

**PURIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS DE SUERO DE LECHE POR
TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS**

CESAR AUGUSTO BERNAL

LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN BIOQUÍMICA Y MICROBIOLOGIA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2009

**PURIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS DE SUERO DE LECHE POR
TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS**

CESAR AUGUSTO BERNAL

**Trabajo de grado presentado como requisito para obtener el título de
Químico**

DIRIGIDO POR: PhD. RODRIGO TORRES SÁEZ

PROFESOR ESCUELA DE QUÍMICA

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2009

Dedicatoria

A Dios por la vida y las bendiciones

A la santísima Virgen María quien intercede por mi ante nuestro señor Jesucristo

A mi hermano quien desde el cielo me guía

A mi familia por su infinito apoyo en especial a mis Abuelos Maternos quienes han dado su vida para que yo pudiese realizar esta meta

A mis amigos con quienes compartí esta etapa de la vida

Agradecimientos

A Dios, por darme una vida rodeada de amor y mostrarme el camino a seguir

A mis abuelos Pastora y Juan quienes fueron mi fortaleza desde el primer día de mi vida los amo

A mi madre, padre y demás familiares, quienes me han apoyado sin esperar nada a cambio

Al profe Rodrigo, por sus enseñanzas

Al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología y a todos los que hacen parte de el, por su colaboración y amistad

A mis amigos Aurora, Laura, Yuri, Alejandra, Jorge, Pablo, Quintana y demás compañeros con quienes compartí momentos de alegría y tristeza

A la Chata quien confió en mí en la culminación del presente trabajo y me dio el ánimo para terminarlo

A la Universidad Industrial de Santander

A Freskaleche S.A. por suministrar el lactosuero bovino para la realización del proyecto de grado

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO.	3
1.1. LECHE BOVINA.	3
1.2. SUERO DE LECHE BOVINO.	5
1.2.1. Proteínas del suero de leche bovino.	9
1.3. INMUNOGLOBULINAS.	12
1.4. PURIFICACION DE PROTEÍNAS.	14
1.4.1. Purificación por precipitación selectiva de proteínas.	14
1.4.2. Técnicas cromatográficas.	16
1.4.2.1. Cromatografía de intercambio iónico	17
1.4.2.2. Cromatografía de exclusión por tamaño	19
1.4.3. Métodos electroforéticos	20
1.4.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).	20
1.4.3.2. Electroforesis denaturante (SDS-PAGE).	21
1.4.3.3. Electroforesis bidimensional.	22
1.5. ESTADO DEL ARTE.	24
1.5.1. Purificación de proteínas del lactosuero.	26
2. METODOLOGÍA.	28
2.1. MATERIALES.	28
2.1.1. Obtención de lactosuero ácido.	28
2.1.2. Obtención de lactosuero FRESKALECHE S.A	28
2.1.3. Adecuación de los sueros.	29
2.2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS SUEROS.	29
2.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN	

LOS SUEROS	29
2.4. CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS PRESENTES EN LOS SUEROS ÁCIDO Y DULCE	30
2.5. PURIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS PRESENTES EN EL SUERO	30
2.5.1. Separación de proteínas presentes en el suero mediante precipitación fraccionada	30
2.6. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO	32
2.6.1. Soportes utilizados	32
2.6.2. Acondicionamiento del soporte	32
2.6.3. Adsorción de proteínas sobre soporte de intercambio iónico	32
2.6.4. Desorción de proteínas sobre soporte de intercambio iónico	33
2.7. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR	33
2.7.1. Acondicionamiento del soporte	34
2.7.2. Empacado de la columna	34
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
3.1. PARÁMETROS ANALIZADOS DE LOS LACTOSUEROS BOVINOS	36
3.2. CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS PRESENTES EN EL LACTOSUERO BOVINO	36
3.3. PRECIPITACIÓN FRACCIONADA	41
3.4. ADSORCIÓN Y DESORCIÓN DE PROTEÍNAS SOBRE SOPORTES DE INTERCAMBIO IÓNICO	42
3.5. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR	46
4. CONCLUSIONES	51
RECOMENDACIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	53
ANEXOS	65

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Composición de leche bovina por 100 gramos (Un vaso de leche).	3
Tabla 2	Algunas de las características fisicoquímicas de las caseínas bovinas. [Farrell et al, 2004; Swaisgoo, 1993]	6
Tabla 3	Algunas propiedades fisicoquímicas de las proteínas presentes en el suero de leche bovino [Hahn, 1998].	12
Tabla 4	Parámetros fisicoquímicos tomados de los sueros de leche bovina.	36
Tabla 5	Pesos moleculares de proteínas de lactosuero obtenidos con el software Quantity one.	38
Tabla 6	Puntos isoeléctricos de proteínas del lactosuero obtenidos mediante PD-Quest.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Micelas de caseína estabilizadas por iones calcio. (a). Representación esquemática de una micela de caseína. (b). Interacciones entre las micelas de caseína y los iones calcio.	7
Figura 2 Representación estructural de una molécula de caseína	8
Figura 3 Representación de la interacción entre la proteína y un intercambiador aniónico.	18
Figura 4 Representación de resinas de intercambio iónico. (a) Resina intercambio anionico DEAE Sephadex. (b) Resina intercambio anionico Macro-Prep High Q. (c) Resina intercambio cationico carboximetil sephadex.	19
Figura 5 Mecanismo químico de la polimerización de la poliacrilamida a partir de Acrilamida y N,N'metilenbisacrilamida.	21
Figura 6 Precipitación de proteínas debido al incremento de la concentración del agente precipitante.	31
Figura 7 Cromatógrafo líquido de baja presión (Biologic LP, Biorad), con las columnas	34
Figura 8 Electroforesis SDS-PAGE de suero de leche bovino virgen con adiciones de diferentes volumen de mezcla 1:1 de suero bovino y buffer de carga en los pozos.	37

Figura 9	Electroforesis en condiciones nativas de suero de leche bovino	39
Figura 10	Electroforesis Bidimensional del lactosuero bovino.	40
Figura 11	Electroforesis SDS-PAGE realizada al sobrenadante obtenido en la precipitación fraccionada con etanol.	41
Figura 12	Electroforesis SDS-PAGE de la adsorción y desorción de proteínas del lactosuero bovino	43
Figura 13	Electroforesis SDS-PAGE de la adsorción y desorción de proteínas del lactosuero bovino	44
Figura 14	Desorción de proteínas del soporte DEAE-Sephacel incrementando la fuerza ionica.	45
Figura 15	Desorción de proteínas del soporte DEAE-Sephacel incrementando la fuerza iónica.	45
Figura 16	Cromatograma de exclusión molecular, columna de 50 cm empacada con Sephadex G-75 y flujo de elusión de 1mL/min.	47
Figura 17	Electroforesis SDS-PAGE de los picos del cromatograma de exclusión molecular Sephadex G-75	48
Figura 18	Electroforesis SDS-PAGE purificación de inmunoglobulina G usando cromatografía de exclusión molecular empacada con Sephadex G-75 usando tween 20 al 10% como eluyente	50

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1 Curva de calibración para la determinación de la cantidad de proteína por el método del Bradford	65
Anexo 2 Análisis del gel obtenido mediante electroforesis SDS-PAGE de la figura 8 usando el software Quantity one 4.6.3.	66
Anexo 3 Marcador de punto isoelectrico	67
Anexo 4 “Cromatograma” de exclusión molecular empacada con Sephadex G-75 usando tween 20 al 10% como eluyente.	67
Anexo 5 Importancia del empaquetamiento de la columna	68

LISTA DE ABREVIATURAS

- **BSA:** Albúmina Sérica Bovina
- **PBS:** Buffer Fosfato salino
- **IgG:** Inmunoglobulina G
- **IgM:** inmunoglobulina M
- **IgA:** inmunoglobulina A
- **SDS-PAGE:** electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio
- **DEAE:** Dietil Amino Etil
- **Nm:** Nanometros
- **KD:** KiloDaltons

RESUMEN

TITULO: PURIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS DE SUERO DE LECHE POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Bernal, César Augusto.

Palabras Clave: Inmunoglobulina G, Purificación, suero de leche bovino, Tween 20.

El suero de leche es un sub-producto de la industria del queso, y está compuesto de proteínas, minerales, vitaminas y lactosa disueltos en una fase acuosa. Entre las proteínas de mayor interés presentes en el suero de leche bovina, se encuentran la inmunoglobulina G (IgG). La IgG es una glicoproteína de gran importancia biológica debido a sus propiedades inmunológicas y sus múltiples aplicaciones biomédicas, tales como el tratamiento de diferentes infecciones en recién nacidos y aplicación endovenosa para el tratamiento de patologías inmunohematológicas, entre otras.

En esta investigación se presentan los resultados obtenidos de la purificación de inmunoglobulinas aisladas de suero de leche bovino por técnicas de separación de proteínas tales como: cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, y precipitación fraccionada.

Se obtuvo un método de purificación de inmunoglobulinas G, a partir de la mezcla de proteínas presentes en el perneado de suero de leche bovino por medio de cromatografía de exclusión molecular usando como fase estacionaria Sephadex G-75 y como fase móvil Tween 20 al 10% (v/v) en buffer fosfato salino (PBS).

La purificación se llevo a cabo gracias a la formación de micelas de la albumina serica bovina (BSA) con el Tween 20, las cuales debilitaron las interacciones existentes entre la Inmunoglobulina G y la BSA.

* Proyecto de Grado

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Rodrigo Torres Sáez.

ABSTRACT

TITLE: PURIFICATION OF IMMUNOGLOBULIN OF WHEY OF MILK FOR CHROMATOGRAPHIC TECHNOLOGIES

Bernal, Cesar, Augusto.

Keywords: Immunoglobulin G, Purification, bovine whey of milk, Tween 20.

The whey of milk is a product of the industry of the cheese, and is composed of proteins, minerals; vitamins and lactose dissolve in a watery phase. Between the proteins of major interest present in the whey of bovine milk, they find the immunoglobulin G (IgG). The IgG is a glycoprotein of great biological importance due to his immunological properties and his multiple biomedical, such applications as the treatment of different infections in newborn children and application endovenos for the treatment of pathologies immunohematologyc, between others.

In this investigation they present the results obtained of the purification of immunoglobulin isolated of bovine whey of milk by technologies of separation of such proteins as: chromatography of molecular exclusion, chromatography of ionic exchange, and by installments rainfall.

There was obtained a method of purification of immunoglobulin G, from the mixture of present proteins in the kicked one of bovine whey of milk by means of chromatography of molecular exclusion using as stationary phase Sephadex G-75 and as mobile phase Tween 20 to 10 % (v/v) in buffer saline phosphate (PBS).

The purification I carry out thanks to the formation of micelles of the bovine serum albumine (BSA) with the Tween 20, which debilitated the existing interactions between the Immunoglobulin G and the BSA.

* Undergraduate Thesis

**Science Faculty. Chemistry Department. Director: Rodrigo Torres Sáez

INTRODUCCIÓN

El suero de leche es un sub-producto de la industria del queso, y está compuesto de proteínas, minerales, vitaminas y lactosa disueltos en una fase acuosa. Entre las proteínas de mayor interés presentes en el suero de leche bovina, se encuentran la inmunoglobulina G (IgG). La IgG es una glicoproteína de gran importancia biológica debido a sus propiedades inmunológicas y sus múltiples aplicaciones biomédicas, tales como el tratamiento de diferentes infecciones en recién nacidos y aplicación endovenosa para el tratamiento de patologías inmunohematológicas, entre otras [Davidson et al., 1989]. Es de gran interés científico e industrial encontrar formas simples y rápidas para aislar y purificar inmunoglobulinas de sustratos como el suero de leche, y que permitan obtener dichas proteínas sin alterar las propiedades biológicas y con rendimientos que permitan su aplicación en la industria.

Durante la ejecución del presente trabajo, se ensayaron algunas técnicas de separación de proteínas tales como: cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, y precipitación fraccionada. Se aprovecharon las propiedades físicas y químicas, tales como masa molecular, punto isoeléctrico, composición aminoacídica, solubilidad, tamaño y forma de las proteínas, que permitieron el aislamiento y purificación de las inmunoglobulinas presentes en el suero de leche bovino.

En este proyecto, se presentan los resultados obtenidos de la purificación de inmunoglobulinas aisladas de suero de leche bovino por técnicas cromatográficas. Se obtuvo un método de purificación de inmunoglobulinas G, a partir de la mezcla de proteínas presentes en el perneado de suero de leche bovino por medio de cromatografía de exclusión molecular usando como fase estacionaria Sephadex

75 y como fase móvil Tween 20 al 10% (v/v) en buffer fosfato salino (PBS) y se obtuvo una buena purificación de las inmunoglobulinas. No obstante, no fue posible calcular el porcentaje de rendimiento de la purificación.

Parte de los resultados del presente proyecto fueron presentados en el XV Congreso Nacional de Química celebrado en Bogotá, Colombia, en octubre de 2008, y publicados en la revista noticias químicas, Vol. 30 / numero 82, pag.90.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 LECHE BOVINA

La leche es un alimento de primera necesidad alimentaria, y de gran demanda por su alto valor nutrición de sus constituyentes. La leche es considerada un alimento básico en la dieta de niños, ancianos, enfermos, y en general de toda la población.

En su composición normal posee un peso específico que normalmente varía de 1023 a 1040 (Kg/m³ a 20°C) y un pH de 6,6 a 6,8. Es un producto altamente perecedero que debe ser enfriado rápidamente a 4°C después de su colección, debido a que las temperaturas externas, la acidez o la contaminación por microorganismos pueden deteriorar su calidad rápidamente. **[Cruz, 2007]**

La leche se compone de proteínas, hidratos de carbono, grasas, vitaminas y minerales, siendo una fuente de nutrición de suma importancia para la humanidad. Las proteínas de la leche se clasifican en dos grandes grupos; las caseínas y proteínas del suero. La tabla 1 presenta la composición promedio de un vaso de leche bovina en donde se destaca la gran cantidad de proteínas y grasa que se encuentran completamente emulsionadas en la fase acuosa de la leche.

Tabla 1. Composición de leche bovina por 100 gramos (Un vaso de leche).

Nutriente	Cantidad
Agua	87,9 g
Proteína	3,5 g
Grasa	3,8 g
Lactosa	4,7 g

Calcio	120 mg
Magnesio	12 mg
Sodio	50 mg
Potasio	150mg
Hierro	0,05 mg
Zinc	0,35 mg
Fósforo	95 mg
Cloro	95 mg

Los mamíferos dependen fundamentalmente de la leche en sus primeros periodos de vida y el hombre la ha aprovechado para su alimentación, empleándola directamente y transformándola para la obtención de productos ricos en proteínas, como el queso, o ricos en grasa, como la mantequilla. Se ha desarrollado su industrialización en todas las latitudes, permitiendo que cada día se obtenga una cantidad mayor de productos lácteos. La leche por ser un producto muy completo es un medio ideal para el crecimiento de microorganismos que si no son eliminados pueden convertirse en un riesgo para los consumidores **[Considine, 2006]**.

Durante el periodo de crecimiento más acelerado del recién nacido, y en el que su organismo todavía está inmaduro y requiere desarrollarse a gran velocidad, la leche es el único alimento de la cría, por lo que no es de sorprender entonces, que la leche contenga componentes con diferente funcionalidad fisiológica, como las inmunoglobulinas u otros compuestos que ayudan a prevenir infecciones y favorecen la maduración del organismo de la cría. **[Jiménez, 2006]**.

