

# **Influencia de la concentración iónica en la purificación de la IgY de la yema de huevo**

## **Influence of ionic concentration on the IgY purification from egg yolk**

Trabajo de Fin de Grado

**Beatriz Santos López**

Tutorizado por:

Dr. Ricardo Guillermo Álvarez y Dr. Antonio José Morales De La Nuez

Grado en Biología. Julio, 2021.

## *Agradecimientos*

Amigos, profesores y familiares,  
también pareja, si has encontrado en el camino,  
son los que te acompañan en esta etapa.

Una que empezaste con ilusión,  
y que terminas con incertidumbre.

Pero que con ella te llevas experiencias,  
y un trocito de tu corazón dejas.

# Índice

Resumen .....	1
Abstract .....	1
1. Introducción.....	3
2. Objetivos .....	6
3. Materiales y métodos.....	7
3.1. Obtención de la yema .....	7
3.2. Dilución en agua de la yema de huevo .....	7
3.3. Experimento 1 .....	7
3.4. Experimento 2 .....	8
3.5. Determinación de materia seca y grasa de la fracción soluble en agua .....	9
3.6. Cuantificación de proteínas .....	9
3.7. Electroforesis.....	10
3.8. Análisis estadístico .....	11
4. Resultados .....	12
4.1. Experimento 1 .....	12
4.2. Experimento 2 .....	12
5. Discusión .....	16
6. Conclusiones .....	19
Conclusions .....	19
7. Bibliografía.....	20

## ***Resumen***

Las inmunoglobulinas son proteínas que protegen al organismo frente a antígenos extraños, pero pueden tener otros usos biotecnológicos, como el diagnóstico, o proveer inmunidad pasiva de forma artificial. La más utilizada es la IgG, cuya producción está vinculada al sufrimiento animal y a unos costos relativamente altos, por lo que se buscan alternativas. La IgY es la inmunoglobulina propia de las aves que se encuentra en grandes cantidades en la yema de los huevos, siendo su producción más respetuosa con el bienestar animal, más económica en comparación con la IgG y presenta numerosas ventajas para el desarrollo de inmunoensayos. El principal problema para la purificación de la IgY es la separación de los lípidos presentes en la yema de huevo. El método más utilizado actualmente es la dilución en agua acidificada, en el que una menor fuerza iónica mejora la eficiencia de agregación de los gránulos lipídicos. Por ello, se trabajó con el método de dilución en agua (1:10) y disoluciones de concentraciones crecientes de NaCl, entre 0 y 100 mM, para evaluar la influencia de la fuerza iónica en la purificación de la IgY de la yema de huevo. En las condiciones de trabajo empleadas, se comprueba que la concentración iónica utilizada no influye en la obtención de la IgY de la yema de huevo, aunque sí facilita la separación de la fracción soluble en agua.

**Palabras clave:** purificación de la IgY, fuerza iónica, inmunoglobulinas.

## ***Abstract***

Immunoglobulins are proteins that protect the body against strange antigens, but they can be used for different biotechnological uses, such as diagnostics, or to provide artificial passive immunity. The most widely used is IgG, the production of which is linked to animal suffering and relatively high costs, so alternatives are being explored. The IgY is an avian immunoglobulin found in large quantities in the egg yolks, which is more friendly with animal welfare, cheaper to produce compared to IgG, and has many advantages for the development of immunoassays. The main problem for the IgY purification is the separation of lipids present in the egg yolk. Nowadays, the most commonly used method is dilution in acidified water, where lower ionic strength improves the aggregation efficiency of the lipid granules. Therefore, we worked with the water dilution method (1:10) and dilutions of increasing NaCl concentrations, between 0 and 100 mM, to evaluate the influence of ionic strength on the IgY purification from egg yolk. Under the working conditions used, it was found that the ionic

concentration employed had no influence on IgY obtaining from egg yolk, although it did facilitate the separation of the water-soluble fraction.

**Keywords:** IgY purification, ionic strength, immunoglobulins.

# ***1. Introducción***

Las inmunoglobulinas (Ig), también denominadas anticuerpos, son proteínas que generan los linfocitos B del sistema inmunológico para proteger al organismo frente a antígenos extraños, pues poseen una alta capacidad para reconocer pequeñas estructuras específicas (Chalghoumi et al., 2009). Gracias a esta propiedad, estas moléculas son ampliamente utilizadas para aplicaciones en investigación, diagnóstico, terapia, o profilaxis. Incluso se han empleado en la formulación de alimentos (Amro et al., 2018).

Durante mucho tiempo, la producción de anticuerpos se ha estado realizando tanto en roedores de laboratorio como en otros grandes mamíferos, como caballos, ovejas y cabras (Reese et al., 2020). Dicha producción provoca daños físicos y psicológicos debido a los procesos de inmunización y posterior sangrado de los animales (Schade y Hlinak, 1993). Y, como Russell y Burch (1959) publicaron en su trabajo “Los principios de la técnica experimental humana”, se debe intentar minimizar el uso animal para la investigación. Además, la sociedad cada vez se preocupa más por el bienestar animal. Klemperer (1893) describió por primera vez que en la yema de los huevos de gallinas inmunizadas se hallaban anticuerpos específicos pero, no fue hasta mucho después de la publicación del trabajo anterior (Schade y Terzolo, 2006), que se le dio la importancia que tenían los resultados de Klemperer. Larsson et al. (1993) comprobaron que había una mayor concentración de la IgY en la yema de los huevos de gallina (especie de ave que tiene una mayor accesibilidad a la obtención de anticuerpos) que en su suero, debido al transporte activo de IgY desde la sangre de la gallina hasta el huevo, para aportar la inmunidad necesaria para el futuro pollo (Amro et al., 2018).

