

PURIFICACIÓN DE ALBUMINA BOVINA

Carlos Orozco-Álvarez *, Daniel López-Martínez, María Martínez-Guerra, Sergio García-Salas y Enrique Hernández-Sánchez

Departamento de Bioingeniería. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Instituto Politécnico Nacional. Av. Acueducto S/N. Col. Barrio La Laguna Ticomán. Ciudad de México

*correspoa@ipn.mx

RESUMEN:

Se llevó a cabo la purificación de albúmina a partir de sangre bovina. Se probaron tres alternativas para obtener el plasma a partir de sangre: centrifugación, microfiltración y diafiltración. Sólo la centrifugación proporcionó los resultados esperados, un contenido de proteínas de 42 g/L, mientras que las dos alternativas restantes sólo rindieron un contenido de 1 g/L. Posteriormente se realizó la termoprecipitación del plasma así obtenido. El cual consistió en agregar caprilato de sodio, (protector de la albúmina), etanol al 96% y se calentó a 65 °C para precipitar las proteínas contaminantes. Después de la centrifugación se obtiene la albúmina purificada en el sobrenadante con un contenido 9.3 g/L de proteína. El rendimiento volumétrico fue de 250 mL de albúmina purificada por cada litro de sangre bovina. Mientras que el rendimiento específico de albúmina fue de 77 % y una pureza, determinada por densitometría, de 87.9 %. La solución de albúmina así purificada, finalmente fue secada por aspersión bajo las siguientes condiciones: aire caliente a 130 °C y flujo de alimentación de 0.1 L/h. El rendimiento del secado fue de 78 % y el análisis de electroforesis no muestra una dispersión de las bandas de la muestra secada, lo que indica que no hubo degradación de la albúmina.

Palabras clave: albúmina bovina, termoprecipitación, secado por aspersión

ABSTRACT:

Purification of albumin from bovine blood was carried out. Three alternatives were tested to obtain plasma from blood: centrifugation, microfiltration and diafiltration. Only the centrifugation provided the expected results, protein content of 42 g/L, while the remaining two alternatives yielded only content of 1 g/L. Subsequently, the thermoprecipitation of the plasma thus obtained was performed. Which consisted of adding sodium caprylate (albumin protector), 96% ethanol and heated to 65 °C to precipitate the contaminating proteins. After centrifugation the purified albumin is obtained in the supernatant with 9.3 g/L content of protein. The volumetric yield was 250 mL of purified albumin per liter of bovine blood. While the specific yield of albumin was 77 % and a purity, determined by densitometry, of 87.9 %. The thus purified albumin solution was finally spray dried under the following conditions: air at 130 °C and feeding flow of 0.1 L/hr. The drying performance was 78 % and the electrophoresis analysis did not show a dispersion of the bands of the dried sample, indicating that there was no degradation of albumin.

Keywords: bovine albumin, thermoprecipitation, spray drying, electrophoresis

INTRODUCCIÓN

La albúmina es la proteína plasmática de mayor concentración y una de las más ampliamente usadas en la actualidad, además de aplicaciones terapéuticas y veterinarias y como componente en medios de cultivo celulares⁽³⁾. La albúmina constituye una fracción importante de las proteínas del plasma sanguíneo siendo los valores promedio de referencia: proteínas totales: 70-88 g/L, albúmina: 30-38 g/L, alfa 1, beta y gamma globulinas: 9, 12 y 22 g/L respectivamente⁽¹⁾. Se han propuesto técnicas de purificación como la desnaturalización o termocoagulación selectiva, que ofrecen buenos resultados con menos recursos^(2, 4, 5). Esta última metodología fue descrita por primera vez en 1944 y fue establecida en 1975 como una variante alternativa para la obtención de albúmina para uso terapéutico a gran escala. Así, el presente trabajo se planteó como objetivo efectuar la purificación de albúmina partiendo de sangre bovina, aplicando metodologías de bajo costo pero de rendimientos viables como la termoprecipitación. Al final de este trabajo se obtuvo una albúmina purificada con un rendimiento de 77 % y una pureza de 88 %.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo la termoprecipitación selectiva de nueve lotes de sangre bovina de acuerdo al procedimiento mostrado en la **Fig. 1**.