La leche en Colombia constituye uno de los principales productos del sector pecuario, que vincula una gran extensión del agro colombiano y toda una

estructura productiva de la industria alimenticia. La cadena de lácteos en Colombia está compuesta por dos eslabones principales; en el primero, se encuentra la producción de leche cruda. El segundo eslabón es el industrial, donde se encuentra una amplia variedad de productos lácteos o derivados de la leche. Este último ha impulsado la producción de leche con miras a conformar una base tecnológica ajustada a las condiciones del país, con sistemas de producción aptos para el trópico, que favorezcan tanto la composición, como la calidad higiénica de la leche y sus derivados, para que estos productos sean competitivos en los mercados internacionales. [ENA, 2006].

1.2 SUERO DE LECHE BOVINO

Se denomina suero de leche al líquido remanente tras la precipitación y separación de la caseína de la leche durante la elaboración del queso. Es una de las mayores reservas de proteínas alimentarias que aún permanecen fuera de los canales de consumo humano. La producción mundial de suero, aproximadamente unos 120 millones de toneladas en 1990, contiene unos 0,7 millones de toneladas de proteínas de relativamente alto valor, lo equivalente al contenido de proteínas de casi 2 millones de toneladas de habas de soja. Sin embargo, y a pesar de la falta crónica de proteínas en gran parte del mundo, una porción muy considerable de la producción total de lactosuero se vierte como residuo, alcanzando en 1990 un 50% del total de las proteínas.

El suero representa aproximadamente el 80 - 90% del volumen de la leche que entra en el proceso de producción de lácteos, y contiene alrededor de 50% de los nutrientes de la leche original: 25% de la proteína, 8% de la materia grasa, y cerca

del 95 % de la lactosa de la leche. Además, contiene vitaminas y sales minerales [Whitney, 1988].

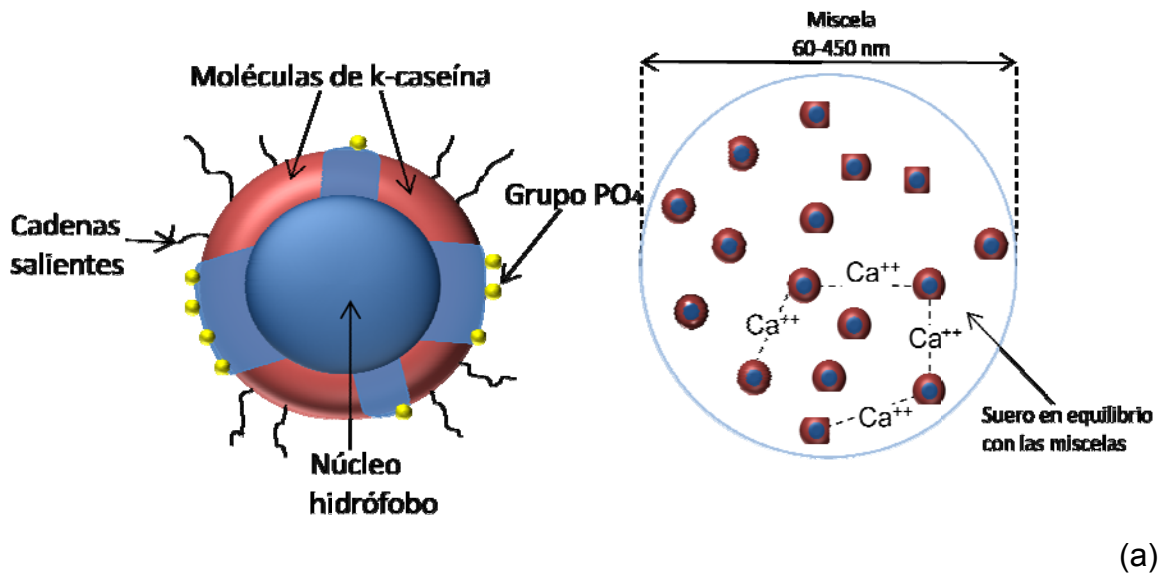
La gran variedad de productos derivados de la leche, tales como mantequilla, crema de leche, yogurt, Kumis, lactosuero, queso y afines, han permitido un mejor aprovechamiento de la leche cruda, ya que estos productos son menos perecederos y representan un gran valor nutricional. En la cadena productiva del queso, la leche cruda es sometida a diferentes procesos, cuyo fin último es la precipitación de las caseínas de la leche y la eliminación del lactosuero.

Las caseínas son un conjunto heterogéneo de proteínas. En la tabla 2 se presentan algunas propiedades fisicoquímicas de las caseínas.

Tabla 2. Algunas de las características fisicoquímicas de las caseínas bovinas. [Farrell et al, 2004; Swaisgoo, 1993]

Característica	Caseína			
	α_{s1}	α_{s2}	B	κ
Concentración en leche (g/L)	12-15	3-4	9-11	2-4
Masa molecular (Da)	23545 - 23615	25226	23983 – 24023	19006 - 19037
Punto isoeléctrico (pI)	4.4 – 4.76	...	4.83 – 5.07	5.45 – 5.77

Las caseínas son relativamente hidrofóbicas y carecen de estructura secundaria o terciaria bien definidas. En la leche se encuentran como suspensión de partículas que asemejan a las micelas de surfactantes. Estas micelas de caseínas se estabilizan por iones de calcio e interacciones hidrofóbicas, tal como se muestra en la Figura 1.



(b)

Figura 1. Micelas de caseína estabilizadas por iones calcio. (a). Representación esquemática de una micela de caseína. (b). Interacciones entre las micelas de caseína y los iones calcio.

Los procesos industriales de obtención de queso a partir de leche cruda, logran la precipitación de las caseínas mediante dos metodologías basadas en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas de la leche.

Un primer proceso consiste en acidificar la leche hasta un pH de 4.6, valor de pH que corresponde al punto isoeléctrico promedio de las caseínas. A este pH las caseínas se encuentran en su punto de menor solubilidad debido a la reducción de las repulsiones intermoleculares. Esto se logra industrialmente mediante la adición de bacterias ácido lácticas que metabolizan la lactosa presente en la leche a ácido láctico. Al suero producto de este proceso se le denomina suero ácido.

El segundo proceso es por vía enzimática. El suero generado en este proceso se le denomina suero dulce. La cadena aminoacídica que forma la macromolécula de k-caseína consta de 169 aminoácidos como se muestra en la Figura 2. Desde un punto de vista enzimático, la unión entre los aminoácidos 105 (fenilalanina) y 106

(metionina) es fácilmente accesible a muchas enzimas proteolíticas por medio de las cuales se lleva a cabo el respectivo rompimiento del enlace peptídico y posterior división de la cadena. La parte soluble en agua de esta cadena contiene los aminoácidos 106 a 169 donde predominan los aminoácidos polares y el carbohidrato, que dan a la molécula sus propiedades hidrófilas. Este segmento se elimina con el suero. La parte que resta de la k-caseína, que consta de los aminoácidos 1 a 105, es bastante insoluble en agua y permanece en la cuajada junto con las caseínas α y β .

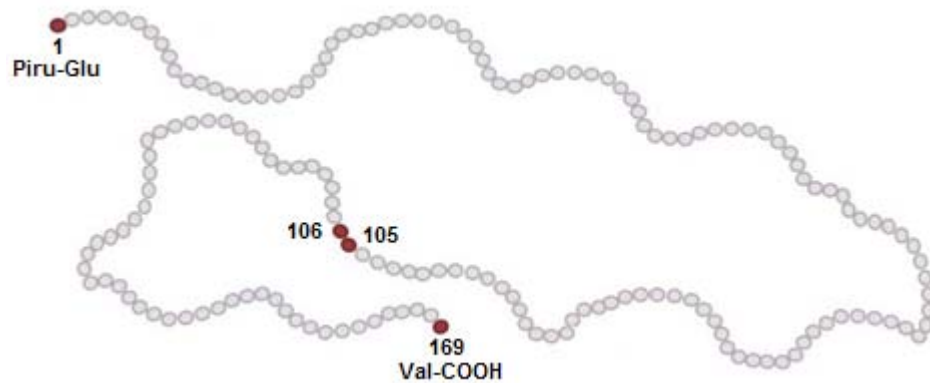


Figura 2. Representación estructural de una molécula de caseína

La formación del coágulo se debe a la eliminación repentina del macropéptido hidrófilo y al desequilibrio que esto causa en las fuerzas intermoleculares. Entre las enzimas más usadas industrialmente para lograr este proceso se destaca la quimosina, la cual en un principio fue extraída del abomaso, uno de los 4 estómagos en los rumiantes. Actualmente, es obtenida a partir de procedimientos de síntesis química sin usar estómagos de ternero como materia prima.

La composición de los dos tipos de suero varía fundamentalmente en el contenido de lactosa; se reporta entre 4,5 – 5,0 % para suero dulce y de 3,8 – 4,2% para suero ácido [Gómez, et al, 1999].

La producción a escala industrial de queso tiene asociada la generación de miles de litros de lactosuero. Por esta razón, se han llevado a cabo diversas investigaciones sobre aplicaciones para el lactosuero, tales como bebidas, quesos, fermentación alcohólica, entre otros productos **[Alvarez y col., 2003; Cárdenas y col., 1999; Hincapie y Mejía, 1993; Ramírez y col., 1995; Sánchez y col., 2004; Uribe y Bedoya, 1999]**.

Este subproducto de la leche es subvalorado y finalmente se convierte en desecho, sin conocer que muchas proteínas de interés biológico se encuentran en él y que es uno de los materiales más contaminantes que existen en la industria alimenticia. Por cada 1000 litros de lactosuero se generan cerca de 35 kg de demanda biológica de oxígeno (DBO), y cerca de 68 kg de demanda química de oxígeno (DQO). Esta fuerza contaminante es equivalente a la de las aguas negras producidas en un día por 450 personas **[Jelen, 1979]**.

1.2.1 Proteínas del suero de leche bovino

Las características fisicoquímicas de las proteínas del suero son muy diferentes a las de las caseínas. Desde el punto de vista digestivo, las proteínas del suero permanecen solubles al pH ácido del estómago, a diferencia de las caseínas que precipitan formando coágulos. Esto provoca que su paso por el estómago sea muy rápido y que lleguen al intestino prácticamente intactas permitiendo que su absorción sea a través de un sector más largo del intestino. Su largo paso por el intestino facilita una gran variedad de funciones, por ejemplo, interacciones con la flora gastrointestinal o con los minerales presentes en el bolo alimenticio mejorando su absorción.

Por otro lado, la composición de aminoácidos de las proteínas del suero les confiere funcionalidad fisiológica muy especial: en primer lugar, las proteínas del suero contienen una muy alta proporción de aminoácidos azufrados, esto contribuye a la gran calidad nutricional de estas proteínas (su PER es de 3.2, comparado con el de 2.0 de las caseínas). Más aún, los aminoácidos azufrados parecen aumentar la función inmune del organismo, probablemente por medio de la regulación del tripéptido azufrado glutatión, el cual interactúa con las membranas celulares de los microorganismos provocándoles la muerte **[Locasa, 1974]**

En segundo lugar, las proteínas del suero, principalmente la α -lactoalbúmina, son ricas en aminoácidos con cadenas laterales largas (isoleucina, leucina y valina). Estos aminoácidos son necesarios en las células del músculo para promover la síntesis de proteínas. Más aún, estos aminoácidos son metabolizados para generar energía por el músculo. De esta manera, ayudan a aumentar la biodisponibilidad de los carbohidratos como fuente de energía y evitan la degradación del músculo en condiciones extremas como el ejercicio prolongado **[Walzem et al, 2002]**. Dietas suplementadas con este tipo de proteínas y ligeras restricciones energéticas se han utilizado en grupos de deportistas, produciendo una disminución preferencial del tejido visceral adiposo, y manteniendo un alto nivel de rendimiento en los deportistas **[Mourier et al, 1997]**.

Desde los años noventas, diversas investigaciones han establecido el importante papel que juega el sistema proteico de la leche en su actividad biológica. Se ha demostrado que algunas proteínas nativas del suero como la α -lactoalbúmina, la β -lactoglobulina, y la lactoferrina, son fisiológicamente activas **[Walzem et al, 2002; Van Belzen, 2002; Bos et al, 2000]**. Por ejemplo, se ha demostrado para la lactoferrina y la β -lactoglobulina poseen actividades antimicrobianas y antivirales capaces de inhibir patógenos a nivel gastrointestinal y de promover la

respuesta inmune del organismo además de intervenir en la regulación del desarrollo celular [**Schanbacher et al, 1997; Meisel y Schlimme, 1990; Meisel, 1997**].

La lactoferrina posee características muy especiales; entre las más estudiadas están sus propiedades antibacterianas y antioxidantes. La habilidad de secuestrar y solubilizar el Fe^{3+} del suero sanguíneo necesario para el crecimiento y expresión de factores de virulencia de ciertas bacterias patógenas [**Ling, 2006**] le confiere a la lactoferrina propiedades bacteriostáticas [**Orsi, 2004; Chierici et al, 1992; Schulz-Lell et al, 1991**]. Se ha demostrado también que esta proteína puede favorecer la respuesta inmune del organismo promoviendo la proliferación de linfocitos. Además, puede promover la diferenciación celular, ayudando a la reparación de tejidos dañados [**Walzem et al, 2002**].

Por otro lado, algunas funciones biológicas están latentes hasta que el péptido activo es liberado a través de la hidrólisis de las proteínas (principalmente las caseínas), ya sea por las enzimas del tracto gastrointestinal, o bien por las proteasas liberadas durante la fermentación de la leche [**Van Belzen, 2002; Meisel, 2002; Shah, 2000; Leonil y Maubois, 2002; Silva y Malcasa, 2005; Clare y Swaisgood, 2000; Philanto-Leppälä, 2001; Meisel, 1997**].

En la tabla 3 se presentan algunas propiedades fisicoquímicas de las proteínas presentes en el suero de leche de bovino.

Tabla 3. Algunas propiedades fisicoquímicas de las proteínas presentes en el suero de leche bovino [Hahn, 1998].

Proteína	Concentración promedio en suero (g/L)	Masa molecular (KD)	Punto Isoeléctrico (pI)
β -Lactoglobulina	3-4	18.4	5.2
α -Lactoalbumina	1.5	14.2	4.7-5.1
Albumina sérica	0.3-0.6	69	4.9
IgG, IgA, IgM	0.6-0.9	150-900	5.8-7.3
Lactoperoxidasa	0.06	78	9.6
Lactoferrina	0.05	78	8.0

1.3 INMUNOGLOBULINAS

Las inmunoglobulinas son un grupo de glicoproteínas séricas de movilidad electroforética variable, y que están formadas por cadenas polipeptídicas agrupadas en uno o más unidades estructurales básicas dependiendo del tipo de inmunoglobulina.

Cada unidad está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas unidas entre sí por puentes disulfuro y otras uniones de tipo no covalente. La separación de estas cadenas, usando agentes reductores como el 2-mercaptoetanol, permite su individualización y clasificación en dos tipos: cadenas de bajo peso molecular (cadenas ligeras de aproximadamente 25 KD) y de alto peso molecular (cadenas pesadas de aproximadamente 50 KD) [Konecny y col., 1994.]

En las inmunoglobulinas, además de las cuatro cadenas polipeptídicas básicas, se encuentra un componente glucosídico que representa el 2-14% del peso total de la molécula, y denominado como cadena J.

Estructuralmente estas glicoproteínas pueden estar constituidas por unidades básicas simples, como en el caso de la IgG, IgD, e IgE; en forma de dímeros como es el caso de la IgA o incluso por hasta cinco estructuras (pentámeros) básicas unidas por sus extremos como en la IgM. Esto se debe a la cualidad que tienen las cadenas de unirse entre sí mediante puentes disulfuro o a través de la cadena J.

En todos los fluidos orgánicos de la fisiología de los vertebrados están presentes las inmunoglobulinas, además en las membranas de los linfocitos B y células plasmáticas que actúan como receptoras de señales antigénicas o en la destrucción antigénica.

