$

Esta igualdad muestra que el tiempo de retención bajo condiciones normales es inversamente proporcional al coeficiente de difusión D , y también que puede ser modificado mediante cambios en las relaciones del flujo V y del campo V_c .

Si se utiliza la ecuación de Stokes-Einstein (Ec. 5), la Ec. 13 permite observar la relación entre el tiempo de retención t_r y el coeficiente de fricción f mediante:

$$t_r = \frac{w^2 f}{6kT} \cdot \frac{V_c}{V} \quad (14)$$

Se sabe además que la ley de Stokes relaciona f con el diámetro de Stokes (o diámetro hidrodinámico) d de la molécula o partícula mediante:

$$f = 3\pi\eta d \quad (15)$$

donde η es la viscosidad de la fase móvil; a partir de aquí se puede obtener la relación existente entre el tiempo de retención t_r y el diámetro d de la partícula por medio de:

$$t_r = \frac{\pi\eta w^2}{2kT} \cdot \frac{V_c}{V} \cdot d \quad (16)$$

Esta expresión demuestra que t_r es directamente proporcional a d bajo prácticamente la mayoría de las condiciones de operación.

Se han obtenido así las relaciones existentes entre el tiempo de retención y las propiedades fundamentales de transporte, es decir: el coeficiente de difusión D (Ec. 13), el coeficiente de fricción f (Ec. 14) y el diámetro hidrodinámico d (Ec. 16), lo que permitirá conocer dichas propiedades a partir de valores experimentales de t_r .

Parte Experimental

Reactivos utilizados para las fases móviles, patrones y tensioactivos.

- *Fases móviles:*
 - Agua ultra pura calidad Milli-Q (Millipore)
 - Na_2HPO_4 (Panreac, P. A.)
 - NaH_2PO_4 (Panreac, P. A.)
 - NaCl (Panreac, P. A.)
 - Azida sódica (Sigma)
- *Proteínas:*
 - α -quimotripsinógeno A (Sigma)
 - Albúmina de suero bovino, BSA (Sigma)
 - Aldolasa (Sigma)
 - Ferritina (Sigma)
 - Proteína de suero de queso y requesón liofilizadas.

Preparación de disoluciones.

- *Disolución tampón de fosfato*

La disolución tampón de fosfato se preparó con los siguientes reactivos en la concentración indicada:

- Na_2HPO_4 0.01M
- NaH_2PO_4 0.01 M
- NaCl 0.13 M

Se ajustó el pH a los niveles deseados utilizando HCl o NaOH 0.1 M. También se le añadió azida sódica a una concentración de 0.20 g/L, que actúa como bactericida. Una vez preparado el tampón, se filtró utilizando un filtro de poro 0.1 mm (Whatman Anodisc 47).

Equipo utilizado.

- *Acoplamiento FFFF-MALLS*

La separación por FFFF se realizó con un equipo de las siguientes características:

- Fraccionador universal, FFFractionation, LLC., modelo FO-1000.
- Membrana de celulosa regenerada Schleicher & Schuell, tamaño de poro 10 000 Dalton.
- Dimensiones del canal:
 - largo 29.40 cm (punta a punta)
 - ancho 2.00 cm
 - grosor 0.22 mm
- Válvula de inyección Rheodyne, con un asa de 20 ml.
- 2 válvulas de paso eléctricas de dos posiciones, Valco Instr., modelo E.36220.
- Programa utilizado para el control de las válvulas eléctricas: Flow 160, FFFractionation, LLC.
- Sistema de bombeo: dos bombas Shimadzu, modelo LC-10 AD
- Desgasificador en línea Gastorr, modelo 154.
- Sistema de detección principal: fotómetro multiangular de dispersión de luz de rayo láser, Wyatt Technology, modelo DAWN DSP.

- Programa utilizado para el detector de dispersión de luz (adquisición y procesamiento de datos): ASTRA versión 4.50, Wyatt Technology.
- Sistema de detección auxiliar 1: detector de índice de refracción diferencial, Beckman, modelo 156.
- Sistema de detección auxiliar 2: detector ultravioleta, Kontron Instruments, modelo 430.
- Programa utilizado para el procesamiento de datos (áreas de los picos): FFF Analysis versión 1.01, FFFractionation, LLC.
- Bomba de jeringa Harvard Apparatus, Cat. No. 55-1111.

Una configuración esquemática del sistema se muestra en la Fig. 5.

Como se puede observar en la Fig. 5, después del canal de fraccionamiento se coloca el detector ultravioleta (UV), a continuación el detector de dispersión de luz láser (MALLS), y al final el detector de índice de refracción (RI). Este orden de conexiones minimiza el ensanchamiento de los picos, y protege la frágil celda del detector RI de posibles daños debidos a altas presiones. El canal de fraccionamiento se utilizó con la opción de "frit-outlet" para regular los flujos, prevenir una presión elevada en la membrana y concentrar la muestra para conseguir una mejor detección.

La opción de "frit-outlet" está diseñada para que una parte del flujo se desvíe y salga por una porción porosa colocada al final del mismo. De esta forma éste se divide en dos porciones: una que lleva los componentes eluidos, y otra que constituye lo que sale a través de dicha porción porosa. En este trabajo el caudal del "frit-outlet" (V_{fo}) se estableció en el 50% del flujo longitudinal, y para ello se tomó como criterio, además de la obtención de una buena resolución e intensidad de los picos, el manejo de unos niveles de presión dentro del canal menores de 70 psi, que es lo recomendado por el fabri-

cante de la membrana para un buen funcionamiento de la misma.

Resultados y discusión

a) Utilizando patrones de proteínas

La metodología seguida en este trabajo comenzó por la selección de la fase móvil adecuada para la separación de un conjunto de proteínas, así como la optimización de dicha separación. Para todo esto inicialmente se dispuso solamente del detector MALLS y no se realizaron por tanto cálculos de pesos moleculares, ya que no era el objetivo de esta primera etapa.