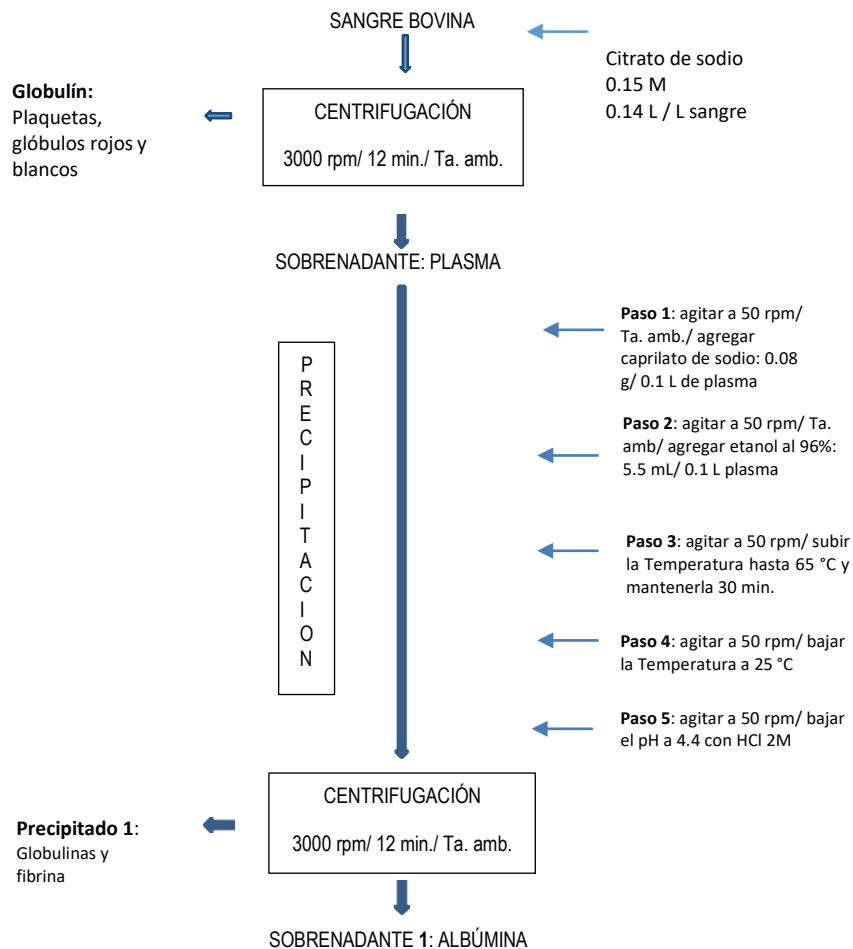


Fig.1 Termoprecipitación selectiva de plasma bovino

Se investigaron tres alternativas para la recuperación de plasma a partir de la sangre bovina.

1ª Centrifugación: globulin y plasma; precipitado 1 y sobrenadante 1.

2ª Microfiltración: retenido y permeado; precipitado 2 y sobrenadante 2.

3ª Diafiltración: concentrado y diafiltrado; precipitado 3 y sobrenadante 3.

La primera alternativa se aplicó en los 9 lotes de sangre, la segunda en los lotes 1-6, y la tercera en los lotes 2 y 4. Se tomaron muestras de cada alternativa y se cuantificó proteínas por el método de Bradford y también se realizó sólidos totales por peso seco. Después se llevaron a cabo electroforesis SDS-PAGE con el fin de evaluar cualitativamente los resultados obtenidos. Finalmente, se efectuó un análisis densitométrico preliminar de los geles que presentaron los perfiles de bandeo más definidos con el objetivo de estimar los rendimientos y niveles de pureza alcanzados (Vargas-Arroyo, 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez recuperado el plasma de la sangre mediante centrifugación (plasma), microfiltración (permeado) o diafiltración (diafiltrado); se le aplicó la técnica de termoprecipitación selectiva para obtener un purificado rico en albúmina (sobrenadante); así como un subproducto con las demás proteínas plasmáticas (precipitado). El volumen de plasma procesado fue de 50 mL para los lotes 1 y 2, de 100 mL para los lotes 3-6, de 200 mL para el lote 7; y para los lotes 8 y 9 fueron de 500 y 472 mL, respectivamente.