La IgY, además de tener una producción no invasiva o ausente de sufrimiento animal (Schade y Terzolo, 2006), y las gallinas una menor susceptibilidad a enfermedades que los animales de laboratorio (Polson et al., 1980), presenta ventajas frente a otra inmunoglobulina, la IgG, entre las que se encuentra su facilidad de obtención, pues en cada yema de huevo hay de 100 a 150 mg de esta inmunoglobulina (Zhou et al., 2020). Esto equivale a una producción de 20 a 40 g de IgY por año y gallina (Schade et al., 2005). Se puede decir que las IgY presentan una mayor producción (Hatta et al., 1993) y son una fuente de Igs más económica (Hatta et al., 1997), en comparación con la IgG purificadas a partir de sangre.

Las inmunoglobulinas de la yema de huevo presentan una mayor estabilidad. Se ha comprobado su actividad hasta 10 años después, tras ser mantenida a 4 °C (Larsson et al., 1993).

De hecho, la IgY se mantiene en los huevos almacenados a esa temperatura durante al menos un año (Amro et al., 2018). Además, las IgY presentan numerosas ventajas en el desarrollo de inmunoensayos de diagnóstico de rutinas (Dávalos-Pantoja et al., 2000), como por ejemplo, no activan el sistema de complementos de mamíferos (Schade et al., 2005), no reaccionan con los factores reumatoides (Zhou et al., 2020), y la distancia filogenética con los mamíferos permite a la IgY reconocer proteínas conservadas de los mismos (Larsson et al., 1993).

Chalghoumi et al. (2009) describieron que, la IgY presenta cuatro dominios constantes en su cadena pesada frente a los tres de la IgG. Además, presenta una región bisagra menos desarrollada, lo cual supone una menor flexibilidad de la molécula, pudiendo esto explicar parte de las diferencias de reconocimiento de los epítomos antigénicos (Schade et al., 2005). Estas diferencias estructurales cambian las características físicoquímicas: la superficie de la IgY es más hidrofóbica; es más estable en distintas condiciones (Dávalos-Pantoja et al., 2000); el punto isoelectrico de la IgY se encuentra en valores más ácidos (5,7 y 7,6) que el de la IgG (6,1 y 8,5) (Xu et al., 2011). Martín Salazar (2019) demostró que la IgY es menos sensible al etanol en comparación con la IgG.

En la naturaleza, la IgY se concentra en la yema de huevo para proveer inmunidad pasiva a las crías de las aves (Chalghoumi et al., 2009). Imitando esta función, estas Igs se pueden administrar de forma artificial, logrando proteger al huésped de patógenos microbianos (Hatta et al., 1997), siendo una buena alternativa frente a bacterias resistentes a antibióticos (Schade y Terzolo, 2006), y un sustituto a fármacos con efectos secundarios en enfermedades microbianas que afectan al tracto digestivo (Akita y Nakai, 1992). Se ha probado la eficacia del uso de la IgY, como profiláctico o agente terapéutico, frente a muchas bacterias o virus (Chalghoumi et al., 2009), como por ejemplo, con *Campylobacter jejuni* (Tsubokura et al., 1997), con *Escherichia coli* (Akita y Nakai, 1992), con *Helicobacter pylori* (Lee et al., 2002), o con rotavirus humano (Hatta et al., 1993). Además, se ha sugerido que podría ser efectiva, tanto mezclada con comidas como en enjuagues bucales, contra *Streptococcus mutans*, agente patógeno que produce caries dental en los seres humanos, y por tanto, previniendo la colonización bucal por esta bacteria (Hatta et al., 1997). También, se ha sugerido su uso como aditivo en fórmulas para bebés como yema de huevo en polvo, de manera que las IgY aporten inmunidad pasiva (Schade et al., 2005). Por otro lado, la IgY ha sido utilizada de manera exitosa como inmunoterapia en animales (Xu et al., 2011), como por ejemplo, en lechones contra el virus de la diarrea epidémica porcina (Lee et al., 2015).

La tecnología de las IgY ofrece nuevas alternativas y soluciones para la investigación, la medicina y la sociedad. Por lo tanto, es necesario buscar métodos para purificar la IgY de manera efectiva, rentable y evitando, en la medida de lo posible, el impacto sobre el medio ambiente. El principal problema de la purificación de las IgY es la separación de los lípidos presentes en la yema de huevo (Akita y Nakai, 1992, 1993). Estos autores refinaron el método de dilución en agua para purificación de la IgY, que es uno de los más usados actualmente, con el fin de separar las proteínas solubles de la fracción lipídica de la yema. Después de comparar este método con otros tres (precipitación, ultrafiltración y cromatografía), llegaron a la conclusión de que la dilución en agua era más eficaz, pues es un método simple, rápido, eficiente y permite la producción a gran escala (Akita y Nakai, 1993). Akita y Nakai (1992) observaron que una mayor dilución de la yema de huevo y, por lo tanto, una menor fuerza iónica, mejoraba la eficiencia de agregación de los gránulos lipídicos. En este método, el pH, junto con la dilución, es uno de los factores más importante en la recuperación de la IgY, siendo necesario disminuir el pH para conseguir una separación efectiva. Estos autores, también describen que a una concentración 160 mM de NaCl se inhibía la agregación de la yema diluida (1:10) en agua acidificada. Este efecto inhibitorio aumentó cuando la yema diluida fue sometida a una disolución 1500 mM de NaCl. Sriprabhom et al. (2019), trabajando con una emulsión de grasa en agua, observaron que, a menor fuerza iónica la floculación y la viscosidad aumentan, y al mismo tiempo, disminuye la estabilidad de la emulsión cuando el pH es inferior al punto isoeléctrico.