Se trabajó con un patrón de BSA, dado que esta proteína sirve como modelo para llevar a cabo algunas optimizaciones en la consecución de resultados que deben ser obtenidos, según el fabricante del detector de dispersión de luz.

Se comenzó empleando una fase móvil a base de una disolución tampón de fosfato (PBS), con un pH de 7.4 y utilizando SDS al 0.01% como tensioactivo. La razón de comenzar con esta fase está basada en resultados anteriores que fueron encontrados en la bibliografía [35-37].

Para el flujo del canal se ensayaron valores desde 0.5 mL/min hasta 2.5 mL/min, y para el campo desde 0.5 mL/min hasta 5.0 mL/min. Los mejores resultados se obtuvieron con la combinación: $V = 2.0$ mL/min y $V_c = 4.0$ mL/min. Se inyectó BSA en una concentración de 10.00 g/L y el resultado se muestra en la Fig. 6. El pico tiene una baja intensidad, además de observarse una línea base con un valor alto de voltaje (el fabricante recomienda un valor menor a 0.2V).

Debido a ello se probaron otras concentraciones del tensioactivo añadido: 0.02%, 0.08% y 0.17%. También se ensa-

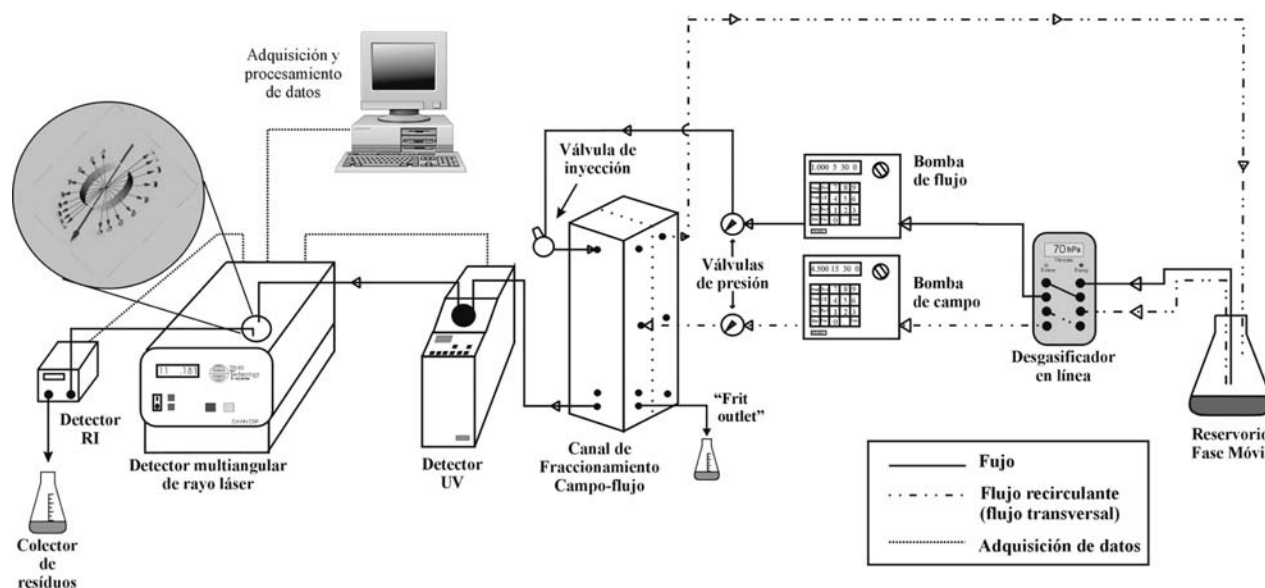


Fig. 5. Diagrama del equipo FFFF-MALLS.

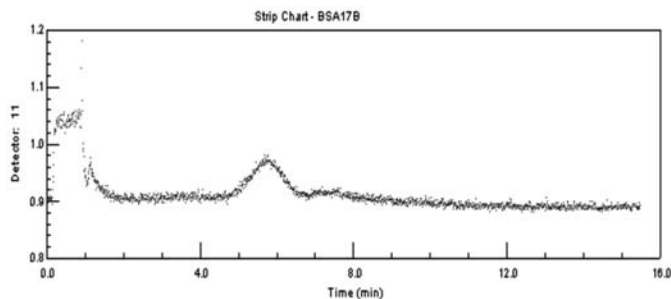


Fig. 6. Inyección de BSA. $V = 2.0$ mL/min, $V_c = 4.0$ mL/min. Fase móvil: PBS, pH= 7.4; SDS 0.01%.

yaron diversas combinaciones del flujo y del campo con cada concentración, pero los resultados fueron infructuosos. Buscando una mejoría en la señal se intentó modificar la composición de la fase móvil, así como su concentración y pH.

Se regresó a la fase móvil de PBS sin adición de tensioactivos, con la que se obtuvieron mejores resultados variando el pH de la misma. Los valores de pH ensayados fueron: 4.5, 5.5, 6.7, 7.4, 8.5, 10.3. Al igual que en los casos anteriores, en cada valor de pH se ensayaron diferentes flujos. El mejor resultado se obtuvo con un pH de 6.7. La intensidad del pico para el monómero de BSA es buena y también se ve su agregado. La Fig. 7 muestra el resultado de la inyección.

En cuanto al uso de una disolución reguladora, es sabido que éstas se utilizan en el análisis de proteínas con la finalidad de proporcionar un medio adecuado para evitar su desnaturalización. En el caso concreto del PBS, tiene la particularidad de ofrecer un amplio rango de pH dentro del cual puede ser utilizada (pH = 2-12), además de ser transparente a la radiación ultravioleta [38] lo que la hace adecuada para un elevado número de proteínas.