Llevada a cabo la purificación de albúmina de cada lote, primero se procedió a cuantificar proteínas totales por el método de Bradford para cada muestra del proceso. El resumen de los resultados se muestra en la **Tabla I**.

Tabla I. Cuantificación de proteína [g/L].

	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	Lote 7	Lote 8	Lote 9	Promedio
Sangre	118.4	202.6	213.7	173.3	254.5	354.5	74.9	142.3	147.1	186.8 ± 82.6
Centrifugación	Globulin	346.8	520.2	220.5	230.3	370.8	925.6	231.9	306.1	391.1 ± 221.6
	Plasma	61.0	52.6	33.8	25.5	28.3	35.3	50.5	23.9	42.7 ± 17.3
	Sobrenadante 1	-	4.8	4.0	3.2	1.0	2.7	14.1	19.3	9.3 ± 9.1
	Precipitado 1	-	0.9	-	-	-	5.8	2.7	2.9	4.2
Microfiltración	Retenido	-	-	279.6	-	842.1	710.4	-	-	610.7 ± 294.2
	Permeado	2.2	0.7	0.3	0.2	1.3	1.1	-	-	1.0 ± 0.8
	Sobrenadante 2	0.4	0.2	0.2	<0.005	0.9	1.2	-	-	0.6 ± 0.5
	Precipitado 2	-	0.4	-	-	7.1	4.3	-	-	-
Diafiltración	Concentrado	-	291.1	-	216.5	-	-	-	-	253.8 ± 52.8
	Diafiltrado	-	2.2	-	0.2	-	-	-	-	1.2 ± 1.4
	Sobrenadante 3	-	0.2	-	-	-	-	-	-	0.2
	Precipitado 3	-	1.7	-	-	-	-	-	-	1.7

De acuerdo a la información mostrada, los resultados promedio de la cuantificación de proteína coinciden parcialmente con lo descrito en la literatura. Para sangre se tiene un resultado de 187 g/L el cual generalmente no se reporta en la literatura. Para plasma se tiene 43 g/L que representa la mitad de lo reportado (sólo los lotes 1 y 9 se acercan a lo esperado). El globulín tiene un alto contenido proteico de 391 g/L lo cual lo hace atractivo como subproducto, al igual que el retenido (610 g/L) ó el concentrado (254 g/L) de la microfiltración. El permeado y el

diafiltrado (equivalentes a plasma) presentaron el valor más bajo con 1.1 g/L muy lejos del 80 g/L esperado, lo cual indica que la microfiltración (0.1 µm de poro) al retener los “elementos” más grandes también retiene a una gran cantidad de proteínas como la albúmina y globulinas.

El sobrenadante 1, donde se obtiene la albúmina, tuvo 9.3 g/L y su precipitado 1 sólo 3,3 g/L, indicando esto que la albúmina permanece en solución y además purificada; los sobrenadantes

2 y 3 (equivalentes a albúmina) presentaron valores muy bajos (0.6 y 0.2 g/L, respectivamente) debido a que la albúmina y otras proteínas quedaron completamente retenidas como fue explicado anteriormente, y sus respectivos precipitados 2 y 3 mostraron mayor contenido proteico (3.9 y 1.7 g/L, respectivamente) lo cual indica que las proteínas que pasaron la microfiltración y luego son precipitadas son más pequeñas y diferentes a la albúmina).

Por otra parte, las desviaciones más grandes fueron para las muestras de sangre, globulín, retenido y concentrado, por lo que posiblemente, el método de Bradford no sea el más adecuado para la cuantificación de muestras con elementos figurados, porque las proteínas no están “disponibles” y se hace necesario un tratamiento adicional antes de la cuantificación.