## 2. *Objetivos*

El objetivo principal del presente trabajo es:

- Evaluar la influencia de la concentración iónica, utilizando disoluciones de concentraciones crecientes de NaCl, para mejorar la purificación de la IgY de la yema de huevo.

Para alcanzar el objetivo principal, este se desglosó en los siguientes objetivos específicos:

- Establecer el rango de concentraciones de NaCl necesario para separar la grasa de la fracción soluble en agua.
- Valorar la eficacia del método con variaciones de fuerza iónica para una mejor purificación de la fracción soluble en agua y de la IgY.
- Cuantificar la fracción de grasa residual de la fracción soluble en agua, determinando la concentración de NaCl más eficiente.

### ***3. Materiales y métodos***

#### ***3.1. Obtención de la yema***

Se procedió a la obtención de la yema de 4 tipos diferentes de huevos comerciales, reuniendo las yemas suficientes para llevar a cabo cada réplica experimental. Los huevos utilizados fueron: de la marca comercial Hacendado procedentes de gallinas criadas en suelo y de gallinas camperas; de la marca comercial Rujamar de gallinas criadas en suelo; y de la granja Cercado La Paz.

Para ello, con un separador de yemas y claras, se aislaron las yemas, que fueron lavadas con agua destilada; luego, con ayuda de papel de filtro, se secaron y se eliminaron los restos de clara adheridos; y, por último, se rompió el saco vitelino, vertiendo el contenido de la yema en un vaso de precipitado hasta obtener la cantidad necesaria.

#### ***3.2. Dilución en agua de la yema de huevo***

En primer lugar, se preparó una disolución salina de NaCl a una concentración 2 M. Seguidamente, se diluyó la yema 1:10 (m/v) en agua destilada (Akita y Nakai, 1992) con cantidades variables de la disolución de cloruro sódico, según lo indicado en las Tablas 1 y 2, hasta alcanzar 136,36 mL de disolución.

#### ***3.3. Experimento 1. Determinación de la concentración ideal de NaCl***

Para establecer la concentración de NaCl adecuada y evaluar su efecto sobre la purificación de la IgY de la yema de huevo, se realizó un experimento con un amplio rango de concentraciones de esta sal. Se utilizó un conjunto de yemas de huevo, que fue obtenido y diluido como se explicó anteriormente. Las concentraciones de cloruro sódico utilizadas fueron 0, 250, 500, 750, 1000 y 2000 mM. Se partió de la disolución 2 M de NaCl y se completó por la adición de agua destilada hasta alcanzar las concentraciones indicadas (Tabla 1).

Las disoluciones fueron acidificadas por adición de una disolución de ácido clorhídrico 1 N hasta alcanzar un pH entre 5 y 5,1 y, a continuación, se congelaron (-20 °C) durante una noche. Al día siguiente, las disoluciones fueron dispuestas para descongelarse gradualmente hasta temperatura ambiente, durante 24 horas, y paulatinamente pasar por un doble filtro de papel con capacidad de retener partículas hasta 5-13  $\mu\text{m}$  (VWR, Leuven, Alemania),

obteniéndose la fracción soluble en agua (FSA) de la yema de huevo, y quedando retenida en los filtros la fracción grasa.

Tabla 1. Cantidades de yema, agua y disolución salina, en diluciones 1:10 (m/v), para alcanzar las diferentes concentraciones de NaCl del experimento 1.

Concentración de NaCl (mM)	Yema (g)	H <sub>2</sub> O (mL)	Disolución de NaCl 2 M (mL)
0	13,64	136,36	0,00
250	13,64	119,32	17,05
500	13,64	102,27	34,09
750	13,64	85,23	51,14
1000	13,64	68,18	68,18
2000	13,64	0,00	136,36

De manera visual se comprobó si la concentración de NaCl afectó a la separación de la emulsión de yema de huevo diluida, determinando, en primer lugar, si se apreciaba una separación efectiva de la FSA y si esta mostraba turbidez.

### ***3.4. Experimento 2. Evaluación de la influencia de la fuerza iónica en la purificación de la IgY***

Para este experimento se utilizaron los 4 conjuntos de yema de huevo obtenidos, como se indicó anteriormente. Cada conjunto fue tratado según el protocolo seguido en el experimento 1, variando las concentraciones de NaCl utilizando la disolución 2 M y completando con agua destilada hasta alcanzar las concentraciones indicadas (Tabla 2).

Tabla 2. Cantidades de yema, agua y disolución salina, en diluciones 1:10 (m/v), para alcanzar las diferentes concentraciones de NaCl del experimento 2.

Concentración de NaCl (mM)	Yema (g)	H <sub>2</sub> O (mL)	Disolución de NaCl 2 M (mL)
0,0	13,64	136,36	0,00
12,5	13,64	135,51	0,85
25,0	13,64	134,66	1,71
50,0	13,64	132,95	3,41
75,0	13,64	131,25	5,11
100,0	13,64	129,54	6,82

Al igual que en el experimento 1, las disoluciones fueron acidificadas utilizando una disolución de ácido clorhídrico 1 N hasta alcanzar un pH entre 5 y 5,1 y, a continuación, se congelaron (-20 °C) durante una noche. Al día siguiente, las disoluciones fueron dispuestas para descongelarse gradualmente hasta temperatura ambiente, durante 24 horas, y paulatinamente pasar por un doble filtro de papel con capacidad de retener partículas hasta 5-13 µm, obteniéndose la FSA de la yema de huevo, y quedando retenida en los filtros la fracción grasa. Al cabo de las 24 horas de filtración, se midió el volumen de la FSA utilizando una probeta. A continuación, 50 mL de la FSA se dispusieron para la cuantificación de la materia seca y grasa, y, por otro lado, se prepararon tres alícuotas de 1,5 mL que se almacenaron a baja temperatura (-20 °C), hasta realizar los análisis que posteriormente se detallarán.