Esta disolución tiene una elevada concentración de NaCl, con la finalidad de proporcionar la fuerza iónica necesaria para tratar de disminuir las interacciones electrostáticas [39] entre las proteínas y la membrana y así evitar su adsorción. Por una parte la elevada concentración de compuestos catiónicos del medio, como los iones sodio, compiten con las proteínas por los lugares de adsorción [40] sobre la membrana. Por otro lado, la presencia de sales cumple la importante función

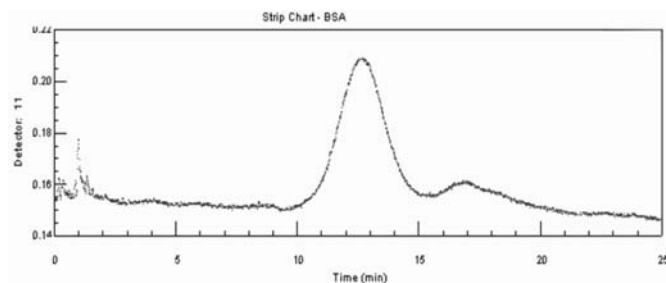


Fig. 7. Inyección de BSA. $V = 1.0$ mL/min, $V_c = 5.0$ mL/min. Fase móvil: PBS, pH= 6.7.

de evitar las interacciones proteína-proteína, que pueden dar lugar a un ensanchamiento de los picos [41].

En el caso de la proteína BSA, con la que se han hecho los ensayos, debido a que tiene carga negativa tiende a ser repelida electrostáticamente de la membrana de celulosa, por la presencia en la misma de grupos hidroxilo. Cuando este factor se añade a la fuerza iónica del medio, el efecto se ve potenciado.

En cuanto a la utilización de SDS, entra dentro de las estrategias empleadas en el análisis de estos compuestos para evitar su adsorción. En las inyecciones realizadas adicionando el tensioactivo a diferentes concentraciones, no se obtuvieron resultados aceptables puesto que se observó inestabilidad en la línea base al aumentar su concentración. Al tratarse de un tensioactivo aniónico, impartirá una fuerte carga a la proteína (en este caso BSA) llegando a desnaturalizarla, lo que representa una dificultad adicional para su posterior caracterización.

Finalmente, la fase móvil de PBS escogida y el pH seleccionados (6.7) permiten trabajar en condiciones casi neutrales y con una fuerza iónica elevada, condiciones adecuadas para una amplia variedad de proteínas si atendemos a sus puntos isoeléctricos.

Se escogieron como compuestos de trabajo los siguientes patrones: α -quimotripsinógeno A (Mw 25000), BSA (Mw 67000), aldolasa (Mw 158000) y ferritina (Mw 453000), tratando de abarcar un amplio intervalo de pesos moleculares.

Los flujos empleados fueron: $V = 1.0$ mL/min y $V_c = 4.5$ mL/min. Se hicieron inyecciones utilizando un $V_c = 5.0$ mL/min, pero no se observó mejoría notable en la resolución. La Fig. 8 muestra el resultado del fraccionamiento de la mezcla utilizada.

La concentración de las tres primeras proteínas mencionadas fue de 3.08 g/L, mientras que la ferritina se inyectó a 0.77 g/L debido a su gran tamaño, dado que al elevar la concentración comienza a solapar con los picos adyacentes.

La mezcla de proteínas que se ha conseguido separar aquí es bastante heterogénea y se propone para estudiar y desarrollar una metodología adecuada con la instrumentación de que se dispone, para aplicarla por supuesto a compuestos proteicos de naturaleza variada y no necesariamente cuando se encuentren única y exclusivamente estas especies. En el conjunto de proteínas que se proponen como modelo de estudio hay una

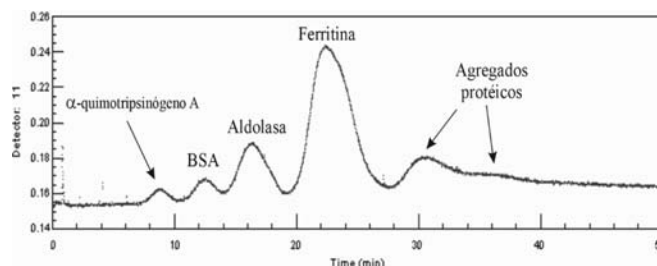


Fig. 8. Fractograma de la mezcla de proteínas. $V = 1.0$ mL/min, $V_c = 4.5$ mL/min

variedad grande en cuanto a sus pI , desde valores altos ($pI = 9.6$) hasta valores bastante bajos ($pI = 4.0$), por lo que se puede observar su comportamiento y la facilidad para su caracterización al utilizar una fase móvil con un pH prácticamente neutro.

b) Aplicación a muestras de suero de queso y requesón

Las muestras analizadas en este trabajo comprenden suero de leche, suero liofilizado de queso y suero liofilizado de requesón.

A continuación se presenta una breve descripción de la preparación y filtrados que se hicieron a las muestras de suero de queso y requesón, así como de la nomenclatura utilizada para este trabajo.

Las muestras de suero de queso y requesón, después de precipitación térmica de las proteínas, se desnataron y se ajustó el contenido en calcio a 1.2 g/L, el pH se ajustó a 7.3-7.5 y la temperatura se elevó rápidamente a 50° C y se mantuvo por espacio de 8 minutos como lo describió Maubois y col. [42]; finalmente, se enfrió hasta 4-6° C y se mantuvo así durante la noche antes de proceder al microfiltrado.

Aproximadamente 100 L del producto se dividió en dos partes, una para ultrafiltración convencional (UF) y el resto para microfiltración (MF), seguido de UF y diafiltración (DF). Las muestras de requesón incluyen el prefijo "Dep" para distinguirlas de las provenientes de suero sin desproteinizar.

El procedimiento de ultrafiltración se realizó con una membrana cuyo tamaño de poro era de 35000 g/mol. El retenido de la UF se liofilizó y este liofilizado se denominará RUF; el RUF proveniente del requesón será llamado Dep-RUF para distinguirlo del proveniente de suero de queso (RUF).

El procedimiento de microfiltración se realizó con dos tipos de membrana que se diferencian en el tamaño de poro: una se realizó a 0.20 μm y la otra a 0.65 μm . El retenido de la microfiltración se liofilizó y esta muestra se denominará RMF (RMF 0.20 y RMF 0.65 dependiendo del tamaño de poro utilizado); los RMF provenientes del requesón se denominarán Dep-RMF 0.20 y Dep-RMF 0.65 respectivamente, dependiendo del tamaño de poro utilizado para la microfiltración.