Paralelamente a la cuantificación de proteínas, se llevó a cabo la determinación de la fracción de sólidos totales en las muestras y los resultados se muestran en la **Tabla II**.

Tabla II. Fracción de sólidos totales (ST) y agua (H)

	Lote 2		Lote 4		Lote 5		Lote 6		Lote 7		Lote 8		Promedio		
	H	ST	H	ST	H	ST	H	ST	H	ST	H	ST	H	ST	
Centrifugación	Sangre	0.82	0.18	0.82	0.18	0.79	0.20	0.79	0.21	0.86	0.14	-	-	0.81 ± 0.03	0.19 ± 0.03
	Globulín	0.73	0.28	0.74	0.25	0.70	0.27	0.65	0.30	0.78	0.22	0.63	0.39	0.70 ± 0.06	0.30 ± 0.06
	Plasma	0.92	0.08	0.92	0.08	0.88	0.09	0.91	0.09	0.92	0.08	0.90	0.09	0.91 ± 0.01	0.09 ± 0.01
	Sobrenadante 1	-	-	0.97	0.03	0.98	0.02	0.94	0.06	0.95	0.05	0.97	0.03	0.96 ± 0.02	0.04 ± 0.02
	Precipitado 1	-	-	-	-	-	-	0.85	0.60	0.85	1.21	-	-	0.85 ± 0.00	0.90 ± 0.43
Microfiltración	Retenido	-	-	0.73	0.27	0.71	0.29	-	-	-	-	-	-	0.72 ± 0.01	0.28 ± 0.01
	Permeado	0.98	0.02	1.00	0.01	-	-	0.98	0.02	-	-	-	-	0.99 ± 0.01	0.01 ± 0.01
	Sobrenadante 2	-	-	0.99	0.01	0.99	0.01	0.99	0.01	-	-	-	-	0.99 ± 0.00	0.01 ± 0.00
	Precipitado 2	-	-	-	-	0.96	0.02	0.98	0.01	-	-	-	-	0.97 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Diafiltración	Concentrado	0.74	0.28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.74	0.28
	Diafiltrado	0.99	0.01	0.99	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-	0.99 ± 0.00	0.01 ± 0.00

Se observa que en el caso de la sangre presenta 19 % de sólidos totales lo cual concuerda con 18.68% de proteína, pero no todos los sólidos son proteínas. Para el plasma se tiene 9% de sólidos y 4.27% de proteína lo que significaría que la mitad de los sólidos son proteínas y esto habría que tomarlo con precaución. En el caso de globulín se tiene 30% de sólidos y 39.1% de proteína lo cual ya es una diferencia apreciable ya que no puede haber más proteína que sólidos totales. Para el sobrenadante 1 se obtuvo 4% de sólidos y 0.93% de proteína lo que da un proporción de 1 a 4 para proteína y también este resultado se tomaría con incertidumbre.

Posteriormente, se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE y los geles para cada lote se muestran en las Figs. 2 a 10.

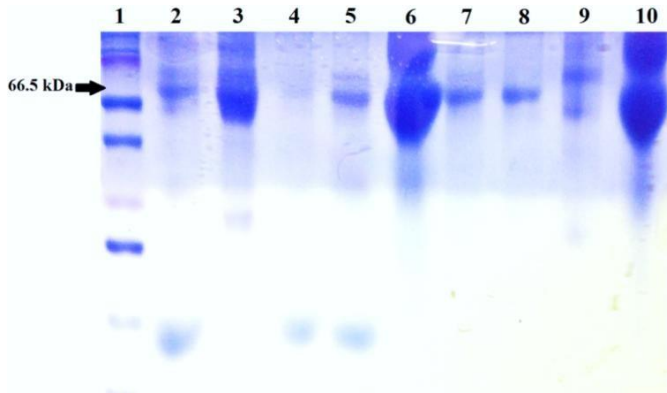


Fig. 2. Gel de electroforesis Lote 1: 1: MPM; 2: Sangre; 3: Plasma; 4: Globulin; 5: Permeado; 6: Albúmina comercial; 7: Plasma microfiltrado; 8: Sobrenadante; 9: Precipitado; 10: Albúmina comercial.