### ***3.5. Determinación de materia seca y grasa de la fracción soluble en agua***

Para la cuantificación de la materia seca se utilizaron 50 g de FSA, los cuales se deshidrataron en una estufa a 95 °C durante 3 días. La materia seca resultante fue pesada y se calculó el porcentaje de la misma. El residuo seco obtenido se utilizó para determinar la cantidad de grasa de la FSA usando el sistema de extracción Soxhlet (Lee et al., 2019). Aproximadamente un gramo de materia seca fue pesado e introducido en un sobre de papel de filtro y almacenado en un desecador hasta la realización del análisis. Para llevar a cabo la extracción de lípidos de las muestras, se utilizó un extractor Soxhlet con hexano como disolvente. Una vez extraída la grasa, las muestras fueron desecadas, en primer lugar, a temperatura ambiente, bajo una campana de extracción de gases, y posteriormente, en una estufa a 65 °C durante 24 horas para la completa eliminación del hexano. A continuación, se pesaron y se llevaron a cabo los cálculos de porcentaje y cantidad de grasa.

### ***3.6. Cuantificación de proteínas***

Para la cuantificación de la proteína total de la FSA se utilizó el método del ácido bicinconínico (Biosciences, Missouri, USA). Este es un ensayo colorimétrico compatible con disoluciones de proteínas solubilizadas con detergentes. Se basa en dos reacciones: la primera es la reducción del catión cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) a cuproso ( $\text{Cu}^+$ ), por parte de los enlaces peptídicos de las proteínas en medio básico, y la segunda, es la reacción del catión cuproso con dos moléculas de ácido bicinconínico, para formar un complejo que absorbe la luz fuertemente a una longitud de onda de 562 nm, dando como resultado un cambio de color hacia el púrpura.

Para la determinación de la cantidad total de proteína, se elaboró la curva patrón utilizando disoluciones de albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) en concentraciones entre 100 y 0,781  $\mu\text{g/mL}$ , empleando tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) como blanco. Las muestras problema fueron diluidas adecuadamente en PBS para que la concentración de proteínas se encontrase en el rango de la curva patrón.

Por otra parte, se preparó la solución de trabajo según las indicaciones del fabricante, combinando tres componentes (25:24:1; partes de tampón de ensayo, solución de ácido bicinconínico, y disolución de sulfato cúprico, respectivamente). En una placa de 96 pocillos se cargaron, por triplicado, 150  $\mu\text{L}$ , tanto de las muestras como de las diferentes concentraciones de proteína de la curva patrón, incluyendo el blanco. Seguidamente, se añadió 150  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo y se mantuvo durante 2 horas a 37 °C. Por último, se leyó la absorbancia en un lector de placas FLUOstar Omega (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemania) a 562 nm.

### ***3.7. Electroforesis***

La electroforesis en gel es una técnica de separación de proteínas según la movilidad de estas por su tamaño y carga utilizando un campo eléctrico. En este caso, se usó para la separación de diferentes proteínas solubles de la yema de huevo en condiciones no reductoras, determinando el porcentaje de IgY con respecto al total de proteínas de la FSA.

Utilizando las concentraciones de proteínas obtenidas del ensayo anterior, se calculó la cantidad de muestra necesaria para cargar, en cada pocillo del gel, 15  $\mu\text{g}$  de proteínas. Antes de la carga y posteriormente a la descongelación de las muestras de la FSA en baño maría a 37 °C, se añadió a las muestras un tampón de carga (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos). Después de cargar las muestras en el gel (TruPAGE Precast Gel 4-20 %, Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos), se inició la electroforesis a 100 V constantes, y, al cabo de 60 minutos, se procedió a retirar el gel. Consecutivamente, se lavó con agua destilada durante 5 minutos, tres veces, y, para teñir el gel, se agregó RAPIDstain (G-Biosciences, San Luis, Estados Unidos) durante dos horas en agitación constante. A continuación, se descartó el colorante y se lavó con agua destilada en agitación constante, dos veces durante 15 minutos, y una última vez durante 24 horas. Finalmente se procedió a tomar una imagen con el lector de geles Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, California, Estados Unidos), y procesar la misma utilizando el software Image Lab 6.0 (Bio-Rad, California, Estados Unidos), obteniéndose el porcentaje de IgY de las muestras analizadas, utilizando la sumatoria de la intensidad de todas las bandas proteicas como 100 %.

### ***3.8. Análisis estadístico***

Para el análisis estadístico se usó el programa SAS 9.0. Se llevó a cabo un ADEVA de medidas repetidas utilizando como variable intrasujeto la concentración de NaCl añadida a la muestra y, como sujeto del modelo, cada conjunto de yemas de huevo utilizadas. Para la separación de medias se utilizó el test de Tukey. Las diferencias estadísticas fueron establecidas cuando el P valor fue inferior a 0,05 (Morales-delaNuez et al., 2020).

## 4. Resultados

### 4.1. Experimento 1. Determinación de la concentración ideal de NaCl

Durante el proceso de obtención de la FSA se observa que, a una concentración de 250 mM de NaCl, o superiores, no se produce una separación efectiva de las fracciones solubles y grasa, mientras que la muestra sin adición de NaCl mostró una separación adecuada de estas dos fracciones, como se puede observar en la Figura 1.



Figura 1. Obtención de la FSA a diferentes concentraciones de NaCl (0, 250, 500, 700, 1000 y 2000 mM) para la determinación del rango ideal de la concentración de NaCl.

### 4.2. Experimento 2. Evaluación de la influencia de la fuerza iónica en la purificación de la IgY

Una vez descongeladas las muestras se observó que, a concentraciones de 100 mM o inferiores se conseguía una separación más o menos efectiva de la fracción soluble en agua de la fracción grasa (Figura 2). De manera visual, se puede apreciar que el incremento de la concentración de NaCl se asocia a un aumento de la turbidez de la FSA.