Las inmunoglobulinas junto con la lactoferrina, lactoperoxidasa y lisozima conforman un sistema antimicrobiano en la secreción láctea de bovino. Las inmunoglobulinas son antibióticos que son sintetizados en las glándulas mamarias como respuesta antigénica generada por bacterias y virus, y así proveer protección ante las infecciones microbianas.

Las inmunoglobulinas son el menor componente proteínico en el suero de leche, pero tienen un valor potencialmente alto. La concentración de inmunoglobulinas en el suero de leche “dulce” es 0.4-0.6 mg/ml, de la cual, la Inmunoglobulina G (IgG) representa aproximadamente el 90 % de las inmunoglobulinas. Esta IgG es idéntica a la IgG presente en el suero de sangre encontrada en prácticamente todos los mamíferos **[Marshall, 1982]**.

1.4 PURIFICACION DE PROTEINAS

La purificación de proteínas de interés biológico es una tarea ardua, ya que en muchos casos dichas proteínas representan menos del 0.1% del peso total de material del cual se desean aislar. Además, se requiere que el material aislado conserve las propiedades funcionales y estructurales por las cuales presenta interés biológico. Existen diferentes técnicas de purificación de proteínas las cuales se basan en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas tales como tamaño molecular, punto isoelectrico, afinidad química y movilidad electroforética entre otras.

1.4.1 Purificación por precipitación selectiva de proteínas

La precipitación selectiva de proteínas puede ser usada como un método de recuperación de la mayoría de las proteínas presentes en una mezcla, es un método fraccionado selectivo para un subconjunto de proteínas presentes en una solución. La precipitación selectiva de proteínas es un método muy específico para aislar una proteína de interés en un paso de purificación **[Rothstein , 1994]**.

Las proteínas en disolución muestran cambios profundos en su solubilidad en función de :

- ❖ El pH
- ❖ La fuerza iónica
- ❖ Las propiedades dieléctricas del disolvente
- ❖ La temperatura

Estas variables, que son el reflejo del hecho de que las proteínas son electrolitos de peso molecular muy grande, pueden utilizarse para separar mezclas de

proteínas, ya que cada proteína posee una composición en aminoácidos característica, la cual determina su comportamiento como electrolito.

La solubilidad de la mayor parte de las proteínas globulares se halla profundamente influida por el pH del sistema. El pH al que una proteína muestra un mínimo de solubilidad es su pH isoelectrico, definido como aquel valor de pH en que la molécula no posee carga eléctrica y es incapaz de desplazarse en un campo eléctrico. En estas condiciones no existe repulsión electrostática entre moléculas de proteína vecinas y tienden a coalescer y precipitar **[Rothstein, 1994]**.

Puesto que las diferentes proteínas poseen valores de pH isoelectrico también diferentes, debido a que difieren en el contenido de aminoácidos, con grupos R ionizables, pueden con frecuencia separarse unas de otras por precipitación mediante ajuste de pH **[Hidalgo and Hansen, 1971]**.

Por otra parte, a medida que aumenta la fuerza iónica de la solución que contiene la proteína, disminuye la solubilidad de la proteína en dicha solución. A una fuerza iónica lo suficientemente elevada, una proteína puede ser casi completamente precipitada de su solución. Este fenómeno fisicoquímico se basa en el hecho de que una concentración elevada de la sal puede eliminar el agua de hidratación de las moléculas de proteína, solvatando la superficie molecular reduciendo, por tanto, su solubilidad **[Astrup et al, 1954]**.

El proceso depende de la interacción física y/o química del agente precipitante con una o varias proteínas que poseen ciertas características. Puede ser necesario usar una combinación de técnicas de precipitación selectivas para aislar la proteína deseada. El desarrollo de una técnica de precipitación selectiva para una proteína particular requiere la identificación del agente de precipitación

apropiado y la optimización del procedimiento de precipitación que usa aquel agente, lo cual incluye el pH, la concentración de proteína en la muestra y la fuerza iónica del buffer. **[Lovrien et al, 1987]**.

Autores recomiendan trabajar a pH neutro, sin embargo, si se conoce el punto isoeléctrico de la proteína objetivo, este puede ser usado como el punto central para variar el pH, en incrementos de ~0.5 a la unidad de 1 pH, en la búsqueda inicial de condiciones óptimas. **[Scopes, 1987]**.

Se debe tener en cuenta que algunos reactivos causan desnaturalización o afectan la actividad biológica, y algunos forman complejos que se unen fuertemente a la proteína de interés

En la mayoría de los casos, las proteínas separadas por precipitación retienen su conformación nativa y pueden disolverse de nuevo, normalmente sin experimentar desnaturalización. El sulfato de amonio es el reactivo preferido para precipitar proteínas debido a su gran solubilidad en agua, lo que permite alcanzar fuerzas iónicas muy elevadas **[Hidalgo and Hansen, 1971]**.

1.4.2 Técnicas cromatográficas

Las técnicas cromatográficas se basan en las diferencias de carga, tamaño o afinidad química de las diferentes proteínas. En todas estas técnicas la mezcla de sustancias que se va a fraccionar se disuelve en un fluido conocido como fase móvil. La disolución resultante se hace fluir a través de una columna constituida por una matriz sólida porosa, que en ciertos tipos de cromatografía puede asociarse con un líquido unido a un soporte y que se conoce como fase estacionaria. La fase estacionaria posee las características químicas adecuadas

para la separación de la mezcla de proteínas **[Ahrer and Jungbauer, 2006; Al-Mashiki y col., 1988]**.

Sin embargo, la adsorción selectiva de una proteína a partir de un extracto complejo en soportes, por ejemplo, de intercambio iónico comerciales, puede ser bastante complicada, ya que son diseñados para adsorber una gran cantidad de proteínas sobre el soporte respectivo **[Pessela y col., 2004]**. Para solucionar esta baja selectividad, se ha propuesto el empleo de soportes cromatograficos activados con la cantidad mínima de grupos activos capaces de adsorber la proteína objetivo de forma selectiva ente una mezcla de ellas **[Fernández y col., 1993; Fuentes y col., 2004; Fuentes y col., 2005; Pessela y col., 2004]**. Por esta razón, es importante el diseño de soportes activados a la medida de la proteína que se desea purificar, para obtener un método de obtención y purificación rápido y efectivo, utilizando técnicas cromatográficas como intercambio iónico o exclusión por tamaño.

1.4.2.1 Cromatografía de intercambio iónico

En la cromatografía de intercambio iónico, la columna está rellena de un soporte al que van unidos grupos cargados positivamente (intercambio aniónico) o negativamente (intercambio catiónico) para interactuar con las proteínas en solución. Estos grupos cargados normalmente están neutralizados por iones del tampón los cuales son reversiblemente reemplazados por las proteínas con mayor fuerza de interacción iónica al soporte. **[Levison, 2003]**. Por lo tanto, las proteínas cargadas pueden unirse a intercambiadores catiónicos o aniónicos dependiendo de su carga neta superficial, tal como se muestra en la figura 3.

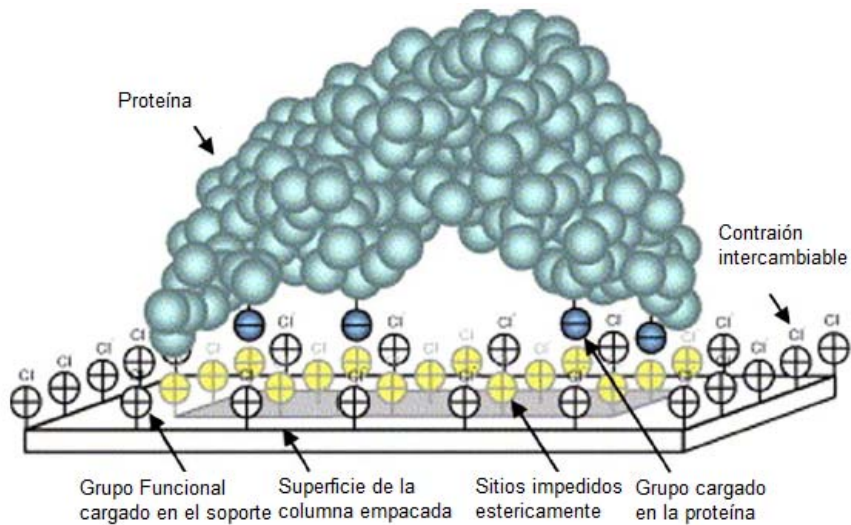


Figura 3. Representación de la interacción entre la proteína y un intercambiador aniónico.

Las proteínas más cargadas se unirán más fuertemente al intercambiador y por lo tanto serán más difíciles de eluir. La afinidad con la que una proteína se une a un intercambiador iónico depende de la fuerza iónica del medio, debido a la competencia entre los grupos cargados de la proteína y los iones de la fase móvil. Una vez adsorbidas las proteínas, para eluirlas (retirarlas) de la columna, se suele ir subiendo la fuerza iónica de la fase móvil aumentando la concentración de sal. De esta forma, eluyen primero las proteínas más débilmente retenidas, y cuando la fuerza iónica sea mayor saldrán las proteínas más cargadas y retenidas al soporte [Yoshida and Xiuyun, 1991].

Las resinas de intercambio iónico de uso industrial son hechas de materiales plásticos poliméricos porosos macromoleculares que se elaboran con forma de esferas con diámetros que oscilan entre 0,3 y 1,2 mm. Los materiales más comunes son poliestireno/divinil benceno (PDVC) y policrilato (PA). Los grupos funcionales están ligados químicamente a la estructura de la matriz, como se

observa en la figura 4. Las resinas son regenerables usando un ácido o una base según sea el tipo de resina, de intercambio anionico o cationico.

(a)

(b)

(c)

Figura 4. Representación de resinas de intercambio iónico. (a) Resina intercambio anionico DEAE Sephadex. (b) Resina intercambio anionico Macro-Prep High Q. (c) Resina intercambio cationico carboximetil sephadex.

1.4.2.2 Cromatografía de exclusión por tamaño molecular

El fraccionamiento de las sustancias de interés por esta técnica se basa en los diferentes tamaños de las moléculas de la mezcla de proteínas a separar. La fase estacionaria está constituida por partículas de polímeros de diferente porosidad denominados tamices moleculares **[Skuder, 1985]**. Los geles utilizados como tamiz molecular son polímeros hidrofílicos e insolubles cuyas cadenas poliméricas se entrecruzan hasta formar una red tridimensional. Los geles normalmente utilizados son de tres tipos: dextrano, agarosa y poliacrilamida.

El gel de dextrano (polímero ramificado de glucosa, entrecruzado y formado en pequeñas esferas) se comercializa con el nombre de Sephadex. Existen distintos tipos, según el tamaño de poro, proporcionando límites de exclusión comprendidos

entre 1 y 200 000 daltons. Estos geles se identifican por una denominación de G-10 hasta G-200, índice que se refiere a la capacidad de retención de agua del gel multiplicada por 10.

La fase móvil que contiene disuelta la mezcla a fraccionar es pasada a través de una columna empacada de una fase estacionaria. De esta forma, las proteínas más grandes, que no pueden penetrar en los poros de las partículas de la matriz de filtración, son eluidas con más rapidez que las proteínas más pequeñas que penetran por los poros de las partículas, ya que estas últimas siguen un camino más tortuoso y más largo penetrando los poros. El tamaño de los poros internos depende de la naturaleza del polímero en cuestión, y permite la entrada a proteínas por debajo de un determinado peso molecular **[Horneman y col., 2007]**.

1.4.3 Métodos electroforéticos

La electroforesis es un método analítico en el cual se separan macromoléculas, como proteínas o ácidos nucleicos por diferencias en su tamaño o peso molecular (PM) bajo la influencia de un campo eléctrico. Este método fue empleado por primera vez en 1937 por A. Tiselius en Suecia. Sin embargo, en 1959 Raymond y Weintraub emplearon como soporte para la electroforesis geles de poliacrilamida (PAGE) **[Pérez, 2000]**.

1.4.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida y del monómero entrecruzador N,N'-metilen-bis-acrilamida. La polimerización es inducida por los radicales libres que aparecen en la descomposición química del persulfato de amonio (PSA) ($S_2O_8^{2-} \longrightarrow 2SO_4^{\cdot -}$)

determinación de pesos moleculares de las proteínas en lo que se denominó electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) **[Pérez, 2000]**.

La SDS-PAGE tiene una alta sensibilidad, poder resolutivo y versatilidad en las bandas y se pueden correlacionar los pesos moleculares usando marcadores y su posterior análisis con un software como el Quantity One de Bio-Rad versión. 4.6.3. Este sistema es denaturante debido a la acción del SDS y el 2-mercaptoetanol, el SDS denatura por completo y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria **[Gallagher, 1995]**; **[Garfín, 1990]**.

1.4.3.3 Electroforesis 2-D

La electroforesis bidimensional (electroforesis 2-D) fue introducida por P. H. O'Farrell y J. Klose en 1975, es una técnica poderosa y ampliamente usado para el análisis de mezclas de proteína complejas extraídas de células, tejidos, u otras muestras biológicas. Esta técnica clasifica las proteínas de acuerdo a dos propiedades independientes en dos etapas discontinuas: la primera dimensión, el isoelectroenfoque (IEF), separa proteínas según su punto isoeléctrico (PI), en la segunda dimensión, la SDS-PAGE, separa proteínas según sus pesos moleculares **[O'Farrell, 1975]**.

Cada punto sobre la serie resultante bidimensional corresponde a una especie de proteína presente en la muestra. Miles de proteínas diferentes así pueden ser separadas, y obtener información adicional como el PM y el PI con la ayuda de un software como el PDQuest advanced de Bio-Rad versión 8.0.1. **[Görg, 1995]**.

Para la primera dimensión, habitualmente denominada electroenfoque se basa en el desplazamiento de las moléculas en un gradiente de pH. Las proteínas por ser anfotéricas, se separan en un medio en el que existe una diferencia de

potencial y un gradiente de pH. La región del ánodo es ácida y la del cátodo es alcalina. Entre ambos se establece un gradiente de pH tal que las moléculas que se han de separar tenga su punto isoeléctrico dentro del rango.

Las sustancias que inicialmente se encuentran en regiones de pH inferior a su punto isoeléctrico estarán cargadas positivamente y migraran hacia el cátodo, mientras aquellas que se encuentran en medios con pH más bajos que su punto isoeléctrico tendrán carga negativa y migraran hacia el ánodo. La migración les conducirá a una región dónde el pH coincidirá con su punto isoeléctrico, tendrán una carga neta nula y se detendrán. De esta forma las moléculas anfotéricas se sitúan en estrechas bandas donde coincide su punto isoeléctrico con el pH **[Berkelman, 1998], [Righetti, 1998].**

1.5 ESTADO DEL ARTE

La creciente preocupación por mejorar el aprovechamiento de recursos naturales, evitando, de esta forma, generar perjuicios al medio ambiente, hace que exista una búsqueda permanente de nuevos productos y tecnologías que optimicen los procesos, disminuyendo costos de producción y dando valor agregado a residuos con potencial comercial. La utilización de proteínas como ingredientes funcionales, es un ejemplo de estas nuevas tecnologías que torna posible el desarrollo de productos con características especiales, mejorando la calidad de los productos tradicionales. Además, agrega valor a los subproductos, que con frecuencia representan un problema ambiental para diferentes industrias, como es el caso del suero de queso. Aunque el suero contiene nutrientes valiosos, solo recientemente se han desarrollado nuevos procesos comerciales para la fabricación de productos de alta calidad a partir de dicho suero. **[Atra et al., 2005].**

Los procesos industriales que aprovechan el suero de leche son los relacionados con la obtención de suero en polvo desmineralizado, lactosa y suero en polvo deslactosado. Sin embargo, se está produciendo un cambio gradual hacia nuevos e interesantes productos a partir del suero. Es presumible que estos nuevos productos y procesos transformarán la imagen del suero, considerado como un subproducto no deseado contaminante, y pasará a ser una importante materia prima para la fabricación de productos de alta calidad nutricional y farmacéutica **[Hashimoto, 2007].**

Diferentes tecnologías pueden ser utilizadas para el aprovechamiento del suero de leche, entre ellas, el proceso de separación con membranas. La industria láctea es una de las mayores defensoras de los sistemas con membranas, utilizando esta tecnología desde su inicio para concentrar y fraccionar el suero de queso, así como para tratar el agua residual **[Muñi et al., 2005; Brião, 2007].** Sin

embargo, es necesario hacer pre-tratamientos para la eliminación de la grasa contenida en el lactosuero, debido a que las grasas constituyen uno de los agentes de saturación que pueden contribuir, por ejemplo, en la disminución del flujo del líquido en procesos industriales. Para solucionar este problema es necesario el uso de membranas, lo que puede ocasionar la obtención de productos con sabores alterados durante el almacenamiento y elevados costos de producción **[Nakay y Modler, 2000]**.