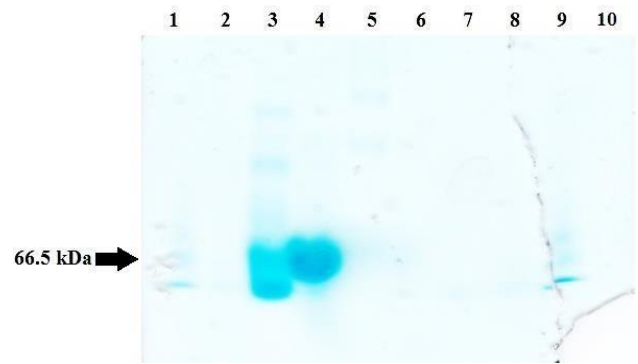


Fig. 5. Gel de electroforesis Lote 4: 1: Sangre, 2: Globulin, 3: Plasma, 4: Sobrenadante 1, 5: Albúmina comercial, 6: Sobrenadante 2, 7: Permeado, 8: Retenido, 9: Diafiltrado, 10: Vacío.

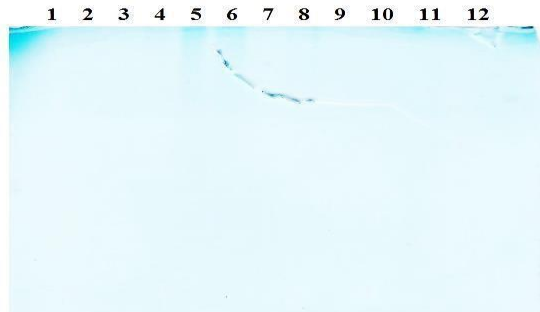


Fig. 3. Gel de electroforesis Lote 2: 1: MPM, 2: Sangre, 3: Plasma, 4: Globulin, 5: Sobrenadante 1, 6: Albúmina comercial, 7: Precipitado 1, 8: Retenido, 9: Permeado, 10: Vacío, 11: Vacío, 12: Vacío.

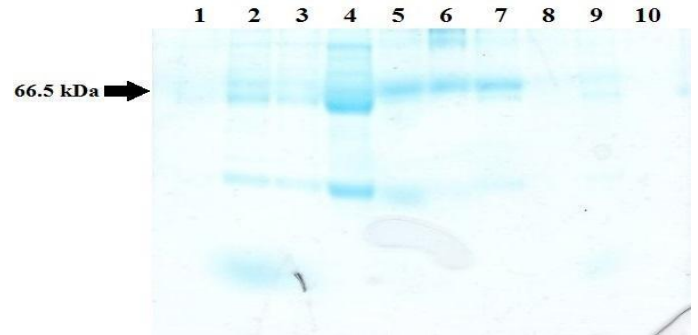


Fig. 6. Gel de electroforesis Lote 5: 1: Vacío, 2: Sangre, 3: Globulin, 4: Plasma, 5: Sobrenadante 1, 6: Albúmina comercial, 7: Sobrenadante 2, 8: Permeado, 9: Retenido, 10: Vacío.

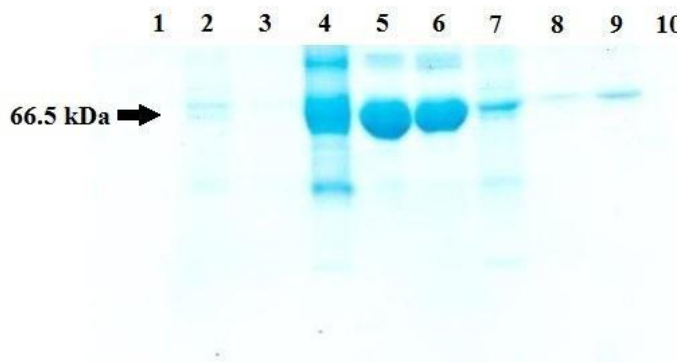


Fig. 4. Gel de electroforesis Lote 3: 1: Vacío, 2: Sangre, 3: Globulin, 4: Plasma, 5: Sobrenadante 1, 6: Albúmina comercial, 7: Retenido, 8: Permeado, 9: Sobrenadante 2, 10: Vacío.