Los filtrados provenientes del paso anterior (MF) fueron sometidos a una ultrafiltración. El retenido de este procedimiento fue liofilizado y estas muestras se denominarán FMFDF 0.20 y FMFDF 0.65; asimismo las muestras de requesón se denominarán Dep-FMFDF 0.20 y Dep-FMFDF 0.65.

Para llevar a cabo la separación de las proteínas mediante FFFF, los flujos aplicados fueron seleccionados a partir de inyecciones previas para las proteínas en suero de leche.

Manteniendo V constante (1 mL/min) y variando el campo entre $V_c = 2.5$ mL/min y $V_c = 3.5$ mL/min se obtienen los fractogramas que muestra la Fig. 9. Como puede observarse, utilizando un campo de $V_c = 2.5$ mL/min, hay un ligero solapamiento entre los dos primeros picos (Fig. 9 a). El fractograma en el que $V_c = 3.0$ mL/min muestra una mejor resolución de los picos eluyentes (Fig. 9 b) y con el campo $V_c = 3.5$

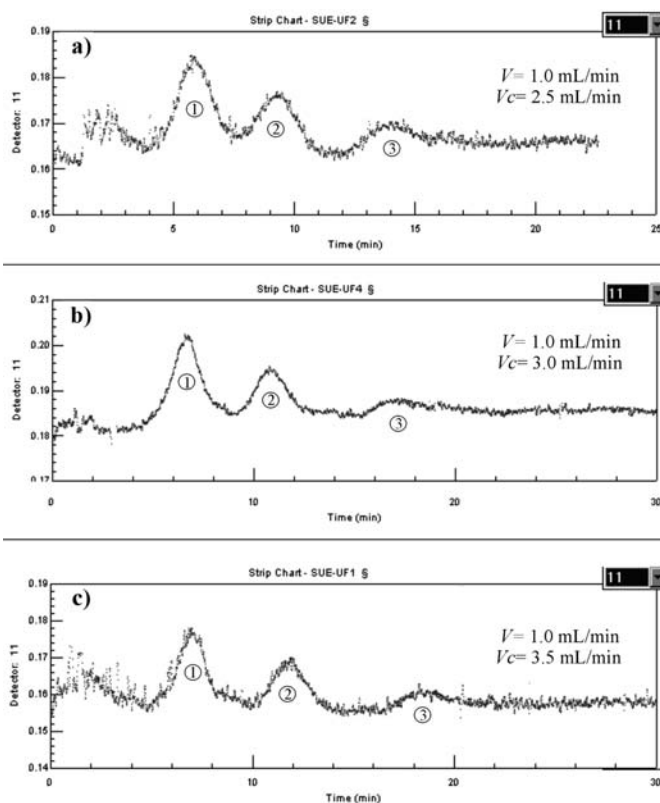


Fig. 9. Fractogramas de proteínas lácteas, obtenidos utilizando diferentes campos.

mL/min la separación mejora pero hay una disminución en la intensidad de los mismos (Fig. 9 c). Se decidió realizar las inyecciones utilizando un $V = 1.0$ mL/min y un $V_c = 3.0$ mL/min, para tener una buena resolución sin sacrificar la intensidad obtenida.

Se ensayaron diferentes concentraciones de las muestras con el fin de establecer cuál es la más adecuada, desde el punto de vista tanto de la intensidad de la señal como de evitar una saturación de la membrana y del detector. Para ello se probaron 10, 20 y 40 mg/mL del liofilizado.

La concentración de 10 mg/mL proporciona una señal débil, que se incrementa considerablemente cuando es de 20 mg/mL. Al aumentar la concentración hasta 40 mg/mL la señal solamente mejora en unos cuantos milivoltios, no siendo este aumento significativo respecto a la concentración anterior. Se decide por consiguiente inyectar las muestras a concentraciones de 20 mg/mL, tratando asimismo de prevenir una sobrecarga del canal y por tanto un ensanchamiento de los picos. Los resultados obtenidos para las muestras de suero de queso y requesón se presentan a continuación.

Los fractogramas varían de acuerdo con el tratamiento y tipo de filtrado al que se sometieron las diferentes muestras, debido a la mayor o menor presencia de proteínas. Las Figs. 10 a 13 muestran los resultados de los diferentes tipos de muestras inyectadas:

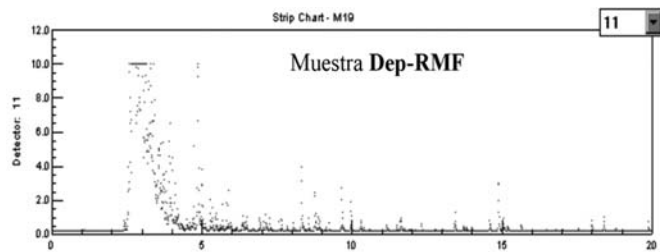


Fig. 10. Perfil de elución de una muestra de suero de requesón desnaturalizada.

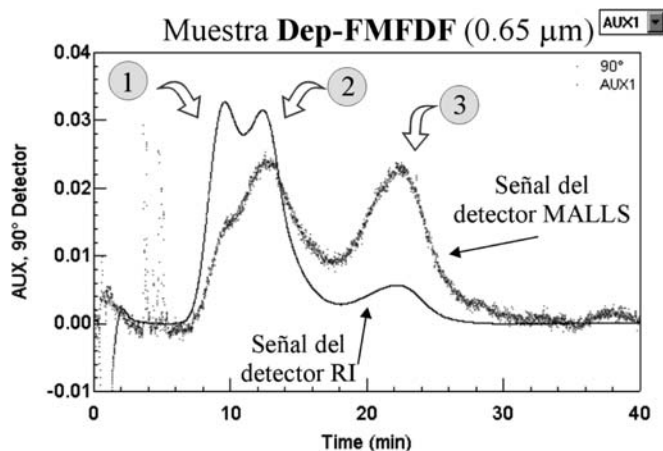


Fig. 11. Fractograma de una muestra de suero de requesón.