Muchas investigaciones en diferentes países y desde el siglo pasado han venido estudiando la posibilidad de utilizar el suero de leche para la alimentación humana, y se han desarrollado sólo recientemente nuevos procesos comerciales para la fabricación de productos de alta calidad a partir de dicho suero. Los procesos que predominan son los de bebidas de suero de leche. Es presumible que estos nuevos productos y procesos transformaran la imagen del suero, considerado como uno de los subproductos no deseado, y pasará a ser una importante materia prima para la fabricación de productos de calidad **[Hashimoto, 2007]**.

El suero de leche ha sido utilizado como suplemento de dietas en grupos de deportistas, produciendo una disminución preferencial del tejido adiposo, y manteniendo un alto nivel de rendimiento en los deportistas **[Mourier et al 1997]**.

Se ha usado para la propagación de inóculos en queserías **[Huggins, 1984; Lamboley et al., 1997]** y la obtención de lactosa **[González, 1994; Rech et al., 1999]**, poligalacturonasa **[García et al., 1987]**, proteína unicelular **[El-Hawary et al., 1991; Hosseini et al., 2003; Ben-Hassan, 1994]** etanol **[Domingues et al., 2001; Grba et al., 2002; Ghaly, 1995]**, ácidos orgánicos como ácido láctico **[Trujillo et al., 1998; Tejayadi, 1995]**, acético **[Huang, 1998; Talabardon et al., 2000]**, propiónico **[Colomban et al., 1993; Yang et al., 1994]**, glucónico

[Vanhuynh et al., 1986], succínico **[Lee et al., 2000]** y cítrico **[El- Samragy et al., 1996; El-Holi, 2003; Sánchez, 2004]**.

Todo proceso que incluye el fraccionamiento y la concentración de las proteínas del suero debe considerar también la recuperación de la lactosa, que es el componente que se encuentra en mayor cantidad y la principal responsable de la elevada carga orgánica del suero. Por otra parte, la lactosa por ser una fuente de material energético puede ser utilizada en diversos procesos biotecnológicos, y es un componente muy usado en las industrias alimenticias y farmacéuticas. Así el fraccionamiento del suero en lactosa y proteínas representa una posibilidad que permite la utilización de los constituyentes de mayor importancia comercial presentes en los suero de queso **[Chollangi y Hossain, 2007; Bund y Pandit, 2007]**.

1.5.1 Purificación de proteínas del lactosuero

Se han desarrollado diversas técnicas de purificación de las proteínas del suero de leche reportándose varios métodos cromatográficos para la separación de proteínas del suero. Con estas técnicas de purificación, se ha logrado separar selectivamente beta-lactoglobulina, BSA y alfa-lactoalbúmina **[Vogt and Freitag, 1997; Godall y col., 2008; Mucchetti y col., 1993]**.

Una de las alternativas más utilizadas ha sido el uso de diferentes técnicas cromatográficas, tales como cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular, para separarlas de la lactosa, por elución de las proteínas unidas mediante el uso de fuerza iónica o cambios de pH **[Skuder, 1985; Goodall y col., 2008; Rossano y col., 2001]**.

Por otro lado, Beta-lactoglobulina y Alfa-lactoalbúmina se han separado por cromatografía de intercambio iónico utilizando soportes activados con grupos amino (por ej. Dietil-amino-etil-(DEAE)) **[Hahn y col., 1998]**. La intención de estas investigaciones fue la caracterización bioquímica de las diversas formas de las proteínas. A su vez, lactoferrina y lactoperoxidasas se han separado por cromatografía de intercambio catiónico usando carboximetil celulosa después de precipitación con sulfato de amonio **[Yoshida and Siuyun, 1991]**. Además, IgG, lactoferrina y lactoperoxidasa pueden ser también separadas por varias técnicas de filtración en gel **[Al-Mashikhi y col., 1988]**. Debido a la capacidad de lactoferrina de unir DNA, esta proteína puede ser también purificada por cromatografía de afinidad , mientras que IgG puede ser purificada usando geles tiofílicos, o cromatografía de quelatos metálicos inmovilizados o quelantes con rendimientos de purificación razonables. Sin embargo, lo elevados costos de producción no hacen de estos métodos de purificación alternativas que sean factibles a escala industrial. **[Konecny y col., 1994; Al-Amshiki y col., 1998; Cochet y col., 1996]**.

2. METODOLOGÍA

2.1. MATERIALES

Se caracterizaron dos sueros de leche obtenidos por diferentes métodos de preparación. En una primera etapa, se trabajó con un suero de leche ácido y a manera de aplicación industrial, se realizaron experimentos con un suero suministrado por la empresa FRESKALECHE S.A.

2.1.1 Obtención del lactosuero ácido

La leche fue centrifugada a 4420 g (**IEC CL31R Multispeed, Thermo Scientific**) a temperatura ambiente durante 30 minutos para descremar la leche. El pH de la leche descremada fue ajustado a 4.7 por la adición lenta de HCl 5 M. Después de la precipitación de las Caseínas, la solución fue agitada durante 30 minutos adicionales en un agitador **Vortex** para completar la precipitación. Las Caseínas fueron removidas por centrifugación a 17700 g y 4 °C por 30 minutos. El suero obtenido fue diluido con agua destilada hasta una conductividad de 2.7 mS/cm. El pH fue reajustado a 4.7, y almacenado a 4 °C.

2.1.2 Obtención de suero FRESKALECHE S.A.

El lactosuero fue suministrado por la empresa FRESKA LECHE S.A. y fue obtenido de la siguiente forma:

Se inicia con la selección de la leche por parte del laboratorio de antibióticos el cual da el visto bueno para iniciar el proceso. Luego la leche es pasteurizada a 72 grados Celsius durante 15 minutos y la grasa es estandarizada del 2.8 al 3 %. La

leche es bombeada a una tina y es calentada a 38 grados celsius. A esta temperatura se le adicionan los cultivos lácticos dejándolos actuar durante una hora. Luego se le adiciona el cuajo y la leche se deja en reposo durante 45 minutos hasta su coagulación. La cuajada con el suero es bombeada a un equipo llamado pre-prensa: allí la cuajada es prensada para extraer la mayor cantidad de humedad o suero posible [freskaleche S.A.] el suero obtenido es denominado suero dulce.

2.1.3 Adecuación de los sueros

En el suero siempre se encuentran presentes partículas finas de caseína. Estas interfieren en el proceso de purificación de las inmunoglobulinas, por tal motivo deben ser previamente separadas. Para ello, se filtró el suero a través de un filtro de vidrio sinterizado de 0.45 μm de diámetro. Industrialmente este proceso se lleva a cabo mediante el uso de diferentes dispositivos tales como ciclones, separadoras centrifugas o filtros rotatorios.

2.2 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS SUEROS

Se midieron propiedades como pH, Conductividad y se observaron las propiedades organolépticas a los dos tipos de suero trabajados.

2.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS SUEROS

La concentración de proteína en el suero ácido y en el suero dulce se determinó utilizando el método espectrofotométrico de Bradford [Bradford, 1976]. La curva de calibración se elaboró con seroalbúmina bovina (BSA) para determinar las

concentraciones de proteína en un rango comprendido entre 0,1 y 1 mg/mL [Ver anexo 1].

2.4 CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS PRESENTES EN LOS SUEROS ÁCIDO Y DULCE

La determinación y caracterización de las proteínas se llevó a cabo por medio de electroforesis en 1 y 2 dimensiones usando los software Quantity One de Bio-Rad versión. 4.6.3 y PDQuest advanced de Bio-Rad versión 8.0.1.

Mediante electroforesis en una dimensión (1D), se caracterizaron las proteínas presentes de acuerdo con sus diferencias en peso molecular (PM).

Por medio de electroforesis bidimensional (2D) se caracterizaron las proteínas presentes en el lactosuero bovino de acuerdo con su punto isoeléctrico (pI).

2.5 PURIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS PRESENTES EN EL SUERO

La purificación de las proteínas se realizó en el suero dulce, ya que esta clase de suero es el generado por la mayoría de industrias productoras de queso.

2.5.1 Separación de proteínas presentes en el suero mediante precipitación fraccionada.

Se evaluó la precipitación fraccionada a diferentes valores de pH, los cuales fueron escogidos de acuerdo con el punto isoeléctrico de las inmunoglobulinas, con el fin de encontrar un valor de pH óptimo de precipitación de dichas proteínas,

los valores usados fueron 5,5; 6; 6,5, 7 unidades de pH. Estos valores fueron ajustados con ácido clorhídrico (HCl) 2 M.

Para la precipitación fraccionada de proteínas fueron usados 3 agentes precipitantes: sulfato de amonio, etanol y acetona.

Se usaron 6 muestras de lactosuero, cada una de 2mL, a las cuales se les adicionaron lentamente diferentes cantidades de sulfato de amonio (525 mg/L) con agitación constante con un **Vortex** y a una temperatura menor de 10°C, para favorecer la precipitación de las proteínas y obtener una concentración final de agente precipitante en las respectivas soluciones de 20, 30, 40, 50, 60 y 70% de saturación (Ver figura 6 y anexo D). Posteriormente, se centrifugaron las soluciones a 2896 g durante 15 minutos y se analizó el sobrenadante por electroforesis 1D para apreciar el grado de separación de las proteínas.

El precipitado fue re-disuelto con un buffer de fosfato 25 mM a pH 7 y se realizó la caracterización de las proteínas presentes por electroforesis monodimensional.

Figura 6. Precipitación de proteínas debido al incremento de la concentración del agente precipitante.

2.6 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

2.6.1 Soportes utilizados

Se usó el soporte aniónico DEAE-Sephacel.

Estas experiencias se llevaron a cabo en modo batch. No se empacaron columnas, sino que se observó el grado de adsorción y desorción de las proteínas en el soporte.

2.6.2 Acondicionamiento del soporte

En un montaje de filtración al vacío usando un embudo de filtro de vidrio sinterizado, se lavó 1 g de soporte con un buffer de empacado con el fin de eliminar el alcohol que preserva el soporte y de acondicionar el soporte al buffer de empacado.

Para equilibrar el soporte se adicionaron 20 mL de buffer fosfato 5 mM de pH 7.5 al embudo y se re-suspendió el soporte por 5 minutos usando una barra de agitación, posteriormente se aplicó succión para eliminar el buffer. Este proceso se repitió tres veces para garantizar que se equilibre el soporte.

El soporte se considera equilibrado cuando el pH y la concentración del buffer de empacado recogido en el Erlenmeyer (eluyente) sea igual al buffer de empacado adicionado al embudo. Posteriormente, se pesó 1g de soporte seco en balanza analítica directamente en el tubo donde se llevó a cabo la adsorción y desorción.

2.6.3 Adsorción de proteínas sobre soporte de intercambio ionic

Se usó una relación peso de soporte a volumen de muestra de 1:10. La concentración total de los 10 mL de muestra fue de 1 mg/mL con el fin de que no se saturara el gel. Para esto se diluyó la muestra con buffer fosfato 5 mM pH 7.5. Se mezcló en un tubo de 15 mL de polietileno y se dejó en agitación durante 2

horas en un Roller-Shaker para asegurar la correcta interacción de las proteínas con los grupos cargados del soporte a través de la dispersión más adecuada del mismo. Después de dos horas, se dejó decantar y se retiró el sobrenadante en el cual quedan las proteínas no adsorbidas por el soporte.

2.6.4 Desorción de proteínas sobre soporte de intercambio ionico

Se adicionó 1 mL de buffer fosfato 5 mM a pH 7.5 al tubo para resuspender el gel. Las proteínas fueron desorbidas mediante la acción de fuerza iónica, adicionando volúmenes crecientes de NaCl 2 M para obtener una concentración final de la matriz de 25 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 250 mM, 500 mM y 1000 mM. De cada solución desorbida con sal, se tomaron 100 μ L de muestra para cuantificar por el método de Bradford la proteína y identificar las proteínas por electroforesis SDS-PAGE.

2.7 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

El fraccionamiento de proteínas del suero de leche fue llevado a cabo usando el sistema de cromatografía líquida de baja presión (Biologic LP, Biorad) mostrado en la figura 7, con monitoreo UV a 280 nm, columnas (Glass econo-column, Biorad) de 1.5 cm de diámetro por 30 cm de largo y 1.5 cm de diámetro por 50 cm de largo.



Figura 7. Cromatógrafo líquido de baja presión (Biologic LP, Biorad), con las columnas empacadas, el colector de fracciones y el computador externo usado para graficar los cromatogramas.

2.7.1 Acondicionamiento del soporte

Se pesaron 7 g de Sephadex G-75 (1g de gel se hidrata de 12 a 15 mL) y se suspendieron en 1 L de Buffer fosfato salino (PBS) pH 7.4, dejándose hidratar (hinchar) por dos días.

2.7.2 Empacado de la columna

Se empacó la columna con la ayuda de una varilla de vidrio teniendo en cuenta por ningún motivo se secase la columna (el nivel de buffer en la columna debe ser siempre mayor al nivel de gel), y que el gel bajara lentamente por las paredes internas de la columna para que no se rompieran las esferas del gel. Después de empacado se compactó con un flujo de 6 mL/min de buffer fosfato salino (PBS).

La concentración de buffer, flujo de buffer, largo de la columna durante el proceso cromatográfico se seleccionaron de acuerdo con reportes de la literatura, y se usaron columnas de 30 cm y 50 cm de longitud, y 1.5 de diámetro (Glass econo-column, Biorad).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 PARÁMETROS ANALIZADOS DE LOS LACTOSUEROS BOVINOS

En la **tabla 4** se registran algunas propiedades de los sueros con el fin de establecer si es posible aplicar el método de purificación a cualquier tipo de suero.

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos tomados de los sueros de leche bovina.

Tipo de suero	Color	pH	Concentración de proteína (mg/mL)	Conductividad (mS/cm)
Suero casero	amarillo	6.7	3.65	5.69
Suero Freskaleche S.A.	amarillo	6.6	0.96	8.52
Suero ácido	Amarillo-verdoso	4.7	1.12	2.64

3.2 CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS PRESENTES EN EL LACTOSUERO BOVINO.

Mediante electroforesis SDS-PAGE 1D se caracterizaron las proteínas presentes en el lactosuero de acuerdo con sus diferencias en peso Molecular. En la **Figura 8** se puede apreciar las diferentes proteínas del lactosuero encontrándose las 6 proteínas reportadas en la literatura [**Hahn, 1998**]. Adicionalmente, se detectaron caseínas, debido a que el suero crudo queda con partículas de caseínas después del prensado [**Farrell y col, 2004**]. De la intensidad de las bandas se puede inferir que la concentración de las caseínas es baja, lo cual era previsible, debido a que

se había eliminado la mayor parte de estas proteínas durante el proceso para la obtención de queso (caseínas) a nivel industrial.