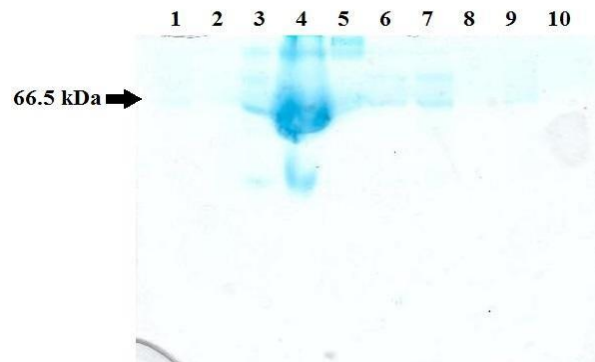


Fig. 7. Gel de electroforesis Lote 6: 1: Sangre, 2: Globulin, 3: Plasma, 4: Sobrenadante 1, 5: Albúmina comercial, 6: Sobrenadante 2, 7: Permeado, 8: Precipitado 2, 9: Retenido, 10: Vacío.

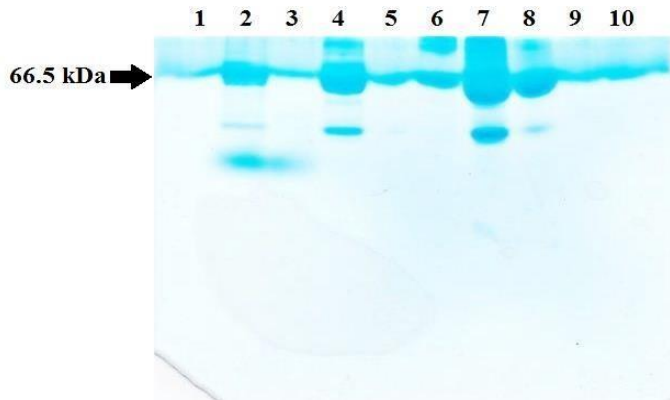


Fig. 8. Gel de electroforesis Lote 7: 1: Vacío, 2: Sangre, 3: Globulin, 4: Plasma, 5: Vacío, 6: Albúmina comercial, 7: Precipitado 1, 8: Sobrenadante 1, 9: Vacío, 10: Vacío.

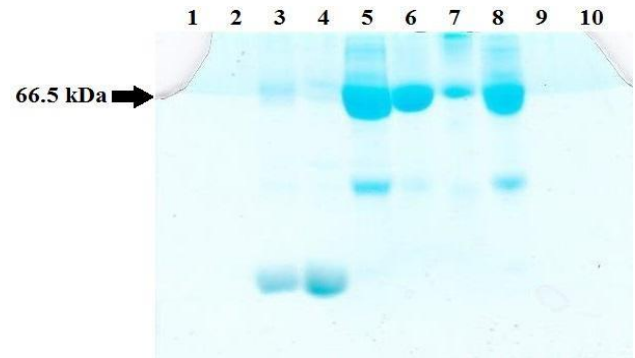


Fig. 9. Gel de electroforesis Lote 8: 1: Vacío, 2: Vacío, 3: Sangre, 4: Globulin, 5: Plasma, 6: Sobrenadante 1, 7: Albúmina comercial, 8: Precipitado 1, 9: Vacío, 10: Vacío