Tabla I. Resultados de la separación protéica en muestras de requesón.

Muestra	Observaciones
Dep-RUF	Señal muy débil para un solo pico. Probable desnaturalización.
Dep-RMF 0.20	Saturación del detector. Probable desnaturalización.
Dep-RMF 0.65	Saturación del detector. Probable desnaturalización.
Dep-FMFDF 0.20	Señal muy débil para un solo pico. Probable desnaturalización.
Dep-FMFDF 0.65	Fractograma con los dos primeros picos solapados. Existe también un tercer pico, resuelto con respecto a los dos anteriores.

Suero de requesón. Dentro de este grupo se encuentran las siguientes: Dep-RUF, Dep-RMF 0.20 y 0.65, Dep-FMFDF 0.20 y 0.65.

Las muestras Dep-RMF 0.20 y 0.65 muestran un comportamiento similar entre sí. La desnaturalización de las proteínas es evidente debido a la saturación observada en la señal

del detector y a la suciedad existente a lo largo de la elución (Fig. 10).

Las muestras provenientes de Dep-FMFDF 0.20 y Dep-RUF muestran una señal muy débil para un solo pico y también se observa a lo largo de la inyección la presencia de mucha suciedad (no se muestran los fractogramas).

Los resultados obtenidos para las muestras Dep-FMFDF 0.65 presentan un solapamiento de los dos primeros picos. Para tratar de resolver este solapamiento se ensayaron diferentes valores en los flujos (V y V_c). Los mejores resultados se obtuvieron con $V = 0.7$ mL/min y $V_c = 3.5$ mL/min como lo muestra la Fig. 11; sin embargo los picos no están completamente separados y aplicando un mayor V_c la señal decrece en intensidad rápidamente y no se logra mejorar la resolución.

La Tabla I resume los resultados obtenidos para la separación de muestras de requesón: a la vista de ellos parece que debido al tratamiento térmico recibido para precipitar las proteínas antes de la filtración, éstas han sufrido desnaturalización excepto en el caso de Dep-FMFDF 0.65 la cual presenta picos a diferencia de Dep-FMFDF 0.20 probablemente por el mayor tamaño de poro utilizado durante la filtración que deja pasar mayor contenido proteico.

Suero de queso. Dentro de este grupo tenemos a las siguientes: RUF, RMF 0.20 y 0.65, FMFDF 0.20 y 0.65.

Las muestras RUF presentan fractogramas con una buena señal para los dos primeros picos y también se observa un tercer pico aunque más débil que los anteriores. La Fig. 12 muestra un fractograma correspondiente a este tipo de muestras.

Las inyecciones de los preparados FMFDF 0.20 (no se muestra el fractograma) dan como resultado la elución de dos picos bastante débiles. Estas inyecciones se repitieron empleando una concentración de 40 mg/mL, pero sólo aumenta en algunos milivoltios la señal siendo el segundo pico eluyente el menor de los dos. La Fig. 13 muestra una inyección de FMFDF 0.65 (a una concentración de 40 mg/mL) y se obtiene una mejoría en la señal, debida al mayor tamaño de poro, que aquella correspondiente a FMFDF 0.20. Se observa la elución de dos picos y un tercer pico muy débil que apenas se aprecia.

Analizando las muestras RMF 0.65 y RMF 0.20 e inyectando a una concentración de 20 mg/mL la señal obtenida es muy débil, por lo tanto para estas muestras se incrementó la concentración a 40 mg/mL aunque la señal continuó siendo débil (fractograma no mostrado). Se obtuvieron 3 picos eluyentes de los cuales el tercero apenas logró distinguirse.

La Tabla II esquematiza los resultados obtenidos para la separación de muestras de suero de queso.

La identificación de los picos en todas las muestras de suero de queso se realizó mediante el tiempo de retención, obteniéndose los mismos valores en todos los casos para los picos numerados como 1, 2 y 3. Así, en la Tabla III se recogen los resultados de calcular el coeficiente de difusión y diámetro mediante las ecuaciones 13 y 16, respectivamente. Se recogen

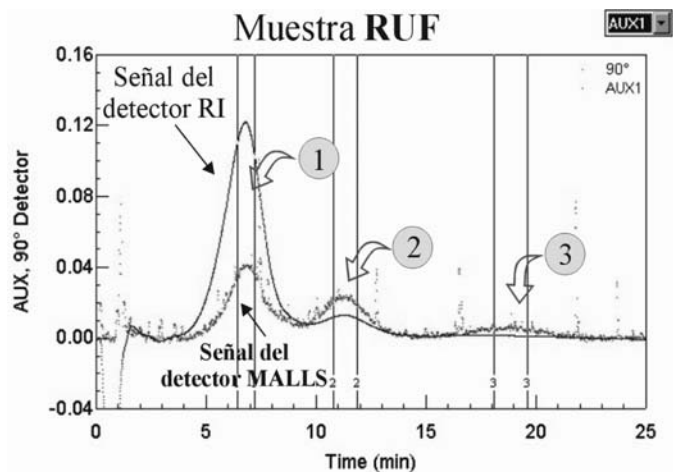


Fig. 12. Fractograma de una muestra de suero de queso ultrafiltrada.

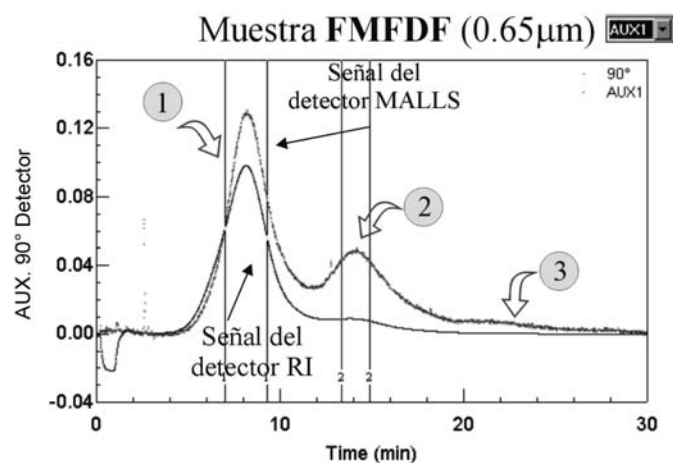


Fig. 13. Perfil de elución de una muestra de suero de queso proveniente de la microfiltración

Tabla II. Resultados de la separación proteica de suero de queso.