En la **tabla 5** se muestran los resultados de peso molecular obtenidos durante la caracterización del suero de leche. De la **figura 8** se obtienen los PMs de las proteínas comparándolas con las bandas de los marcadores de peso molecular mediante el uso del software Quantity one. En el anexo B se encuentra el análisis de bandas por el programa computacional.

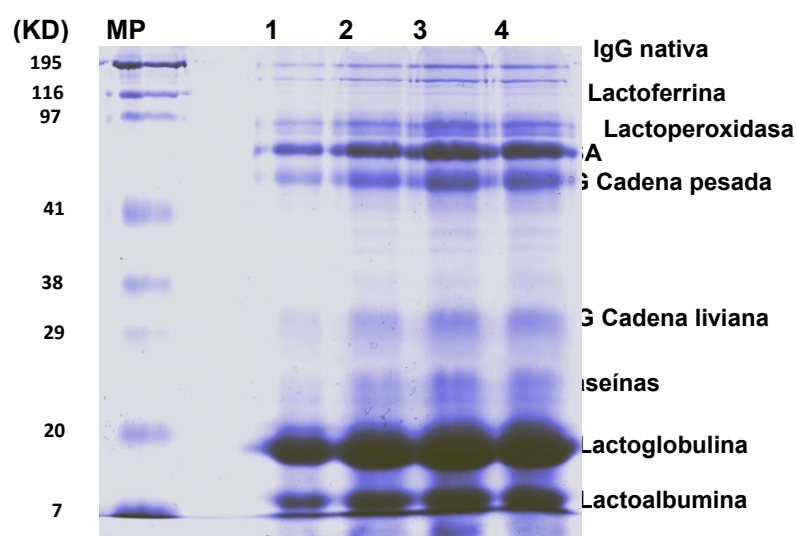


Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE de suero de leche bovino virgen con adiciones de diferentes volúmenes de mezcla 1:1 de suero bovino y buffer de carga en los pozos. MP: Marcador de peso molecular, Carril 1: Adición de 5 μ L, Carril 2: 10 μ L, Carril 3: 15 μ L, Carril 4: 20 μ L.

Tabla 5. Pesos moleculares de proteínas de lactosuero obtenidos con el software Quantity one.

Banda	Peso (KD)
IgG Nativa	148.99
Lactoferrina	91.50

Lactoperoxidasa	87.30
BSA	75.89
IgG cadena pesada	53.29
IgG cadena liviana	30.75
Caseínas	23.92
β -Lactoglobulina	15.19
α -lactoalbumina	8.72

Para demostrar que las bandas detectadas corresponden de IgG cadena pesada y liviana, se realizó una electroforesis en condiciones no denaturante (nativa), como se muestra en la **figura 9**. En ella se observa que las bandas de IgG pesada y liviana desaparecen por completo y se incrementa la intensidad de la banda de la IgG nativa, debido a que sin la adición de 2-mercaptoetanol y SDS la IgG se encuentra totalmente en forma nativa [**Konecny y col., 1994.**].

En este tipo de electroforesis no fue posible usar marcadores de PM, sin embargo, de la electroforesis de la **figura 8** se deducen cuales son las proteínas. En la **figura 9** se observa que la composición proteica del lactosuero bovino obtenido de forma casera y el suministrado por Freskaleche es muy semejante. Sin embargo, hay ausencia de la α -Lactoalbumina en el suero ácido, posiblemente esta proteína fue precipitada en la acidificación al llevarse a un pH inferior de 4.6.

Adicionalmente se observan unas bandas de intensidad media por encima de la banda de inmunoglobulina G nativa, las cuales posiblemente se deben a complejos del BSA con otras proteínas [**Wetzel, 1980.**].

Aunque la concentración de proteína obtenida en el análisis preliminar del suero casero es 3.8 veces mayor, en la intensidad de bandas de la electroforesis no se refleja esa diferencia. Esta diferencia no se ve reflejada porque la elevada

concentración de proteína en el suero casero es debida a las caseínas que quedan en suspensión. Sin embargo, estas son removidas al ser retenidas en la filtración con el filtro de vidrio sinterizado antes de la electroforesis disminuyendo así considerablemente la concentración de proteína [Swaisgoo, 1993].

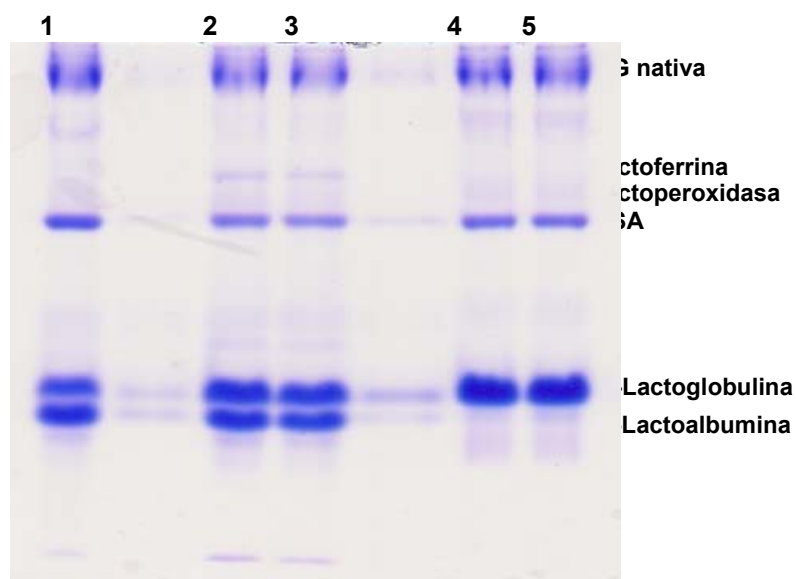


Figura 9. Electroforesis en condiciones nativas de suero de leche bovino, Carril 1: suero bovino obtenido usando pastilla de cuajo (casero) filtrado, Carril 2,3: Suero de leche proveído por Freskaleche S.A.filtrado, Carril 4,5: Suero de leche obtenido por acidificación con HCl 5M filtrado.

De la electroforesis bidimensional mostrada en la **figura 10**, se obtuvieron los puntos isoeléctricos de las proteínas del lactosuero como se muestran en la tabla 6, los cuales se tuvieron en cuenta para el método de purificación.

IgG nativa

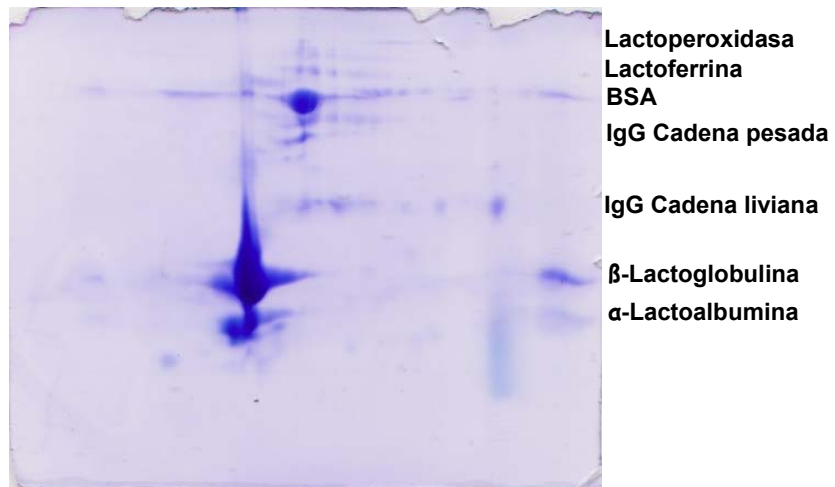


Figura 10. Electroforesis Bidimensional del lactosuero bovino.

En el **anexo 2** se muestra el marcador de punto isoelectrico usado para determinar los puntos isoelectricos del lactosuero bovino del gel de electroforesis bidimensional de la **figura 10**.

Tabla 6. Puntos isoelectricos de proteínas del lactosuero obtenidos mediante PD-Quest.

Banda	pI
IgG Nativa	5,6-7,3
Lactoferrina	8-9
Lactoperoxidasa	9.5
BSA	4.8-5.0
β-Lactoglobulina	5.2-5.4
α-lactoalbumina	4.4-4.8

3.3 PRECIPITACIÓN FRACCIONADA

La precipitación fraccional se llevó a cabo a pH 5, 5.5, 6, 6.5, y 7. Sin embargo, no se observó ninguna diferencia en los perfiles de purificación. A medida que se

aumentó la concentración del agente precipitante, se iban precipitando todas las proteínas a la vez, debido a que los agentes precipitantes no fueron selectivos como se puede apreciar en la electroforesis SDS-PAGE de la **figura 11**, realizada a los sobrenadantes de las 7 soluciones de diferente concentración usando etanol como agente precipitante.

Esto es debido muy posiblemente a que las proteínas interaccionaron con la BSA formando complejos que los agentes precipitantes solvataron hasta su precipitación [Jang y Swaisgood, 1990].

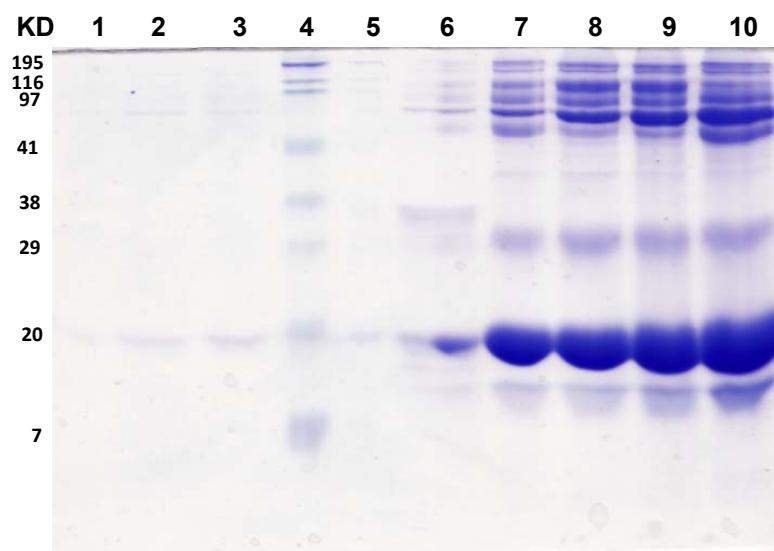


Figura 11. Electroforesis SDS-PAGE realizada al sobrenadante obtenido en la precipitación fraccionada con etanol. Carril 1: Sobrenadante solución al 70%. Carril 2: Sobrenadante solución al 60%. Carril 3: Sobrenadante solución al 50%. Carril 4: Marcador de peso molecular. Carril 5: Contaminación. Carril 6: Contaminación. Carril 7: Sobrenadante solución al 40%. Carril 8: Sobrenadante solución al 30%. Carril 9: Sobrenadante solución al 20%. Carril 10: Sobrenadante solución al 10%.

3.4 ADSORCIÓN Y DESORCIÓN DE PROTEÍNAS SOBRE SOPORTES DE INTERCAMBIO IÓNICO

Con los valores de los puntos isoelectricos obtenidos de la electroforesis bidimensional (**ver tabla 6**), se escogió el pH de trabajo.

Se trabajó con buffer fosfato 5mM a pH 7.5 para dispersar y equilibrar el soporte. Se escogió este pH estratégicamente ya que a pH 7.5 la inmunoglobulina G tendría una carga neta negativa debido a que este pH es superior al punto isoelectrico de la misma [**Hahn, 1998**], con lo cual garantizábamos que nuestra proteína de interés se adsorbiera, debido a que la carga neta del soporte es positiva como se muestra en la **figura 4**.

Las proteínas β -Lactoglobulina, α -lactoalbumina y BSA, se deberían adsorber debido a que su carga neta a este pH es negativa [**Hahn, 1998**], por lo que deberían quedar en el soporte.

Las proteínas Lactoferrina y Lactoperoxidasa no deberían adsorberse en el soporte y quedar en el sobrenadante, ya que a este pH la carga neta de estas proteínas es positiva igual que el soporte [**Mehra y col. 2006**], [**Wolman y col., 2007**], [**Al-Mashikhi y col., 1988**].

En el carril 7 de la **figura 12** se observa que todas las proteínas del lactosuero quedaron en el sobrenadante y no fueron adsorbidas en el soporte aniónico DEAE-Sephacel. Sin embargo, en la desorción (carril 1, 2, 3, 8, 9 y 10 de la figura 12) todas las proteínas del lactosuero están presentes, lo que indica que las proteínas si fueron adsorbidas pero muy posiblemente se saturó el soporte por una alta concentración de proteína [**Fernández y col., 2000**], [**Instructions 71-7100-00 AC**].

En los carriles 1, 2, 3, 8, 9 y 10 de la **figura 12**, se observan las proteínas desorbidas del soporte. No se observó ninguna selectividad en la desorción, debido a que todas las proteínas se eluyeron al incrementar la fuerza iónica con la adición de concentraciones crecientes de NaCl.

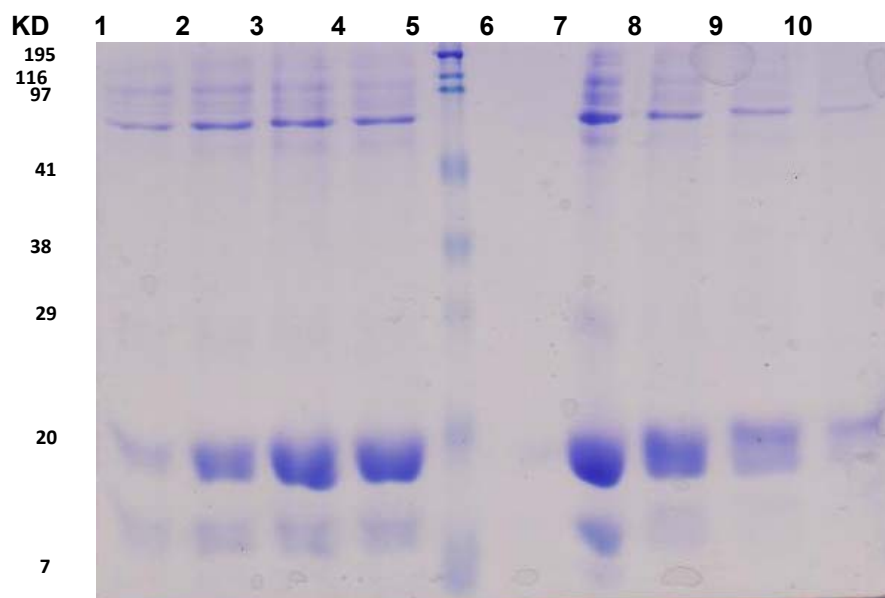


Figura 12. Electroforesis SDS-PAGE de la adsorción y desorción de proteínas del lactosuero bovino. Carril 1: Proteínas desorbidas a 25mM. Carril 2: Proteínas desorbidas a 50mM. Carril 3: Proteínas desorbidas a 100mM. Carril 4: Marcador de peso molecular Proteínas desorbidas a 200mM. Carril 5: Marcador de peso molecular. Carril 6: no se sembró. Carril 7: Sobrenadante. Carril 8: Proteínas desorbidas a 250mM. Carril 9: Proteínas desorbidas a 500mM. Carril 10: Proteínas desorbidas a 1000mM.

Con el fin de que no existiera saturación del soporte por parte de las proteínas del lactosuero, se adicionaron 2 gramos de soporte por cada 10 mL de muestra de concentración final 0,5 mg/mL. Como se muestra en la electroforesis de la **figura 13**, los resultados obtenidos tienen el mismo perfil de la desorción en relación soporte concentración de proteína 1:10.

Probablemente, no se absorbieron ni desorbieron selectivamente las proteínas desde el soporte, debido a la capacidad que tiene la BSA de interactuar con las proteínas [Jang y Swaisgood, 1990], formando complejos, los cuales fueron adsorbidos y desorbidos del soporte de forma simultánea.