Figura 2. Obtención de la FSA para proceder a la evaluación de la influencia de la fuerza iónica en la purificación de la IgY. El rango definitivo utilizado en las diferentes concentraciones de NaCl fue 0, 12,5, 25, 50, 75 y 100 mM

Como se puede observar en la Tabla 3, el volumen obtenido como FSA se correlaciona positivamente con la concentración de NaCl. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la adición de la disolución 100 mM de NaCl y la muestra 0 mM, mostrando las concentraciones 12,5, 25, 50 y 75 mM valores intermedios.

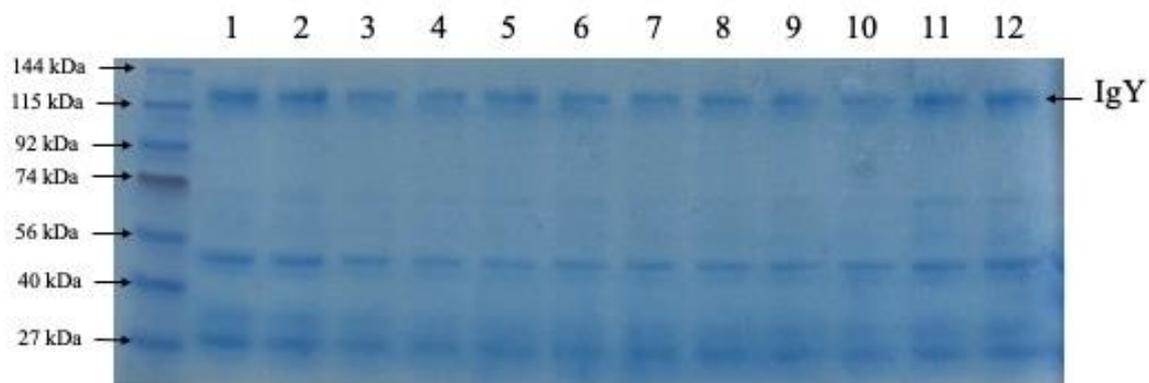
Tabla 3. Efectos de la adición de NaCl sobre la purificación de la fracción soluble en agua y de la IgY de la yema de huevo (experimento 2).

Concentración de NaCl	0 mM	12,5 mM	25 mM	50 mM	75 mM	100 mM	P
Volumen FSA* (mL)	122,88 <sup>a</sup>	123,63 <sup>ab</sup>	125,50 <sup>ab</sup>	124,13 <sup>ab</sup>	125,50 <sup>ab</sup>	127,38 <sup>b</sup>	0,018
Materia seca FSA* (%)	0,41 <sup>a</sup>	0,48 <sup>a</sup>	0,57 <sup>a</sup>	0,79 <sup>b</sup>	0,88 <sup>b</sup>	1,12 <sup>c</sup>	<0,001
Grasa residual de la FSA* (% materia seca)	37,80 <sup>a</sup>	27,40 <sup>b</sup>	26,50 <sup>b</sup>	23,20 <sup>b</sup>	18,80 <sup>b</sup>	22,10 <sup>b</sup>	<0,001
Grasa eliminada (%)	97,80 <sup>ab</sup>	98,15 <sup>a</sup>	97,81 <sup>ab</sup>	97,37 <sup>ab</sup>	97,60 <sup>ab</sup>	96,24 <sup>b</sup>	0,009
Proteína (mg/mL)	3,94 <sup>a</sup>	4,18 <sup>ab</sup>	4,41 <sup>abc</sup>	4,68 <sup>bc</sup>	4,68 <sup>bc</sup>	4,89 <sup>c</sup>	0,005
IgY (%)	23,88	23,94	24,09	25,07	27,16	25,28	0,784
IgY (mg/mL)	0,94	1,00	1,03	1,15	1,25	1,23	0,332
IgY total (mg)	115,87	123,25	129,63	142,72	157,22	157,10	0,274

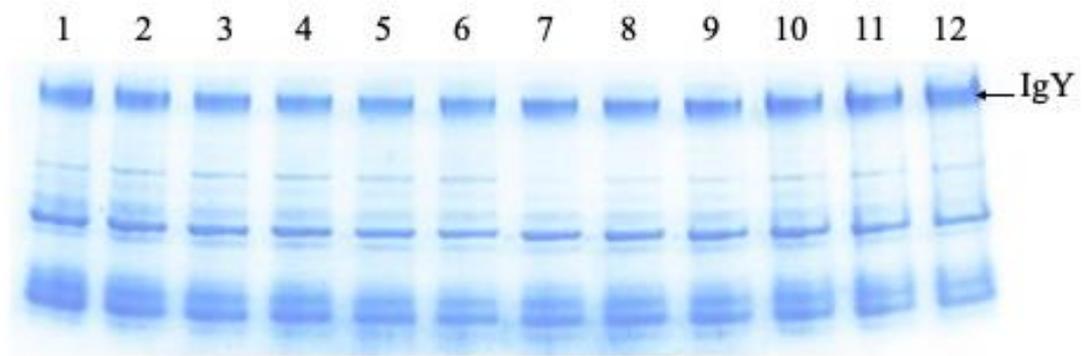
\*FSA: Facción Soluble en Agua

El porcentaje de materia seca de la fracción soluble en agua, al igual que el volumen, aumenta con el incremento de la concentración de NaCl. En este caso, las concentraciones salinas 0, 12,5 y 25 mM mostraron los valores más bajos, mientras que el valor más alto lo obtuvo 100 mM, y las muestras 50 y 75 mM presentaron valores intermedios con diferencias estadísticamente significativas entre estas tres agrupaciones. Con respecto al porcentaje de grasa presente en la materia seca, se puede observar el mayor valor en la muestra 0 mM, mientras que no se observan diferencias en las muestras entre 12,5 y 100 mM, por lo que la adición de sal disminuye el porcentaje de grasa residual en la FSA. Los conjuntos de yema de huevo utilizados en este experimento tuvieron una media de 62,65 % de grasa en la materia seca y, por tanto, un total de 31,36 % de grasa en los conjuntos de yemas (49,94 % de humedad). Una vez calculada la grasa eliminada en cada muestra, según los valores mostrados en la Tabla 3, la adición de NaCl no mejora la eliminación de grasa total.