Muestra	Observaciones
RUF	Fractograma con tres picos: los dos primeros más intensos.
RMF 0.20	Elución de tres picos poco intensos, especialmente el tercero.
RMF 0.65	Elución de tres picos poco intensos, especialmente el tercero.
FMFDF 0.20	Fractograma con dos picos de poca intensidad.
FMFDF 0.65	Presencia de tres picos: el tercero poco intenso.

también los resultados correspondientes a la muestra de suero de quesosón.

La presencia de las proteínas varía de acuerdo con el tipo de muestra. Se observa que la utilización de diferentes membranas de filtrado condiciona la aparición de una mayor o menor cantidad de proteína.

Tabla III. Resultados para las muestras de suero de queso y quesosón.

Muestra		t_r (min)	$D \cdot 10^5$ (cm ² seg ⁻¹)	d (nm)
RUF, RMF ^a ,	Pico 1	6.5	3.99	5.8
	Pico 2	11.1	2.24	10.4
FMFDF ^a	Pico 3	17.2	1.42	16.5
Dep-FMFDF 0.65	Pico 1	9.5	4.41	5.3
	Pico 2	12.0	3.44	6.8
	Pico 3	22.6	1.78	13.1

^a Se incluyen ambos tipos de muestras: 0.20 y 0.65.

Tabla IV. Resultados de los pesos moleculares para las muestras de suero de queso y quesosón.

Tipo de muestra	Peso molecular		
	Pico 1	Pico 2	Pico 3
RUF	27 000	130 000	*
RMF 0.20 y 0.65	23 000	130 000	*
FMFDF 0.20 y 0.65	30 000	*	*
Dep-FMFDF 0.65	14 375	24 010	128 000

* Señal muy débil del detector RI

Utilizando un Detector Multiangular de Luz Láser, se obtiene el peso molecular de los compuestos que eluyen de acuerdo con la Tabla IV:

Pico 1: A la vista de los resultados obtenidos, se puede pensar que para el primer pico de las muestras RUF, RMF y FMFDF existe un solapamiento de dos proteínas: α -lactoalbúmina, de peso molecular 14180, y β -lactoglobulina cuyo dímero tiene un peso molecular de 36000. Para llegar a este resultado se realiza lo siguiente:

Si se representa gráficamente el peso molecular calculado frente al tiempo de retención (Fig. 14), se obtiene una línea con pendiente positiva que indica la inexistencia de compuestos monoméricos para el pico en cuestión. Existe sin embargo una mezcla de compuestos cuyos pesos moleculares varían desde aproximadamente 14000 hasta 39000. Esto confirma lo ya dicho y también se observa que mediante esta técnica de FFF de flujo, no es posible separar estas dos proteínas debido al tamaño que presentan, pero sí es posible identificarlas gracias a la información suministrada por el detector de dispersión de luz. Las variaciones que se muestran en los pesos moleculares obtenidos entre las muestras RUF, RMF y FMFDF para el primer pico, se pueden deber a la diferente concentración de ambas especies de acuerdo con el tipo de filtración al que fueron sometidos en cada caso.

Por otra parte, el peso molecular obtenido para las muestras Dep-FMFDF 0.65 indica la presencia de α -lactoalbúmina.

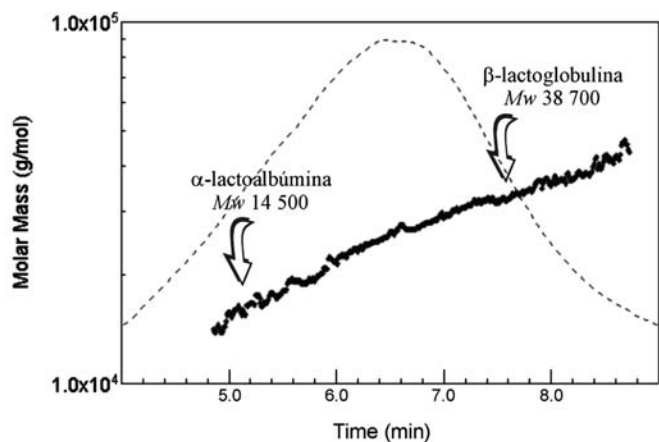


Fig. 14. Perfil de elución de masas moleculares en pico 1, se observa la variación en el peso molecular a lo largo del pico.

Pico 2: El peso molecular correspondiente al segundo pico, para las muestras RUF y RMF, es el resultado de la formación del dímero para las proteínas séricas. Esto es así dado que el valor numérico obtenido es el doble del peso correspondiente para el monómero y además no hay otras proteínas conocidas que se acerquen a dicho peso molecular.

En el caso de las muestra FMFDF 0.20 y 0.65, dado que la señal obtenida en el detector auxiliar es baja, no es posible cuantificar el peso molecular. Esto ocurre así porque es necesario disponer del valor de la concentración de la proteína y en este caso es muy pequeña, por lo que este cálculo se hace inviable.

Pico 3: La señal obtenida en el detector auxiliar de índice de refracción diferencial es muy débil, tanto para las muestras RUF, como RMF y FMFDF, por lo que no es posible el cálculo del peso molecular. Con el detector MALLS se observa una señal que, aunque pequeña, puede indicar la presencia de proteínas de masa alta. En el caso de la muestra Dep-FMFDF 0.65, se trata del dímero de las proteínas séricas siguiendo el mismo razonamiento que se hizo para el pico 2.

