



**CUANTIFICACIÓN DE LACTOFERRINA Y LACTOPEROXIDASA EN SUERO DE QUESO MEDIANTE HPLC: DESARROLLO Y APLICACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO**

**AUTORES**

Baieli, María Fernanda; Pilato, Laura Daniela; Wolman, Federico Javier

**INSTITUCIÓN / ES**

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Instituto de Nanobiotecnología (NANOBIOTEC), UBA, CONICET, Argentina.

**INTRODUCCIÓN**

El lactosuero es un subproducto de la elaboración de quesos y caseína, que se forma cuando la caseína se separa de la leche por acción enzimática del cuajo o por ácidos minerales u orgánicos, respectivamente. Dentro de las proteínas que componen el suero en menor proporción se encuentran la lactoferrina (LF) y la lactoperoxidasa (LP). Estas proteínas, poseen aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y nutracéutica entre otros dadas sus propiedades biológicas. Ambas proteínas tienen similar peso molecular y punto isoeléctrico (76,5 y 78kDa y 8,7 y 9,2-9,9, para LF y LP respectivamente). El objetivo del presente trabajo fue diseñar un método para cuantificar LF y LP mediante estrategias de HPLC basadas en cromatografía de intercambio iónico, apta para el seguimiento de todas las etapas del proceso de purificación.

**DESARROLLO**

Desarrollo del método por HPLC. Se utilizaron las columnas de intercambio iónico Resource™ S 1 ml (Alemania) y Mono S™ 5/50 GL (EEUU). El flujo utilizado fue de 0,5 ml/min y el monitoreo fue con detector de arreglo de diodos. Las fases móviles fueron buffer de fosfatos 20 mM pH 7 (A) y buffer de fosfatos 20 mM pH 7 con NaCl 1M (B). Se evaluaron diferentes gradientes de elución para lograr una buena separación de LF y LP en solución de proteínas puras y en muestras de lactosueros.

Protocolo optimizado. Las muestras de suero de queso fueron analizadas utilizando la columna Mono S™ 5/50 GL y el gradiente optimizado (0-6min 0%B, 6-11min 0-100%B, 11-26min 100%B). El volumen de inyección fue de 100 µl. Se realizaron curvas de calibración para LP y LF con concentraciones de 0,01 a 0,1 y 0,05 a 1 mg/ml, respectivamente.

**RESULTADOS**

Se testearon inicialmente ambas columnas con soluciones estándar de LP y LF utilizando un gradiente de 18min de 0-100%B. Ambas proteínas no interactuaron con la columna Resource™ S. Por el contrario, con la columna Mono S™, LP interactuó y pudo ser eluida con el gradiente, mientras que LF mostró mayor interacción con la columna eluyendo con 100%B. Posteriormente, se optimizó el gradiente con la columna Mono S™ observando el pico de LP cercano a los 17min y el de LF cercano a los 22.5min (Fig. 1).

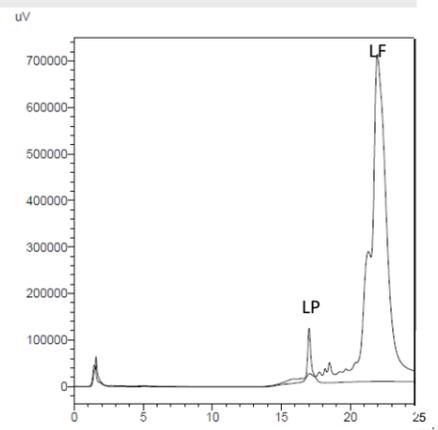
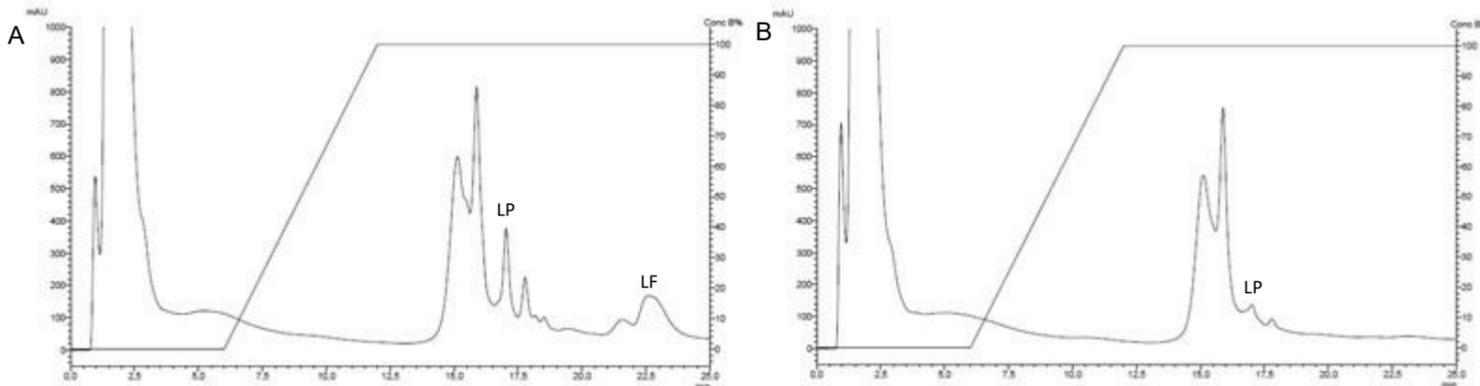


Fig. 1. LP 0,05 mg/ml y LF 0,5 mg/ml con la columna Mono S™.

Fig. 2. Cromatogramas de HPLC para suero de queso (A) y sobrenadante pos-adsorción (B) de las proteínas LP y LF.

El análisis de la muestra de suero permitió identificar los picos de LP y LF contrastada con los tiempos de retención de sus estándares (Fig. 2A). Además, en el sobrenadante de suero sometido a la adsorción previa de LP y LF, se pudo observar la disminución del pico de LP y la depleción de LF (Fig. 2B). Las concentraciones de LP y LF en las muestras fueron corroborados con el ensayo de actividad enzimática definido para LP o el kit comercial de ELISA para la cuantificación de LF.

**CONCLUSIÓN**

El suero de queso contiene proteínas de gran valor nutracéutico y comercial como LF y LP. Dada su importancia, es crucial contar con métodos precisos para su cuantificación en las distintas etapas de purificación y producción. En este trabajo, hemos diseñado y optimizado un método robusto basado en HPLC usando una columna de intercambio iónico para la cuantificación de LF y LP en muestras complejas de lactosueros. La validación del método se evidenció al identificar claramente los picos de LF y LP en muestras de suero, al observar la disminución de sus concentraciones tras un proceso de depleción de la mismas y contrastar con otros métodos de referencia.