Para la proteína total se observa que la adición creciente de NaCl incrementa la concentración proteica, siendo 100 mM el grupo con una mayor concentración y 0 mM la menor, mostrando el resto valores intermedios. Sin embargo, estas diferencias en proteína total no se reflejan en los parámetros relacionados con la IgY, donde no se observan diferencias debidas a la adición de NaCl (Tabla 3). Estos resultados se corroboran al observar los geles de electroforesis (Figuras 3 y 4), donde las bandas correspondientes a la IgY se encuentran en la zona superior del gel.



*Figura 3. Electroforesis en gel de las FSA de dos conjuntos de yemas de huevo a diferentes concentraciones de NaCl y un marcador de peso molecular. A la izquierda de la imagen se encuentra el marcador de peso molecular, con su peso correspondiente en kDa de cada banda. El carril 1 y 7 son 0 mM; 2 y 8, 12,5 mM; 3 y 9, 25 mM; 4 y 10, 50 mM; 5 y 11, 75 mM; y 6 y 12, 100 mM.*



*Figura 4. Electroforesis en gel de las FSA de dos conjuntos de yemas de huevo a diferentes concentraciones de NaCl. El carril 1 y 7 son 0 mM; 2 y 8, 12,5 mM; 3 y 9, 25 mM; 4 y 10, 50 mM; 5 y 11, 75 mM; y 6 y 12, 100 mM.*

## ***5. Discusión***

El principal problema para la purificación de la IgY es la alta cantidad de lípidos presentes en la yema de huevo. Por ese motivo, el primer procedimiento que se debe realizar es la separación de la fracción soluble en agua, donde se encuentran las inmunoglobulinas, de la fracción grasa. Se han estudiado diversos métodos basados principalmente en el empleo de solventes orgánicos tales como el cloroformo (Aulisio y Shelokov, 1967; Pauly et al., 2011), el polietilenglicol (PEG) (Polson et al., 1980; Goldring y Coetzer, 2003) o solventes polares como el etanol (Akita y Nakai, 1992; Horikoshi et al., 1993). La desnaturalización de la IgY puede ser un inconveniente al usar estos solventes, por lo que el estudio de otros métodos que produzcan mayor rendimiento y que no limiten su uso terapéutico, como es el caso del cloroformo, se han tornado claves para el desarrollo de esta tecnología. Es por esto que, el método basado en dilución en agua (Jensenius et al., 1981) se ha vuelto una alternativa óptima para este fin. Dicho método se ve afectado por diversos factores tales como el pH, el factor de dilución, la temperatura o la metodología empleada para su obtención.

El método de separación de la FSA empleado en este trabajo consistió en usar una dilución 1:10 de la yema de huevo en agua destilada, ajustando el pH a 5 con ácido clorhídrico 1 N para, posteriormente, congelar la muestra a -20 °C y finalmente filtrarla durante la descongelación. Además, se evaluaron las diferencias de rendimiento en la obtención de FSA trabajando con diferentes concentraciones de NaCl. En el primer experimento, a partir de la disolución 250 mM de NaCl, se puede observar que no se produce una separación adecuada entre las fracciones solubles y grasa de la yema de huevo. Esto se produce por la falta de agregación de los glóbulos de grasa debida a la concentración de sal. Este resultado está de acuerdo con el trabajo de Akita y Nakai (1992) donde establecieron que una concentración superior a 160 mM de NaCl impedía la agregación de glóbulos de grasa.

Con respecto a las concentraciones entre 0 y 100 mM, en la Tabla 3 se observan los parámetros evaluados para determinar los efectos de la adición de NaCl. El volumen obtenido en la FSA aumenta proporcionalmente con el incremento de la concentración de sal. Esto puede ser debido a que la adición de pequeñas concentraciones de NaCl favorece la agregación de glóbulos de grasa. Al haber una mayor agregación, hay más agua libre que se puede filtrar y ser parte de la fracción soluble en agua. En la literatura relacionada con la purificación de la IgY de la yema de huevo no se suele revelar el dato del volumen obtenido como FSA, por lo que no hay posibilidad de contrastar los resultados. Cabe destacar que este dato permite cuantificar la

masa total de la IgY purificada a partir del volumen de yema de huevo utilizado, por lo que su inclusión en este tipo de estudios permitiría un mejor análisis de los rendimientos de la purificación. Del mismo modo, la materia seca de la FSA aumenta cuando se incrementa la concentración de NaCl.

En cuanto al porcentaje de grasa residual presente en la materia seca, se observó que la adición de sal contribuía a su disminución. Esto podría deberse a que el incremento de concentración de sal aumenta la concentración de proteínas, y por tanto, en la materia seca, aunque se obtenga la misma cantidad de grasa, el porcentaje de esta última será menor en relación a la concentración de sal. La grasa presente en la materia seca de la FSA tiene una media de 25,97 % con respecto al 0,71 % de la materia seca, por lo que en este estudio se consiguió eliminar un 97,50 % de la grasa presente en la yema. Según la literatura, el hecho de diluir entre 8 y 10 veces la yema de huevo permite una mayor eficiencia en la separación de lípidos (Kwan et al., 1991). El porcentaje medio de grasa obtenido en la FSA es del 2,5 %, lo que supone un rendimiento acorde a otros métodos usados, donde se obtuvo un 1,2 % de grasa en la FSA tras centrifugar y refrigerar (Akita y Nakai, 1992) o un 5 % tras 24 horas de sedimentación (Fichtali et al., 1992).