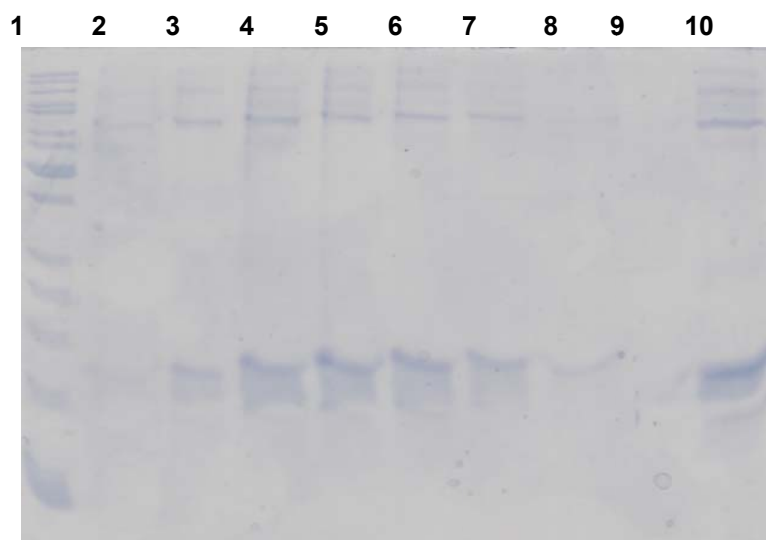


Figura 13. Electroforesis SDS-PAGE de la adsorción y desorción de proteínas del lactosuero bovino. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Proteínas desorbidas a 25mM. Carril 3: Proteínas desorbidas a 50mM. Carril 4: Proteínas desorbidas a 100mM. Carril 5: Proteínas desorbidas a 200mM. Carril 6: Proteínas desorbidas a 250mM. Carril 7: Proteínas desorbidas a 500mM. Carril 8: Proteínas desorbidas a 100mM. Carril 9: Contaminación. Carril 10: Sobrenadante.

De las **figuras 14 y 15** se observa que la máxima desorción de proteínas del soporte se da a una concentración de 100 mM, lo cual es corroborado con la intensidad de bandas de las electroforesis SDS-PAGE, carril 3 de la **figura 12** y carril 4 del **figura 13**.

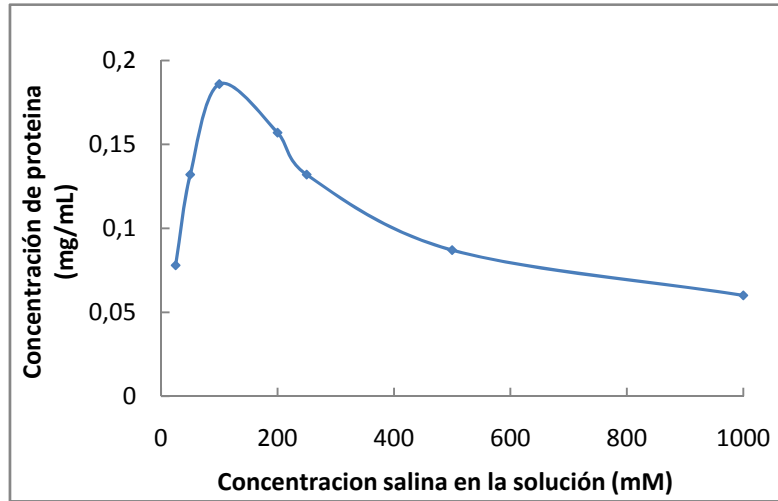


Figura 14. Desorción de proteínas del soporte DEAE-Sepharcel incrementando la fuerza iónica.

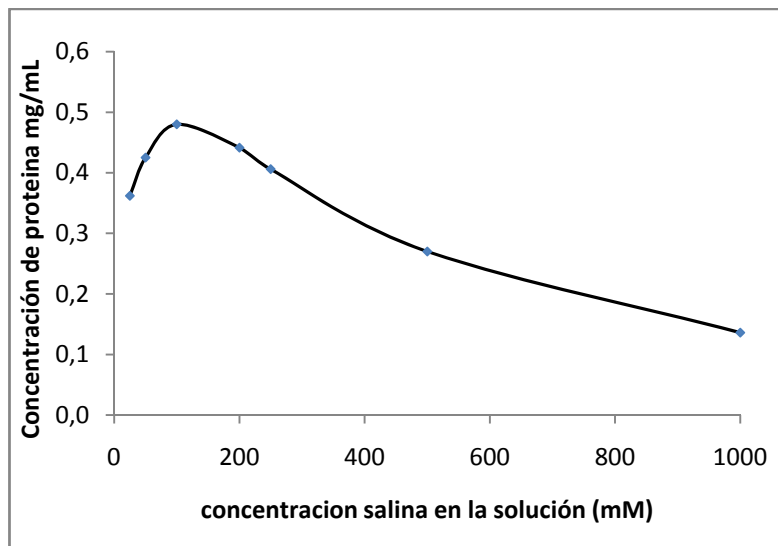


Figura 15. Desorción de proteínas del soporte DEAE-Sepharcel incrementando la fuerza iónica.

3.5 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

En estos estudios, el soporte Sephadex G-75 tiene un límite de exclusión comprendido entre 3 y 80 KD, por lo que proteínas con más de 80 KD no pueden penetrar en los poros de las partículas de la matriz y eluirían con más rapidez que la proteínas más pequeñas que ingresan en los poros de la matriz [**Horneman y col., 2007**].

La IgG tiene un peso molecular alrededor de 150 KD, con lo cual no podría ingresar en los poros del soporte y eluiría con mayor rapidez, con lo que aparecería un primer pico en el cromatograma junto con la lactoferrina y lactoperoxidasa. Sin embargo, el primer pico del cromatograma de la **figura 16** pertenece a una mezcla de proteínas compuesta por Inmunoglobulinas, BSA, Lactoferrina y Lactoperoxidasa, tal como se observa en el carril 5 de la electroforesis SDS-PAGE de la **figura 17**.

El BSA tiene un peso molecular inferior a 80 KD [**Hahn, 1998**], por lo cual debería ingresar en los poros y retenerse más tiempo en la columna, sin embargo, debido a las interacciones que este puede tener con las otras proteínas [**Jang y Swaisgood, 1990**], posiblemente formó complejos de peso molecular superior a 80 KD entre estas proteínas. De esta forma, no ingresó en los poros de la matriz y eluyó en el primer pico junto con las demás proteínas.

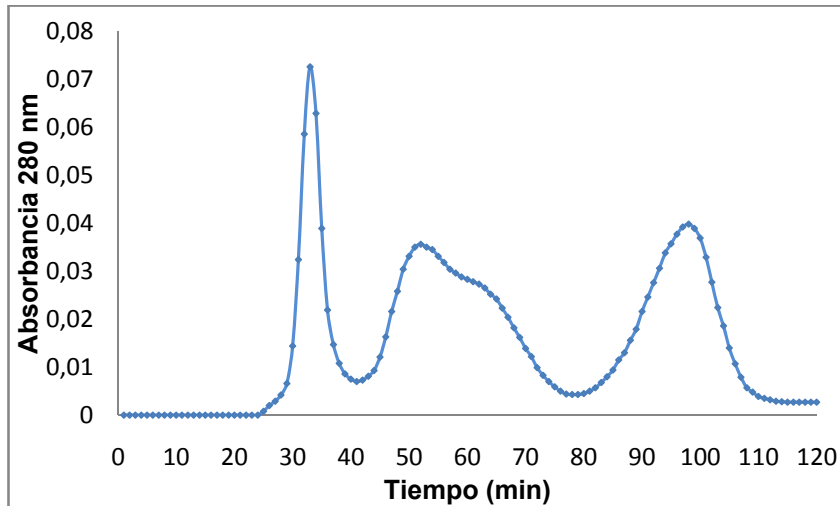


Figura 16. Cromatograma de exclusión molecular, columna de 50 cm empacada con Sephadex G-75 y flujo de elución de 1mL/min.

Aunque no se encuentre pura la IgG, la remoción de β -Lactoglobulina y α -Lactoalbumina es del 100% para el primer pico, lo cual es muy importante debido a las grandes aplicaciones que tienen estas proteínas.

En el carril 3 de la **figura 17** correspondiente al pico 2, se observa que el mayor porcentaje de proteína es la β -Lactoglobulina.

En el carril 4 de la **figura 17** correspondiente al pico 3 del cromatograma de la **figura 16**, se observa una mezcla de β -Lactoglobulina, α -Lactoalbumina y en muy baja concentración BSA. Sin embargo, la β -Lactoglobulina y α -Lactoalbumina pueden ser fácilmente separadas pasándose por una segunda columna de exclusión molecular de un menor diámetro de poro, como la sephadex G-50, la cual tiene un rango de 1.5- 30 KD. De esta forma tanto la β -Lactoglobulina, como la α -Lactoalbumina debido a su tamaño ingresan en los poros y se esperaría obtener una muy buena separación.

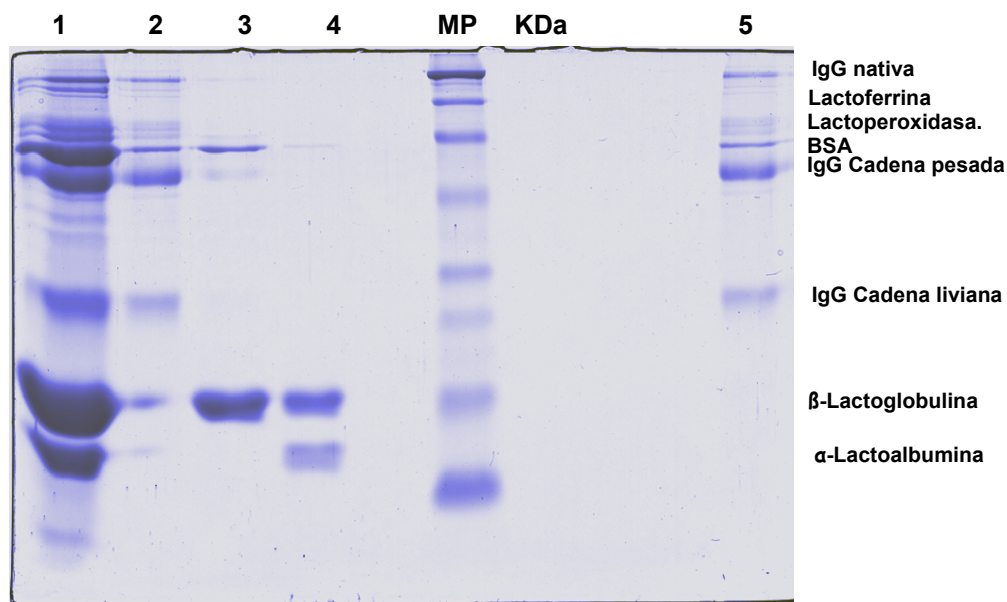


Figura 17. Electroforesis SDS-PAGE de los picos del cromatograma de exclusión molecular Sephadex G-75. Carril 1: Lactosuero bovino. Carril 2: Pico # 1. Carril 3: pico # 2. Carril 4: Pico # 3. Carril 5: Pico # 1. MP: Marcador de peso molecular.

Esta mezcla de proteínas se debe a la capacidad del BSA para actuar recíprocamente con muchos compuestos y proteínas **[Jang y Swaisgood, 1990]**. Además, Jang y Swaisgood sugieren que el calor induce la formación de complejos de BSA con otras proteínas por medio de la formación de puentes disulfuro. Wetzel **[Wetzel, 1980]** profundizó en estos estudios y planteó que el grupo sulfhidrilo libre de la cisteína-34 del BSA está involucrado en la formación de agregados estables y estructuras irreversibles formadas por enlaces disulfuros.

Sin embargo, estudios realizados por Sangsuk Oh y Tom Richardson **[Sangsuk Oh y Tom Richardson, 1991]**; Soltis **[Soltis et al, 1979]** han mostrado que la formación de dichos complejos es menor cuando se calientan las proteínas en la matriz de la leche, aparentemente porque esta matriz actúa como un inhibidor de la formación de los complejos covalentes.

Esto es corroborado observando la **figura 17** la BSA sale como contaminante hasta en el ultimo pico lo cual solo es posible si eluye junto con proteínas de menor tamaño molecular.

Como no se había alcanzado la purificación de la inmunoglobulina G, se probó el uso de surfactantes no iónicos (Tween 20, C₁₂E₂₃) para buscar obtener una mayor separación de IgG y BSA [**Horneman y col., 2007**]. Aunque no era suero bovino y ellos no tuvieron en cuenta la matriz sino que trabajaron con una mezcla de estas dos proteínas disueltas en buffer, el principio de la formación de micelas por parte del BSA con el tween es el mismo [**Horneman y col., 2004**].

Efectivamente el surfactante no iónico favoreció la purificación de las inmunoglobulinas, tal como se puede apreciar en el gel de electroforesis de la **figura 18** hay ausencia de la banda del BSA.

El frente de corrido de la electroforesis de la **figura 18** no se ve claro como los demás geles, debido a que el tween 20 baja la resolución de la electroforesis SDS-PAGE [**Pérez, 2000**]. Adicionalmente, no fue posible obtener un cromatograma representativo, ya que el tween 20 adsorbe a 280 nm al igual que las proteínas y por esta razón el cromatograma obtenido no es representativo ver **anexo 4**.

Finalmente, se trató de cuantificar las proteínas de las fracciones obtenidas por el método colorimétrico de Bradford pero no fue posible debido a que los tensoactivos son una de las interferencias de este método [**Bradford, 1976**], obteniéndose concentraciones altísimas debido a la reacción del reactivo de Bradford con el tween 20.

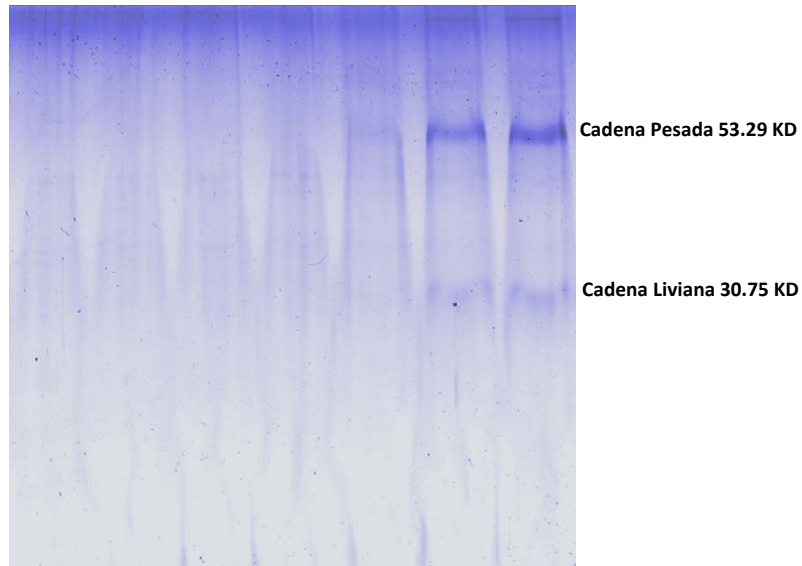


Figura 18. Electroforesis SDS-PAGE purificación de inmunoglobulina G usando cromatografía de exclusión molecular empacada con Sephadex G-75 usando tween 20 al 10% como eluyente. [Horneman y col.,, 2007].

Para obtener información sobre la corrida cromatográfica, se hizo un barrido de electroforesis SDS-PAGE (**Figura 18**) a las fracciones impares donde sería más probable que saliera la IgG, basado en las fracciones donde salió el primer pico para el cromatograma sin tween 20.