Por lo tanto, las proteínas encontradas en las muestras son las siguientes:

- Muestras RUF: en el pico 1, α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina; en el pico 2, dímero de BSA; en el pico 3, es posible que existan inmunoglobulinas o fosfolipoproteínas dado que en este tipo de muestras suelen encontrarse estos compuestos de elevado peso molecular.
- Muestras RMF: las proteínas encontradas son las mismas que las de las muestras RUF. La diferencia es que la señal observada es menos intensa.
- Muestras FMFDF: α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, ambas en el pico 1.
- Muestras Dep-FMFDF: α -lactoalbúmina en el pico 1, β -lactoglobulina en pico 2 y dímero de BSA en el pico 3.

Tabla V. Inyecciones para intentar cuantificar el peso molecular del tercer pico en una muestra RUF.

Inyección	V, mL/min	V _c , mL/min	V _c /V	M _w pico 3
1	1.0	3.0	3.0	238 100
2	1.0	2.0	2.0	773 400
3	1.0	1.5	1.5	522 600
4	1.0	1.7	1.7	249 900
5	0.5	1.0	2.0	671 700
6	0.5	1.5	3.0	485 400

Se intentó incrementar la intensidad de la señal para aquellas muestras en las que aparecía el tercer pico para poder caracterizarlo. La muestra elegida para ello fue del tipo RUF, debido a que se observa mejor este tercer pico que en los otros preparados. La concentración para las inyecciones fue de 40 mg/mL y se ensayaron diferentes combinaciones de V y V_c para tratar de lograr una mayor señal. La tabla V muestra las modificaciones de los flujos y los pesos moleculares obtenidos en cada caso. Las inyecciones se realizaron por triplicado.

A pesar de las pruebas realizadas, no se logró obtener una mejora en los resultados. Con un campo de 1.0 mL/min (inyección número 5) la señal del láser se incrementa ligeramente, pero la señal correspondiente al detector de índice de refracción es comparable al ruido en la línea base, por lo que presenta mucha variabilidad en los resultados. La situación anterior provoca las variaciones observadas en el peso molecular entre las distintas inyecciones, por lo que no fue posible llegar finalmente a un resultado válido.

Sin embargo, cuando se llevó a cabo este estudio se observó la elución de un cuarto pico utilizando un V= 0.5 mL/min y V_c = 1.0 mL/min. A pesar de que tampoco fue posible caracterizarlo debido a la baja intensidad de la señal (Fig. 15), esto confirma la presencia de proteínas de alto peso molecular, presentes en muy baja concentración.

Se puede observar en la tabla anterior, que de acuerdo con el tamaño del filtro empleado, se encuentra presente una mayor o menor cantidad de proteína y se puede resumir como sigue:

1. En los retenidos, el correspondiente a RUF tiene una mayor cantidad de materia que las otras muestras de suero de queso debido a que el tamaño de poro del filtro utilizado es menor.
2. Comparando los compuestos RMF, se observa que el correspondiente a 0.20 mm retiene una mayor cantidad de proteína que el de 0.65 mm, tanto para el pico 1 como para el 2, lo que nuevamente es debido al menor tamaño de poro que impide el paso de mayor contenido proteico.
3. El pico 1 en FMFDF 0.65 tiene la mayor cantidad presente comparándolo con cualquier otra muestra, dado que es el filtrado resultante de utilizar el mayor tamaño de poro. Por otra parte, en estos filtrados no se pudo cuantificar el pico 2, lo cual puede deberse a que la proteína BSA quedó retenida en los RMF debido a su mayor tamaño.

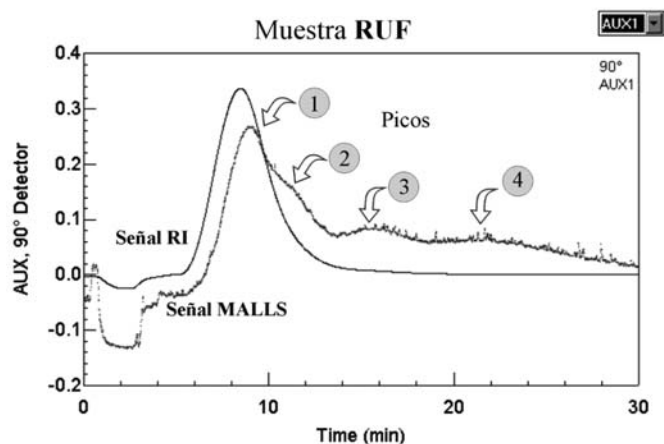


Fig. 15. Aparición de un cuarto pico modificando los flujos, $V = 0.5$ mL/min y $V_c = 1.0$ mL/min.

4. En el caso del Dep-FMFDF 0.65, la cantidad de β -lactoglobulina es mayor (pico 2) que la de α -lactoalbúmina (pico 1), lo cual puede ser debido a que en la leche naturalmente la cantidad de la primera es mayor que la de la segunda. Por tanto, este factor prevalece sobre el hecho de que la β -lactoglobulina sea una proteína de mayor tamaño y tenga menos facilidad para pasar a través de la membrana.

Mediante el acoplamiento FFFF-MALLS, se caracterizaron de manera exitosa las muestras estudiadas, a pesar de que las proteínas α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina no fueron separadas eluyendo ambas en un solo pico. En este caso, la gráfica de *masa molar vs. tiempo de elución* se utilizó para evaluar la presencia de más de un solo compuesto en el pico eluyente con resultados altamente satisfactorios. Esta es una de las ventajas que se tienen al realizar el análisis empleando un detector MALLS. Cabe mencionar además que todos los resultados se obtuvieron de manera absoluta, sin el empleo de rectas de calibrado con patrones puros. También fue posible confirmar la presencia de las proteínas séricas en forma de agregado, puesto que se muestra la elución de un solo tipo de compuestos en el pico observado, correspondiente al dímero de BSA. En este trabajo, se presenta también una muestra de la versatilidad de la técnica FFFF en cuanto a la capacidad de poder modificar la elución de los compuestos.

Conclusiones

La técnica FIFFF permite obtener separaciones de una mezcla de proteínas, que presentan diferentes características en cuanto a su peso molecular y punto isoeléctrico.