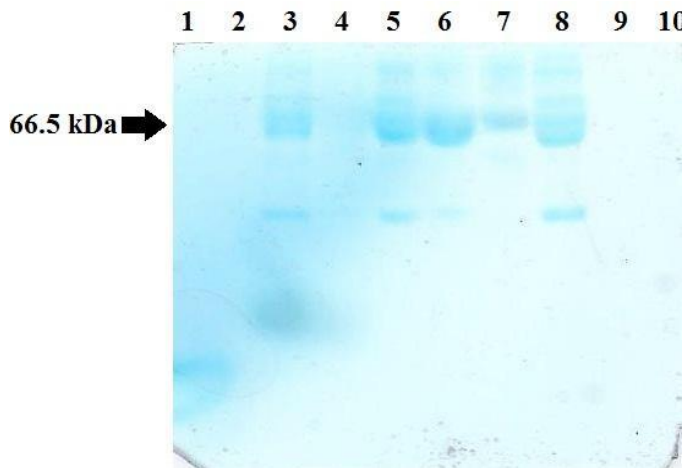


Fig. 10. Gel de electroforesis Lote 9: 1: Vacío, 2: Vacío, 3: Sangre, 4: Globulin, 5: Plasma, 6: Sobrenadante 1, 7: Albúmina comercial, 8: Precipitado 1, 9: Vacío, 10: Vacío.

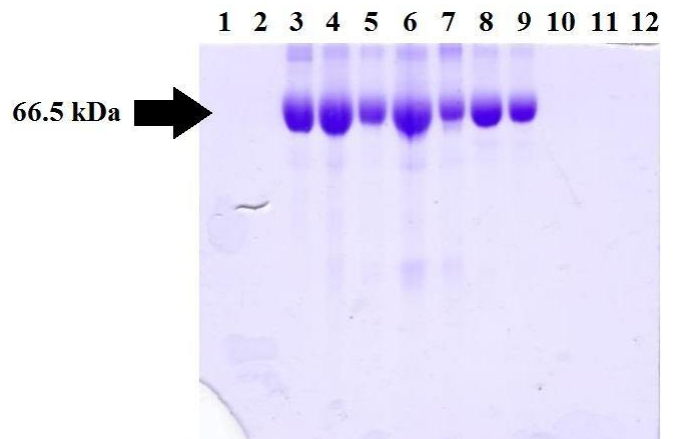


Fig. 11. Gel de electroforesis: 1: Vacío, 2: Vacío, 3: Albúmina comercial, 4: Purificado lote 15, 5: Secado lote 15, 6: Purificado lote 17, 7: Secado lote 17, 8: Purificado lote 21, 9: Secado lote 21, 10: Vacío, 11: Vacío, 12: Vacío.

Se efectuó un análisis densitométrico preliminar con el fin de hacer una primera estimación de la pureza y rendimiento obtenidos. Para ello, el rendimiento (% R) se calculó de la siguiente manera (Vargas-Arroyo, 2006):

Mientras que la pureza (%P) se estimó de acuerdo a la siguiente fórmula:

De esta manera, considerando que los geles que presentaron los perfiles de bandeo mejor definidos fueron los lotes 1, 3, 5, 8 y 9 (Fig. 2, 4, 6, 9 y 10, respectivamente); las estimaciones para el rendimiento y la pureza para los sobrenadantes 1 y 2 se muestran en la Tabla III.

Tabla III. Estimaciones de rendimiento (%R) y pureza (%P).

	Sobrenadante 1		Sobrenadante 2	
	%R	%P	%R	%P
Lote 1	-	-	38.34	93.36
Lote 3	89.81	96.98	90.87	98.27
Lote 5	49.13	74.53	-	-
Lote 8	75.83	84.50	-	-
Lote 9	93.71	95.61	-	-
<u>Promedio</u>	<u>77.1 ± 0.20</u>	<u>87.9 ± 0.11</u>	<u>64.6 ± 0.37</u>	<u>95.8 ± 0.03</u>

En promedio, el sobrenadante 2 purificado a partir de plasma obtenido mediante microfiltración, presenta una mayor pureza que el sobrenadante 1 purificado a partir de plasma obtenido mediante centrifugación. Sin embargo, como claramente queda establecido en el gel del Lote 3 (**Fig. 4**), el sobrenadante 2 presenta sensiblemente una menor cantidad de albúmina en comparación con el sobrenadante 1. Por lo que si bien la microfiltración permite obtener una albúmina más pura, es en detrimento de la cantidad obtenida.