Efectivamente se logró purificar la IgG del lactosuero bovino gracias a la formación de micelas del BSA con el Tween 20 [Horneman y col., 2004] las cuales debilitaron las interacciones existentes entre la IgG y el BSA.

El tween 20 compitió con las demás proteínas que interaccionaban con el BSA y debido a que estaba en mayor concentración formó micelas con el BSA y rompió las interacciones de éste con las demás proteínas, dejando así la IgG libre para que eluyera con mayor rapidez. [Roosmalen y col., 2004].

4. CONCLUSIONES

La precipitación fraccional de proteínas no es un buen método para purificar proteínas del suero bovino debido a que la interacción del BSA con las proteínas forma conglomerados que hacen que se precipiten todas las proteínas de forma no selectiva. Además, este método no es ventajoso en la purificación de proteínas a escala industrial.

En la purificación por exclusión molecular de forma directa no se obtuvieron buenos resultados debido a la capacidad del BSA para actuar recíprocamente con las demás proteínas presentes en el lactosuero bovino. Sin embargo estas interacciones se lograron disminuir usando tween 20 para obtener una mayor separación y por ende mayor rendimiento de purificación de Inmunoglobulinas.

Se demostró mediante la electroforesis SDS-PAGE realizada a los picos máximos del cromatograma, que el BSA interacciona con las demás proteínas presentes en el lactosuero bovino, ya que eluyó durante toda la corrida cromatográfica.

Se logró purificar con cierto grado de pureza la β - Lactoglobulina, la cual debido a que es fisiológicamente activa (actividad antimicrobiana y antiviral), le da un valor agregado aún mayor al presente trabajo.

RECOMENDACIONES

Para efectos prácticos de manejo y para calcular el rendimiento de los métodos de purificación, es importante liofilizar el lactosuero bovino y tener un patrón de las proteínas presentes en el suero de leche.

Determinar la actividad inmunológica de la inmunoglobulina G después de la purificación y compararla con inmunoglobulina pura para saber si la actividad permanece invariable.

A nivel industrial sería interesante acoplar esta purificación a otro proceso de aprovechamiento de lactosuero bovino con el fin de que este no sea vertido sobre las fuentes hídricas de nuestro país.

BIBLIOGRAFIA

- Agrocadenas. (2004). Estadísticas agroindustria láctea en Colombia. Observatorio de competitividad agrocadenas. http://www.agrocadenas.gov.co/lacteos/lacteos_reportes.htm. 11 de mayo de 2009.
- Ahrer, K. and Jungbauer, A. (2006). Chromatographic and electrophoretic characterization of protein variants. *Journal of Chromatography B*, 841: 110–122.
- Al-Mashikhi, S., Li-Chan, E. and Nakai, S. (1988). Separation of immunoglobulins and lactoferrin from cheese whey by chelating chromatography. *Journal of Dairy Science*, 7:1747–1755.
- Astrup, T., Birch-Andersen, A., and Schilling, K. (1954). Fractional precipitation of serum proteins by means of specific anions. *Acta Chem. Scand.* 8: 901-908.
- Atra, R., Vatai, G., Molnar, E. and Balint; A. (2005). Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *Journal of Food Engineering*: 67 (3): 325-332.
- Baker, H. and Baker, E. (2004). Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release. *Biometals*, 17(3): 209-216.
- Ben-Hassan, R. and Ghaly, A. (1994). Continuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey for production potential reduction. *Applied Biochemistry and Biotechnology Journal*. 44 (3): 89-105.
- Berkelman, T., Stenstedt, T. (1998). 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients. Principles & methods. Amersham Pharmacia Biotech Inc.
- Bos, C., Gaudichon, C. and Tomé, D. (2000). Nutritional and Physiological Criteria in the Assessment of Milk Protein Quality for Humans, *Journal of the American College of Nutrition*, 19(2): 191-205.

- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brião, V. (2007). Processos de separação por membranas para reuso de efluentes de laticínios, Tesis de Doutorado, Dpto. Eng. Química, UEM, Maringá, Brasil.
- Chierici, R., Sawatzki, G., Tamisari, L., Volpato, S. and Vigi, V. (1992) Supplementation of an adapted formula with bovine lactoferrin. 2. Effects on serum iron, ferritin and zinc levels. *Acta Paediatrica*, 81(6-7): 475-479.
- Clare, D. and Swaisgood, H. (2000). Bioactive Milk Peptides: A prospectus, *Journal of Dairy Science*, 83: 1187-1195.
- Cochet, S., Pestliakas, H., Cartron, J. and Bertrand, O. (1996). Chromatography of bovine lactoserum on the immobilized metallized dye Drimarene Rubine R/K 5BL. Modulation of selectivity by metal exchange and application to purification of milk immunoglobulins. *Journal of Chromatography A*, 725: 237-247.
- Colomban, A.; Roger, L: and Boyabal, P. (1993). Production of propionic acid from whey permeate by sequential fermentation, ultrafiltration and cell recycling. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 1091-1098.
- Considine, T., Patel, H., Anema, S., Singh, H., Creamer, L. (2006). Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments. 8: 1-23.
- Cornish, J., Palmano, K., Callon, K., Watson, M., Lin, J. and Valenti, P. (2006). Lactoferrin and bone–Structure activity relationships. *Biochemistry and Cell Biology*, 84: 297–302.
- Cruz, M. (2007). La mastitis bovina y su impacto en la calidad de la leche. *Rev. Entorno Ganadero*, 25: 70-76.

- Davidson, G., Daniels, E., Nunan, H., Moore, A. and Whyte, P. (1989). Passive immunisation of children with bovine colostrum containing antibodies to human rotavirus. *Lancet*, 2: 709–712.
- Domingues, L.; Lima, N. and Teixeira, J. (2001). Alcohol production from cheese whey permeate using genetic modified flocculating yeast cells. *Biotechnol. Bioeng.* 72: 507-514.
- El-Holi, M. and Al-Delaimy, K. (2003). Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger*. *African J. Biotechnol.* 2 (10): 356-359.
- El-Samragy, Y., Khorshid, M., Foda, M. and Shenata, A. (1996). Effect of fermentation conditions on the production of citric acid from cheese whey by *Aspergillus niger*. *Int. J. Food Microbiol.* 29 (2-3): 411-416.
- El-Hawary, F. and Mehanna, A. (1991). Production of single cell protein from yeast grown in whey. *Acta Alimentaria.* 20: 205-213.
- Farrell, H., Jimenez-Flores, R., Bleck, T., Brown, E., Butler, E., Creamer, K., Hicks, L., Hollar, M., Ng-Kwai-Hang, F. and Swaisgood, E. (2004). Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal of Dairy Science*, 87(6): 1641-1674.
- Fernández, G., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., and Guisán, J. (2000). Multifunctional epoxy supports: A new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules*, 1: 739-745.
- Fernández-Lafunete, R., Rosell, C., Rodríguez, V. and Santana, C. (1993). Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme and Microbial Technology*, 15: 546-550.

- Fuentes, M., Pessela, B., Guisán, J.M., and Fernández-Lafuente, R. (2005). Purification, stabilization and concentration of weak protein-complexes: Shifting the association equilibrium via selective adsorption on lowly activated supports. *Proteomics*, 15, 4062- 4069.
- Fuentes, M., Pessela, B., Munilla, R., Guisán, M. and Fernández-Lafuente, R. (2004). Detection and purification of two antibody-antigen complexes via selective adsorption on lowly activated anion exchangers. *Journal of Chromatography A*, 1059, 89-94.
- García, M.; Gómez, L. and Bárzana, E. (1987). Studies on the simultaneous production of single-cell protein and endopolygalaturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnol. Let.*, 9 (6): 411-416.
- Garfín, D. (1990). One dimensional gel electrophoresis. *Methods in enzymology*. Academic press, 182.
- Gallagher, S. and Smith, J. (1995). One dimensional gel electrophoresis of proteins. In *current protocols in molecular Biology Unit 10.2* (Ausubel, F. et al., eds.) Wiley-Interscience, New York.
- Ghaly, A. and El-Taweel, A. (1995). Effect of nutrient supplements addition on ethanol production from cheese whey using *Candida pseudotropicalis* under batch conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology Journal*, 53 (1): 107-132.
- Gómez, C.; González, H. and Gallón M. (1999). Proceso biotecnológico para la obtención de una bebida refrescante y nutritiva. *Comunicaciones*, 24(2): 205-210.
- Gonzáles, M. (1994). Galactosidase production by *Kluyveromyces lactis* on milk whey: batch versus fedbatch cultures. *Proc. Biochem.*, 29 (7): 565-568.
- Goodall, S., Grandison, A., Jauregui, J. and Price, J. (2008). Selective separation of the major whey proteins using ion exchange membranes. *Journal of Dairy Science*, 91(1): 1-10.

- Görg, A., Boguth, G., Obermaier, C., Posch, A. and Weiss, W. (1995). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): The state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis*, 16: 413-423.
- Grba, S., Stehlik-Tomas, V., Stanzer, D., Vah, I. and Krlin, A. (2002). Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for alcohol and biomass production on whey. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 16 (1):13-16.
- Hahn, R., Schulz, P., Schaupp, C. and Jungbauer, A. (1998). Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 795: 277–287.
- Hashimoto, P. (2007). Estudio de factibilidad para la aplicación de un sistema de inocuidad de alimentos, basado en la normatividad nacional hondureña, en una planta agroindustrial de jugos de fruta a base de lactosuero dulce. Tesis de maestría, Universidad para la cooperación internacional, San José, Costa Rica.
- Hidalgo, J. and Hansen, P. (1971). Selective precipitation of whey proteins with carboxymethylcellulose. *Journal of Dairy Science*, 54: 1270-1274.
- Horneman, D., Ottens, M. and Keurentjes, J. (2007). Surfactant-aided size-exclusion chromatography for the purification of immunoglobulin G. *Journal of Chromatography A*, 1157, 237–245.
- Horneman, D., Wolbers, M., Zomerdijk, M., Ottens, M., Keurentjes, J. and Wielen, L. (2004). Surfactant-aided size exclusion chromatography. *Journal of chromatography B*, 807: 39-45.
- Hosseini, M.; Shojaosadati, S. and Towfighi, J. (2003). Application of a bubble-column reactor for the production of a single-cell protein from cheese whey. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 42: 764-766.
- Huggins, A. (1984). Progress in dairy starter culture technology. *J. Food Technol.*, 38 (6): 41-50.

- Huang, Y. and Yang, S. (1998): Acetate Production from whey lactose using co-immobilized cells of homolactic and homoacetic bacteria in a fibrous-bed bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 60 (4): 498-507.
- Instructions 71-7100-00 AC. (2006). DEAE-sephacel ion exchange. GE Healthcare.
- Jang, H. and Swaisgood, H. (1990). Disulfide bond formation between thermally denatured B-lactoglobulin and k-casein in casein micelles. *J. Dairy Sci.*, 73: 900.
- Jelen, P. (1979) Industrial whey processing technology: An Overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27: 658-661.
- Jimenez, J. and García, M. (2006). Propiedades Nutracéutica de las proteínas del suero de leche. *Carnilac industrial*, 22-27.
- Konecny, P., Brown, P. and Scouten, W. (1994). Chromatographic purification of immunoglobulin G from bovine milk whey. *Journal of Chromatography A*, 673: 45-53.
- Lamboley, L., Lacroix, C., Champagne, C. and Vuillemand, J. (1997). Continuous mixed strain mesophilic lactic starter production in supplemented whey permeate medium using immobilized cell technology. *Biotechnol. Bioeng.*, 56: 502-506.
- Lee, P., Lee, W., Know, S., Lee, S. and Chang, H. (2000). Batch and continuous cultivation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* for the production of succinic acid from whey. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 23-27.
- Léonil, J. and Maubois, J. (2002). Milk-derived Bioactive Peptides and Proteins: Future Perspectives, *Proceedings of the 26th International Dairy Congress, Paris, France.*
- Levay, P. and Viljoen, M. (1995) Lactoferrin: A general review. *Haematologica*, 80(3): 252-267.

- Levison, P. (2003) Large-scale ion-exchange column chromatography of proteins Comparison of different formats. *Journal of Chromatography B*, 790: 17–33.
- Ling, J. and Schryvers, A. (2006). Perspectives on interactions between lactoferrin and bacteria. *Biochemistry and Cell Biology*, 84(3): 275-281.
- Lönnerdal, B. and Iyer, S. (1995). Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annual Reviews of Nutrition*, 15(7): 93-110.
- Lovrien, R., Goldensoph, C., Anderson, P. and Odegaard, B. (1987). Three phase partitioning (TPP) via *t*-butanol: Enzyme separation from crudes. In *protein Purification: Micro to Macro* (R. Burgess, ed.), p. 131-148. Alan R. Liss, New York.
- Marshall, K. (1982). *Developments in dairy chemistry*, (Fox, P. Ed.), Applied Science Publ., London, 1 (11): 339.
- Mehra, R., Marnila, P. and Korhonen, H. (2006). Milk immunoglobulins for health promotion. *International Dairy Journal*, 16: 1262-1271.
- Meisel, H. (2002). Milk Protein-Derived Peptides as Potentially Bioactive Components of Cheese, *Proceedings of the 26th International Dairy Congress*, Paris, France.
- Meisel H. and Schlimme, E. (1990). Milk Proteins: Precursors of Bioactive Peptides, *Trends in Food Science & Technology*, 1:41-43.
- Militello, V., Vertí, V. and Leone, M. (2003). Conformational changes involved in thermal aggregation processes of bovine serum albumin. *Biophys. Chem.*, 105: 133-141.
- Mourier, A., Bigard, X., Kerviler E., Roger, B., Legrand, H. and Guezennec, C. (1997). Combined Effects of Caloric Restriction and Branched-Chain Aminoacid Supplementation on Body Composition and Exercise Performance in Elite Wrestlers, *International Journal of Sports Medicine*, 18: 47-55.

- Mucchetti, P., Taglietti, M. and Neviani, E. (1993). Whey ultrafiltration: Evaluation of protein retention with different membranes. *Italian Journal of Food Science*, **2**: 99–106.
- Muñi, A. (2005). Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/nanofiltración tangencial em serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero, *Revista Científica*, **15** (4): 361-367.
- Nakay, S. and Modler, W. (2000). *Food Proteins: Processing Applications*. Wiley-VCH, Inc., United States of America.
- Nibbering, H., Ravensbergen, E., Welling, M., van-Berkel, A., van-Berkel P., Pauwels, E. and Nuijens, J. (2001). Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic resistant bacteria. *Infection and Immunity*, **69**(3): 1469-1476.
- O'Farrell, P. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, **250**: 4007-4021.
- Ohashi, A., Murata, E., Yamamoto, K., Majima, E., Sano, E., Le, Q. and Katunuma, N. (2003). New functions of lactoferrina and β -casein in mammalian milk as cysteine protease inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **306**(1): 98-103.
- Orsi, N. (2004). The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals*, **17**(3): 189-196.
- Pérez, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Revista Cubana de Universo diagnostico*; **1**(2): 31-41.
- Pessela, B., Betancor, L., Fuentes, M., Alfonso, M. and Guisán, J. (2004). Ion exchange using poorly activated supports, an easy way for purification of large proteins. *Journal of Chromatography A*, **1034**: 155-159.