Mediante el acoplamiento FIFFF-UV-MALLS-RI es posible caracterizar las muestras estudiadas, a pesar de la adsorción que experimentan sobre la membrana. Se obtienen valores absolutos de pesos moleculares e información sobre su polidispersidad.

Se demuestra la versatilidad de la metodología empleada para aplicaciones a diversos campos como es el análisis de proteínas lácteas.

Referencias

- Giddings, J. C. *Sep. Sci.*, **1966**, *1*, 123.
- Caldwell, K. D. *Polymer analysis by Field-flow fractionation*, en Barth H. G. and Mays J. W. (editores), *Modern Methods of Polymer Characterization*, John Wiley & Sons, New York, **1991**.
- Giddings, J. C. *Chem. Eng. News* **1988**, *66*, 34.
- Giddings, J. C. *Unified Separation Science*, Wiley, New York, **1991**, *9*, 203.
- Giddings, J. C. *Science*, **1993**, *260*, 1455.
- Giddings, J. C.; Yang F.; Myers, M. N. *Anal. Biochem.* **1977**, *81*, 395.
- Liu, M-K and Li, P.; Giddings, J. C. *Protein Science* **1993**, *2*, 1520.
- Stevenson S. G.; Preston, K. R. *J. of Cereal Science* **1996**, *23*, 121.
- Stevenson S. G.; Preston, K. R. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **1997**, *20*, 2835.
- Song, J. H.; Kim, W-S.; Park, Y. H.; Yu, E. K.; Lee, D. W. Woon, D. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1999**, *20*, 1159.
- Giddings, J. C. *C & EN*, Special Report, **1988**, *34*.
- Kirkland, J. J. Dilks C. H. and Rementer, S. W. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1295.
- Miralles, B.; Rothbauer, V.; Manso, M. A.; Amigo, L.; Krause, I.; Ramos, M. *J. Chromatogr.* **2001**, *A 915*, 225.
- Galvani, M.; Hamdan, M.; Righetti, P. G.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 258.
- Miralles, B.; Bartolome, B.; Amigo, L.; Ramos, M. *J. Dairy Sci.* **2000**, *83*, 2759.
- Izco, J. M.; Torre, P.; Barcina, Y. *Alimentaria (Madrid)*, **1999**, *303*, 117.
- Valkonen, K. H.; Martinen, N.; Alatosava, T. *Milchwissenschaft* **2000**, *55*, 126.
- Norris, C. S.; Tsao, M.; Haggarty, N. W.; Otter, D. E. *Int. Dairy Fed. [Spec. Issue] S.I.* **1998**, *9804*, 123.
- Ferreira, I.; Mendes, E.; Ferreira, M. A. *Anal. Sci.* **2001**, *17*, 499.
- Bramanti, E.; Ferri, F.; Raspi, G.; Lampugnani, L.; Carla Spinetti, M.; Miller, K. E.; Synovec, R. E. *Talanta*, **2001**, *54*, 343.
- Trujillo, A.-J.; Casals, I.; Guamis, B. *J. Chromatogr.* **2000**, *A 870*, 371.
- Jussila, M. A.; Yohannes, G.; Riekkola, M.; *J. Microcolumn Sep.* **1997**, *9*, 601.
- Udabage, P.; Sharma, R.; Murphy, D.; Mckinnon, I.; Beckett, R. *J. Microcolumn Sep.* **1997**, *9*, 557.
- Granger, J.; Dodds, J.; *Sep. Sci. Technol.* **1992**, *27*, 1691.
- Caldwell, K. D.; Li, J.; Li, J. T.; Dalgleish, D. G.; *J. Chromatogr.* **1992**, *604*, 63.
- Mozerky, S. M.; Farrell, H. M., Jr.; Barford, R. A. *Sep. Sci. Technol.* **1991**, *26*, 1467.
- Mozerky, S. M.; Farrell, H. M.; Barford, R. A. *J. Dairy Sci.* **1991**, *74*, 2382.
- Wyatt, P. J. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *272*, 1.
- Astra for Windows User's Guide for the DAWN DSP & mini DAWN Light Scattering Instruments*, Ver. 4.50, Wyatt Tech. Corp., 1997.
- Giddings, J. C. *J. of Chrom.*, **1976**, *125(1)*, 3.
- Giddings, J. C.; Myers, M. N.; Caldwell K. D.; Fisher, S. R. *Methods Biochem. Anal.* **1980**, *26*, 79.

32. Giddings, J. C. *The Field-Flow Fractionation Family: Underlying Principles*, en M. E. Schimpf, K. D. Caldwell, J. C. Giddings (editores), *Field-Flow Fractionation Handbook*, John Wiley & Sons, New York, **2000**.
33. Giddings, J. C. *Sep. Sci. Technol.*, **1985**, *19*, 831.
34. Hoving, M. E.; Thompson, G. H.; Giddings, J. C. *Anal. Chem.*, **1970**, *42*, 195.
35. Thielking, H.; Kulicke, W-M *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1169.
36. Wihnhoven, J. E.; Koorn, J. P.; Poppe, H.; Kok, W. *J. of Chrom. A*, **1995**, *699*, 119.
37. Kim, W-S.; Park, Y. H.; Lee, D. W. *J. Liq. Chrom. relat. Technol.* **2001**, *24*, 1935.
38. Strege, M. A.; Lagu, A. L. *Anal. Biochem.* **1993**, *210*, 402.
39. Teichberg, V. I. *J. Chrom.* **1990**, *510*, 49.
40. Ratanathanawongs, S. K. *Flow Field-Flow Fractionation*, en Schimpf, M. E.; Caldwell K. D.; Giddings J. C. (edit.), *Field Flow Fractionation Handbook*, John Wiley & Sons, New York, **2000**, 257.
41. Chen, F-T. A. *J. Chrom.* **1991**, *559*, 445.
42. Fauquant, J.; Vieco, E.; Brule, G.; Maubois, J. L. *Lait* **1985**, *65* 647.