Se puede observar claramente en las **Fig. 8, 9 y 10** que el patrón de bandeo del precipitado 1 es más parecido al patrón del plasma, lo cual indica que la mayor parte de las proteínas plasmáticas han sido removidas por la técnica de purificación.

Por otra parte, también se puede apreciar en las **Fig. 4, 6, 8, 9 y 10** que el patrón de bandeo del sobrenadante 1 es más similar al patrón de la albúmina comercial lo que implica que el proceso de purificación ha sido capaz de cumplir su cometido.

Por lo que en general, de acuerdo con los resultados obtenidos a través de la electroforesis SDS-PAGE, es posible garantizar que sí existe una significativa purificación de albúmina mediante el uso de la desnaturalización o termocoagulación selectiva.

Es importante discutir con respecto a los geles de los lotes 2, 4 y 6 (**Fig. 3, 5 y 7**, respectivamente), debido a que estos no presentaron patrones de bandeo definidos o bien, ningún patrón en absoluto. Esto pudo deberse probablemente al uso de un voltaje no adecuado para el corrimiento de los geles. Por otro lado, se puede considerar que una vez homologadas las metodologías para la purificación de albúmina y el corrimiento de geles, es posible obtener resultados reproducibles como claramente se observa en las **Fig. 9 y 10**, que a pesar de ser de distintos lotes, es posible apreciar el mismo patrón de bandeo para cada una de las muestras.

Se trabajaron tres lotes adicionales (15, 17 y 21) purificando albúmina a través de la centrifugación y posterior termoprecipitación con la finalidad de realizar un secado por aspersión y obtener albúmina en polvo. El objetivo de esta parte del trabajo era estimar el rendimiento de la operación de secado y el nivel de posible degradación de la albúmina secada. Así, el rendimiento promedio fue de 78% y el gel obtenido en la electroforesis SDS-PAGE se muestra en la **Fig. 11**.

En caso de que el proceso de secado por aspersión degradara sensiblemente a la albúmina bovina, en los carriles donde fueron cargadas las muestras resuspendidas de polvo seco esperaríamos ver un barrido a lo largo del gel, situación que no se presentó de manera visible, por lo que de manera preliminar es posible afirmar que el secado por aspersión, a las condiciones trabajadas (110, 120 y 130 °C, respectivamente) no degradó a la proteína de interés.

CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que la termoprecipitación selectiva es una técnica factible para la purificación de albúmina que ofrece buenos resultados con relativamente pocos recursos, y que el secado por aspersión es una operación factible que no provoca degradación si quiere obtenerse la albúmina en polvo. Por otra parte, con el fin de obtener resultados concluyentes en cuanto rendimiento y pureza alcanzados, se sugiere efectuar un estudio de Western-Blot, así como identificación de proteínas por HPLC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez-Calvo, J. L., 2004. *Bioquímica nutricional y metabólica del bovino en el trópico*. Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia.
2. González, L. F., Acuña, M. T., Lara, J., Villalobos, D., Peña, I., 1985. Producción de albúmina bovina. Evaluación de dos métodos. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*. 6(2): 105-114.
3. Meat and Livestock Australia, 2001. *Manufacture of Bovine Serum Albumin*. Recuperado el 15/01/2017, de <http://www.meatupdate.csiro.au/infosheets/Manufacture%20of%20Bovine%20Serum%20Albumin.pdf>
4. Moya, A., Paz, O., Joó, L., Gutiérrez, E., Rodríguez, Z., Cádiz, A., 2000. Estabilización de la albúmina con caprilato de sodio durante su obtención y pasteurización. *Vaccinmonitor*. 9(2): 10-15.
5. Vargas-Arroyo, M., 2006. *Implementación de un método para la purificación de albúmina a partir de plasma equino*. Tesis inédita de licenciatura. Universidad de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.