- Pierre, J., Fontecave, M. and Crichton, R. (2002). Chemistry for an essential biological process: the reduction of ferric ion. *Biometals*, 15(4): 341-346.
- Philanto-Leppälä, A. (2001), Bioactive Peptides Derived from Bovine Whey Proteins: Opioid and ACE-Inhibitory Peptides, *Trends in Food Science and Technology*, 11: 347-356.
- Rech, R., Cassini, C., Secchi, A. and Ayub, M. (1999). Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *J.Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23(2): 91-96.
- Righetti, P., Bossi, A. and Gelfi, C. (1998). Conventional isoelectric focusing in gel slabs, in capillaries, and immobilized pH gradients. In *Gel Electrophoresis of Proteins. A practical Approach* 3rd ed. (Hames, B. D., ed.). Oxford University Press, New York, p. 127- 187.
- Roosmalen, D., Mathew, J., Lazzara, L., Broeke, J. and Keurentjes, D. (2004). Protein partitioning driven by excluded-volume interactions in an aqueous nonionic micellar- gel system. *Biotechnology and bioengineering*, 87(6): 695-703.
- Rossano, R., D'Elia, A. and Riccio, P. (2001). One Step Separation from Lactosa: Recovery and Purification of Major Cheese-Whey Proteinas by hydroxyapatite- A flexible procedure suitable for small- and medium- Scale preparations. *Protein Expression and Purification*, 21:165–169.
- Rothstein, F. (1994). Differential precipitation of proteins. *Protein purification process engineering* (R.G. Harrison, Ed.). Marcel Dekker, New York. p. 115-208.
- Sanchez, O., Ortiz, M. and Betancourt, A. (2004). Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación con *Aspergillus* spp. *Revista Colombiana de biotecnología*, 6(1): 43-54.

- Sangsuk, O. and Richardson, T. (1991). Heat-Induced Interactions of Bovine Serum Albumin and Immunoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 74(6): 1786-1790.
- Schanbacher, F., Talhouk, R. and Murray, F. (1997). Biology and origin of bioactive peptides in milk, *Livestock Production Science*, 50: 105-123.
- Schulz-Lell, G., Dorner, K., Oldigs, H., Sievers, E. and Schaub, J. (1991). Iron availability from an infant formula supplemented with bovine lactoferrin. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 80(2): 155-158.
- Scopes, R. (1987). *Protein Purification: Principles and Practice*, 2nd ed., (Springer-Verlag, ed.), New York, p. 45-54.
- Shah, N. (2000). Effects of milk derived bioactives: an overview, *British Journal of Nutrition*, 84(1): 3-10.
- Shi, Q. (1998). One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In *Gel Electrophoresis of proteins: A Practical Approach* 3rd ed., (Hames, B., ed.), Oxford University Press, New York, p 1-52.
- Silva, S. and Malcata, F. (2005). Caseins as Source of Bioactive Peptides, *Internacional Dairy Journal*, 15: 1-15.
- Skudder, P. (1985). Evaluation of a porous silica based ion-exchange medium for the production of protein fractions from rennet-and acid-whey. *Journal of Dairy Research*, 52: 167-181.
- Slade, C. (2000). Molecular (or bio-) imprinting of bovine serum albumin. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 9: 97-105.
- Soltis, R., Hasz, D., Morris, M. and Wilson, D. (1979). The effect of heat inactivation of serum on aggregation on immunoglobulins. *Immunology* 36: 37-42.
- Swaisgoo, H. (1993). Review and update of casein chemistry. *Journal of Dairy Science*, 76(10): 3054-3061

- Talabardon, M., Schwitzguébel, J. and Péringer, P. (2000). Anaerobic thermophilic fermentation for acetic acid production from milk permeate. *Journal of biotechnology*, 76: 83-92.
- Tejayadi, S. and Cheryan, M. (1995). Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43(2): 242-248.
- Tomita, M., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S. and Hayasawa, H. (2002). Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochemistry and Cell Biology*, 80(1):109-112.
- Trujillo, M., Suárez, F. and Gallego, D. (1998). Fermentación láctica en continuo a partir de suero dulce de leche desproteinizado. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 1(1):45-50.
- Tsuda, H., Sekine, K., Fujita, K. and Iigo, M. (2002). Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanisms, a review of experimental and clinical studies. *Biochemistry and Cell Biology*, 80(1): 131-136.
- Vaiana, S., Emanuele, A.; Palma-Victorelli, M. and Palma, M. (2004). Irreversible formation of intermediate BSA oligomers requires and induces conformational changes. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, 55: 1053-1062.
- Van-Belzen, N. (2002). The Role of Lactoferrin in Cancer Prevention, *Proceedings of the 26th International Dairy Congress, Paris, France*.
- Vanhuynh, N., Declaire, M., Voets, J., Motte, J. and Monseur, X. (1986). Production of gluconic acid from whey hydrolysate by *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochem.*, 21(1): 31-32.
- Vogt, S. and Freitag, R. (1997). Comparison of anion-exchange and hydroxyapatite displacement chromatography for the isolation of whey proteins. *Journal of Chromatography A*, 760, 125-137.
- Wakabayashi, H., Yamauchi, K. and Takase, M. (2006). Lactoferrin research, technology and applications. *International Dairy Journal*, 16: 1241–1251.

- Walzem, R., Dillard, C. and German J. (2002). Whey Components: Millenia of Evolution Create Functionalities form Mammalian Nutrition: What We Know and What We May Be Overlooking, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42: 353-375.
- Wetzel, R., Becker, J. and Behike, H. (1980). Temperature behavior of human serum albumin. *Eur. J. Biochem.* 104: 469-475.
- Wolman, F., González, D., Graselli, M. and Cascone, O. (2007). One-step lactoferrin purification from bovine whey and colostrum by affinity membrane chromatography. *Journal of Membrane Science*, 228: 132-138.
- Yang, S., Zhu, H., Li, Y. and Hong, G. (1994). Continuous propionate production from whey permeate using a novel fibrous bed bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 43: 1124-1130.
- Yoshida, S. and Xiuyun, Y. (1991). Isolation of lactoperoxidase and lactoferrins from bovine milk acid whey by carboxymethyl cation exchange chromatography. *Journal of Dairy Science*, 74: 1439-1444.

ANEXOS

Anexo 1

Curva de calibración para la determinación de la cantidad de proteína por el método del Bradford usando BSA (Bovine Serum Albumin) como proteína patrón.

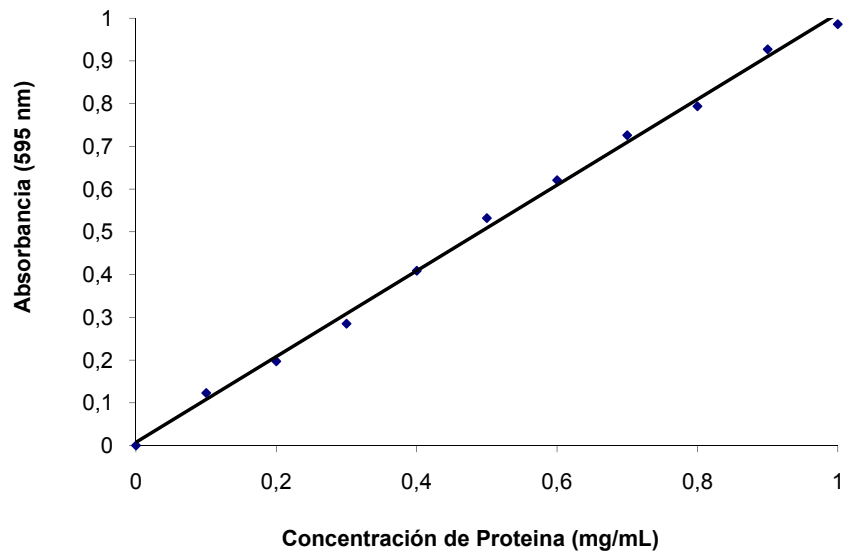


Figura A. Curva de calibración de cantidad de proteína. Determinación realizada a través del reactivo de Bradford. Ecuación de la correspondiente recta de linealización. $y = 1,0028x + 0,0077$ con un coeficiente de correlación de 0,998.

Anexo 2

Análisis usando el software quantity one 4.6.3 del gel obtenido mediante electroforesis SDS-PAGE de la figura 8.

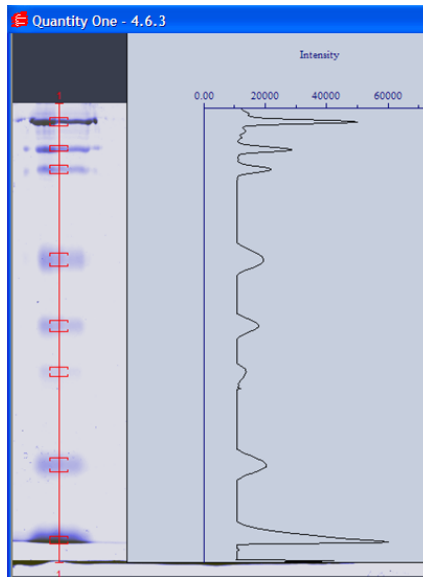


Figura B. Perfil del marcador de peso molecular usado con sus respectivas intensidades de pico

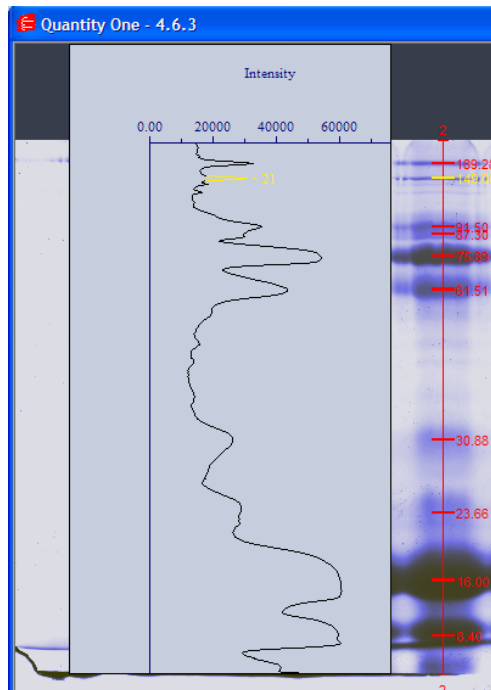


Figura C. Analisis de bandas por medio del software Quantity one 4.6.3 donde se aprecia el hombrito de banda que representa la lactoferrina.

Anexo 3

Marcador de punto isoelectrico

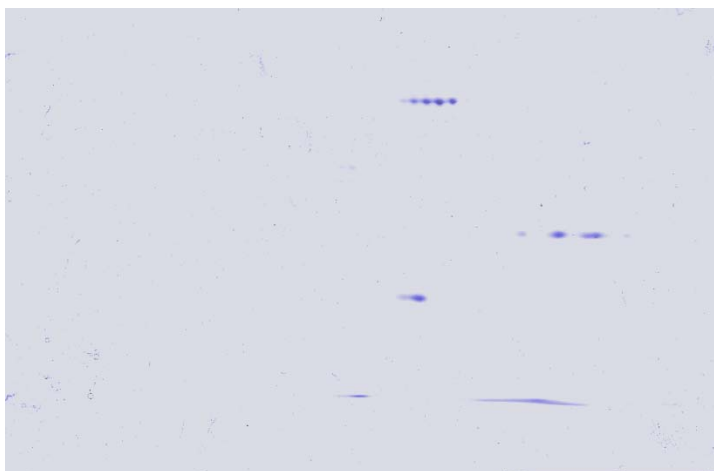


Figura D. Marcador de punto isoelectrico para electroforesis 2-D, usado para determinar los puntos isoelectricos de la figura 10.

Anexo 4

“Cromatograma” de exclusión molecular empacada con Sephadex G-75 usando tween 20 al 10% como eluyente.

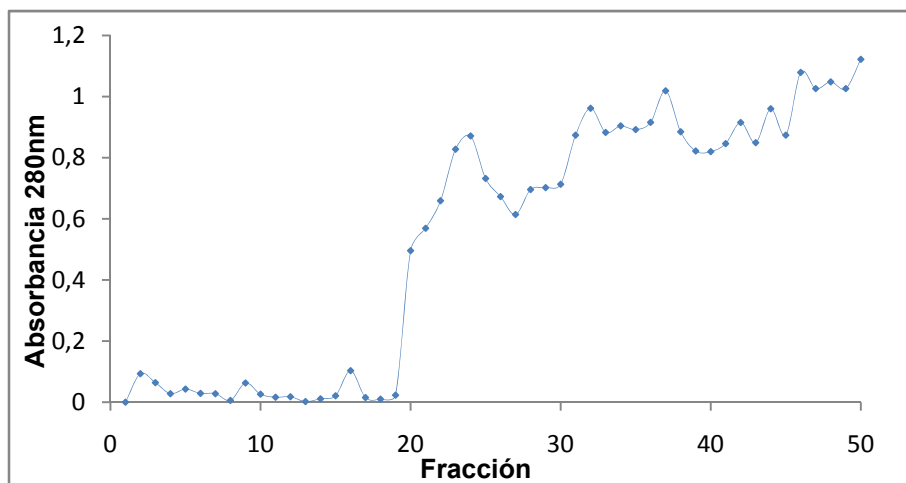


Figura E. “Cromatograma” obtenido en al corrida croamtografica usando como fase móvil Tween 20 al 10% en PBS a un flujo de 1mL/min.

Anexo 5

Importancia del empaquetamiento de la columna

A continuación se muestran dos cromatogramas obtenidos al pasar 1 mL de muestra previamente filtrada, con un flujo de 0.5mL/min usando Buffer fosfato salino (PBS) como fase móvil a dos columnas de sephadex G-75 hasta una altura de 29 cm. Con el fin de demostrar la importancia del empaclado de la columna y demostrar que en el presente trabajo las columnas fueron bien empaçadas.

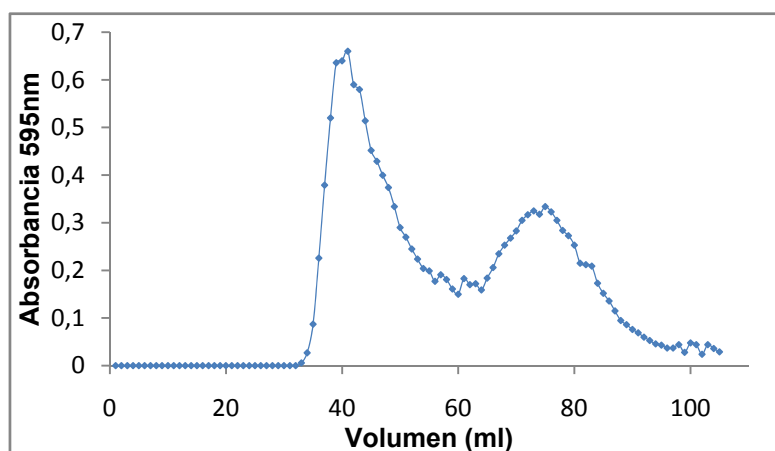


Figura F. Cromatograma de exclusión molecular Sephadex G-75 de una columna mal empaçada.

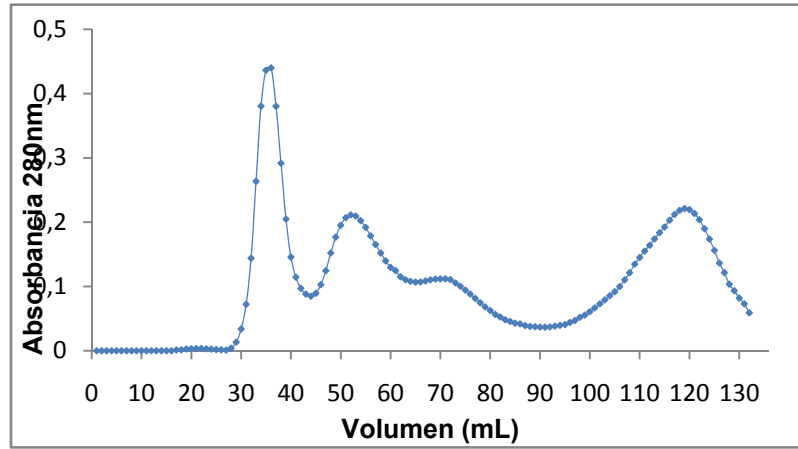


Figura G. Cromatograma de exclusión molecular Sephadex G-75 de una columna bien empacada.