Por otro lado, como se observa en la Tabla 3, la concentración total de proteínas, al igual que el volumen, incrementan sus valores a medida que lo hace la concentración de sales. Para las proteínas totales, la concentración 100 mM de NaCl supone una diferencia significativa en este apartado en comparación con no añadir sal y añadir 12,5 mM. La aplicación de este método supone la obtención de una media de 4,46 mg/mL, mejorando considerablemente el método aplicado por Ko y Ahn (2007) donde obtuvieron 0,71 mg/mL de media tras centrifugar las muestras durante 24 horas. Es de destacar que estos autores encontraron que la adición de NaCl disminuía la concentración total de proteínas, lo cual difiere con los datos obtenidos en este estudio.

En lo referente a la IgY, no se observan diferencias respecto a su porcentaje (media de 24,92 %). El porcentaje de la IgY del presente estudio es similar a datos encontrados en la literatura, Hodek et al. (2013) obtuvieron un 24 %, con una dilución a 1:7 con agua del grifo. Otros trabajos muestran porcentajes ligeramente inferiores, como Akita y Nakai (1992), que consiguieron entre un 15 y 18 % con el mismo método, o Fichtali et al. (1992), que obtuvieron un 18 % con respecto al total de proteínas, después de 24 horas de sedimentación, tras una segunda dilución/extracción a pH 5,5

La concentración media de IgY es de 1,1 mg/mL y no se observan diferencias debida la concentración de NaCl utilizadas. Esta se asemeja a otros datos publicados, por ejemplo, Ko y Ahn (2007) obtuvieron a temperatura ambiente una concentración de 1,11 mg/mL, a 4 °C, 1,12 mg/mL o, a -20 °C, 1,24 mg/mL, corroborando que no hay diferencias en la concentración de IgY obtenida cuando se varía la temperatura de almacenaje antes de su centrifugación. Por último, la cantidad total media de IgY presente en la FSA es de 137,63 mg. En cuanto a la cantidad de IgY total, se obtuvieron 1,01 g de IgY total por cada 100 g de yemas diluidas diez veces. Mientras, Ahn et al. (2006) consiguieron aislar 845 mg IgY por cada 100 g de yema a través de la centrifugación para separar sólidos.

## ***6. Conclusiones***

- La presencia de cloruro sódico en concentraciones en el rango de 0 a 100 mM no influye en la purificación de la inmunoglobulina Y de la yema de huevo.
- La concentración iónica está positivamente correlacionada con el volumen y con el porcentaje de materia seca de la fracción soluble en agua.
- El método utilizado elimina un porcentaje superior al 96 % de la grasa presente en la yema de huevo.
- La adición de sal aumenta la cantidad de proteínas de la fracción soluble en agua.

## ***Conclusions***

- The sodium chloride presence at concentrations in the range of 0 to 100 mM does not affect the immunoglobulin Y purification from egg yolk.
- The ionic concentration is positively correlated with the volume and the percentage of dry matter of the water-soluble fraction.
- The method used removes more than 96 % of the fat present in the egg yolk.
- The salt addition increases the amount of protein in the water-soluble fraction.

## ***7. Bibliografía***

- Ahn, D.U., S. Hyun Lee, H. Singam, E. Joo Lee, y J. Cherl Kim.** 2006. Sequential separation of main components from chicken egg yolk. *Food Sci. Biotechnol.* 15:189-195.
- Akita, E.M., y S. Nakai.** 1992. Immunoglobulins from Egg Yolk: Isolation and Purification. *J. Food Sci.* 57:629-634. doi:10.1111/j.1365-2621.1992.tb08058.x.
- Akita, E.M., y S. Nakai.** 1993. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J. Immunol. Methods* 160:207-214. doi:10.1016/0022-1759(93)90179-B.
- Amro, W.A., W. Al-Qaisi, y F. Al-Razem.** 2018. Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 16:99-103. doi:10.1016/j.jgeb.2017.10.003.
- Aulisio, C.G., y A. Shelokov.** 1967. Substitution of Egg Yolk for Serum in Indirect Fluorescence Assay For Rous Sarcoma Virus Antibody. *Exp. Biol. Med.* 126:312-315. doi:10.3181/00379727-126-32433.
- Chalghoumi, R., Y. Beckers, D. Portetelle, y A. Théwis.** 2009. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. *Biotechnol. Agron. Société Environ.* 13:295-308.
- Dávalos-Pantoja, L., J.L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-González, y R. Hidalgo-Álvarez.** 2000. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 11:657-673. doi:10.1163/156856200743931.
- Fichtali, J., E.A. Charter, K. V. Lo, y S. Nakai.** 1992. Separation of egg yolk immunoglobulins using an automated liquid chromatography system. *Biotechnol. Bioeng.* 40:1388-1394. doi:10.1002/bit.260401113.
- Goldring, J.P.D., y T.H.T. Coetzer.** 2003. Isolation of chicken immunoglobulins (IgY) from egg yolk. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 31:185-187. doi:10.1002/bmb.2003.494031030213.
- Hatta, H., K. Tsuda, S. Akachi, M. Kim, y T. Yamamoto.** 1993. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57:450-454. doi:10.1271/bbb.57.450.

- Hatta, H., K. Tsuda, M. Ozeki, M. Kim, T. Yamamoto, S. Otake, M. Hirasawa, J. Katz, N.K. Childers, y S.M. Michalek.** 1997. Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 31:268-274. doi:10.1159/000262410.
- Hodek, P., P. Trefil, J. Simunek, J. Hudecek, y M. Stiborova.** 2013. Optimized protocol of chicken antibody (IgY) purification providing electrophoretically homogenous preparations. *Int. J. Electrochem. Sci.* 8:113-124.
- Horikoshi, T., J. Hiraoka, M. Saito, y S. Hamada.** 1993. IgG antibody from hen egg yolks: purification by ethanol fractionation. *J. Food Sci.* 58:739-742. doi:10.1111/j.1365-2621.1993.tb09348.x.
- Jensenius, J.C., I. Andersen, J. Hau, M. Crone, y C. Koch.** 1981. Eggs: Conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J. Immunol. Methods* 46:63-68. doi:10.1016/0022-1759(81)90333-1.
- Klemperer, F.** 1893. Ueber natürliche immunität und ihre verwerthung für die immunisirungstherapie. *Arch. für die Exp. Pathol. und Pharmakologie* 31:356-382.
- Ko, K.Y., y D.U. Ahn.** 2007. Preparation of immunoglobulin Y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. *Poult. Sci.* 86:400-407.
- Kwan, L., E. Li-Chan, N. Helbig, y S. Nakai.** 1991. Fractionation of water-soluble and -insoluble components from egg yolk with minimum use of organic solvents. *J. Food Sci.* 56:1537-1541. doi:10.1111/j.1365-2621.1991.tb08635.x.
- Larsson, A., R. Balow, T.L. Lindahl, y P. Forsberg.** 1993. Chicken antibodies: Taking advantage of evolution-A review. *Poult. Sci.* 72:1807-1812. doi:10.3382/ps.0721807.
- Lee, D.H., Y.S. Jeon, C.K. Park, S. Kim, D.S. Lee, y C. Lee.** 2015. Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk antibody (IgY) against a recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein in piglets. *Arch. Virol.* 160:2197-2207. doi:10.1007/s00705-015-2494-z.
- Lee, K.A., S.K. Chang, Y.J. Lee, J.H. Lee, y N.S. Koo.** 2002. Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35:488-493.

doi:10.5483/BMBRep.2002.35.5.488.

- Lee, K.Y., M.S. Rahman, A.N. Kim, K. Gul, S.W. Kang, J. Chun, W.L. Kerr, y S.G. Choi.** 2019. Quality characteristics and storage stability of low-fat tofu prepared with defatted soy flours treated by supercritical-CO<sub>2</sub> and hexane. *LWT - Food Sci. Technol.* 100:237-243. doi:10.1016/j.lwt.2018.10.073.
- Martín Salazar, J.** 2019. Efecto del etanol en el reconocimiento de microorganismos mediante anticuerpos policlonales IgY. Trabajo de Fin de Grado. Universidad de la Laguna.
- Morales-delaNuez, A., L. Hernández-Castellano, I. Moreno-Indias, D. Sánchez-Macías, A. Argüello, y N. Castro.** 2020. Use of glycerol and propylene glycol as additives in heat-treated goat colostrum. *J. Dairy Sci.* 103:2756-2761. doi:10.3168/jds.2019-17535.
- Pauly, D., P.A. Chacana, E.G. Calzado, B. Brembs, y R. Schade.** 2011. IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. *J. Vis. Exp.* 1-6. doi:10.3791/3084.
- Polson, A., M.B. von Wechmar, y M.H.V. van Regenmortel.** 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol. Commun.* 9:475-493. doi:10.3109/08820138009066010.
- Reese, H., T. Bordelon, F. Odeh, A. Broussard, C. Kormos, A. Murphy, C. Shanahan, y S. Menegatti.** 2020. Purification of animal immunoglobulin G (IgG) using peptoid affinity ligands. *Biotechnol. Prog.* 36:1-13. doi:10.1002/btpr.2994.
- Russell, W.M.S., y R.L. Burch.** 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique.* 252 pp. Methuen and Co. Ltd, London, UK.
- Schade, R., E.G. Calzado, R. Sarmiento, P.A. Chacana, J. Porankiewicz-Asplund, y H.R. Terzolo.** 2005. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *ATLA Altern. to Lab. Anim.* 33:129-154. doi:10.1177/026119290503300208.
- Schade, R., y A. Hlinak.** 1993. Egg yolk antibodies, state of the art and future prospects. *ALTEX* 13:5-9.
- Schade, R., y H.R. Terzolo.** 2006. IgY-technology: application and trends. In 12th European

Poultry Conference. World Poultry Science Association, Verona, Italy.

- Sriprabhom, J., P. Luangpituksa, J. Wongkongkatep, T. Pongtharangkul, y M. Suphantharika.** 2019. Influence of pH and ionic strength on the physical and rheological properties and stability of whey protein stabilized o/w emulsions containing xanthan gum. *J. Food Eng.* 242:141-152. doi:10.1016/j.jfoodeng.2018.08.031.
- Tsubokura, K., E. Berndtson, A. Bogstedt, B. Kaijser, M. Kim, M. Ozeki, y L. Hammarström.** 1997. Oral administration of antibodies as prophylaxis and therapy in *Campylobacter jejuni*-infected chickens. *Clin. Exp. Immunol.* 108:451-455. doi:10.1046/j.1365-2249.1997.3901288.x.
- Xu, Y., X. Li, L. Jin, Y. Zhen, Y. Lu, S. Li, J. You, y L. Wang.** 2011. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: A review. *Biotechnol. Adv.* 29:860-868. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.07.003.
- Zhou, X., Y. Wang, D.U. Ahn, y Z. Cai.** 2020. An easy and simple separation method for Fc and Fab fragments from chicken immunoglobulin Y (IgY). *J. Chromatogr. B* 1141:1-6. doi:10.1016/j.jchromb.2020.122011.