



UNIVERSIDAD DE JAÉN
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR
DE LINARES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FÍSICA Y ANALÍTICA

TESIS DOCTORAL

**OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE
FICOCIANINAS MEDIANTE
CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN EN
LECHO EXPANDIDO. ESCALADO DEL
PROCESO, CARACTERIZACIÓN
FISICOQUÍMICA Y APLICACIÓN COMO
COLORANTES NATURALES**

**PRESENTADA POR:
AMPARO RAMOS MOLINA**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. RUPERTO BERMEJO ROMÁN**

JAÉN, 28 DE ABRIL DE 2011

**ISBN 978-84-8439-652-9
DEPÓSITO LEGAL J-1182-2012**

UNIVERSIDAD DE JAÉN

Departamento de Química Física y Analítica



TESIS DOCTORAL

OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FICOCIANINAS
MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE ADSORCIÓN EN
LECHO EXPANDIDO. ESCALADO DEL PROCESO,
CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA Y
APLICACIÓN COMO COLORANTES NATURALES.

Amparo Ramos Molina
Linares, 2011

D. RUPERTO BERMEJO ROMÁN

CERTIFICA:

Que el trabajo desarrollado en la presente Memoria, con el título “Obtención y purificación de ficocianinas mediante cromatografía de adsorción en lecho expandido. Escalado del proceso, caracterización fisicoquímica y aplicación como colorantes naturales”, que presenta D^a Amparo Ramos Molina para optar al Grado de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección en los laboratorios del Departamento de Química-Física y Analítica, de la Escuela Politécnica Superior de Linares perteneciente a la Universidad de Jaén.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Linares, a 4 de Marzo de 2011.

Fdo.: Dr. D. Ruperto Bermejo Román
Profesor Titular de Química Física
Universidad de Jaén

Tesis Doctoral presentada por D^a Amparo Ramos Molina, Licenciada en Ingeniería Química, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Jaén.

Fdo: D^a Amparo Ramos Molina.

La presente Memoria se enmarca dentro del proyecto de investigación titulado “Desarrollo de un proceso de obtención de colorantes naturales de interés biotecnológico a partir de microalgas”, proyecto de Excelencia TEP1362 financiado por la Junta de Andalucía. Así como en el programa de Doctorado titulado “Metodología y Técnicas de Investigación en Química Fundamental y Aplicada”.

Agradeciendo así a la Junta de Andalucía, la beca predoctoral asociada a dicho proyecto.

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento al Profesor Dr. Ruperto Bermejo, impulsor de esta Tesis, por descubrirme el mundo de la investigación y por dejarme participar en sus proyectos, por ser mi mentor y por enseñarme tantas y tantas cosas, por su buen hacer, por su ayuda y su cordialidad y por la paz, el apoyo y la amistad que siempre me ha transmitido, tanto en el plano profesional como en el personal.

También quiero agradecer a Paco por su desinteresada ayuda durante el tiempo en el que fuimos compañeros, a Rafi, por haber compartido conmigo buenas tardes de laboratorio, a Esmeralda por haber puesto su granito de arena en que esta Tesis se haya llevado a cabo, a Bea, Monaim, Jose Tillo, Luisa y Pilar, por tantos ratos que hemos compartido durante estos años y a Cynthia por su colaboración y constante prestación.

Debo agradecer al Profesor Fontana del laboratorio de proteómica del CRIBI de la Universidad de Pádova (Italia), por haberme permitido realizar mi estancia predoctoral en su laboratorio, a Bárbara por su gran acogida y dedicación y por haberme tutelado y enseñado durante mi estancia, así como a Samanta.

También quiero expresar mi agradecimiento a los Profesores Dres. Gabriel Acién y José M^a Fernández de la Universidad de Almería por su colaboración.

Cómo no, a mis compañeros del A-233 (C.R.), Antonio, Fran, Julio, José, Juan, Pedro, Pablo, David y en especial a Rocío, por hacer que esta última etapa haya sido tan agradable y amena.

También quiero agradecer enormemente a mi familia, especialmente a mis padres, a los que tanto debo, por estar siempre ahí incondicionalmente y por su gran cariño.

A mis amigas Mercedes y M^aJosé por escucharme, brindarme su apoyo y tener siempre un abrazo disponible.

Y por último mi agradecimiento a Javier, mi marido, mi pilar, por su constante apoyo y cariño.

INDICES

ÍNDICE GENERAL

1.- INTRODUCCIÓN. OBJETIVO DE LA MEMORIA	1
2.- ANTECEDENTES.	
2.1.-INTERÉS PRÁCTICO DE LAS MICROALGAS.	4
2.1.1.-Las microalgas frente a cultivos convencionales	4
2.1.2.-Aplicaciones	7
2.2.-BILIPROTEINAS.	18
2.2.1.-Generalidades	18
2.2.2.-Composición en subunidades	21
2.2.3.-Secuencia de aminoácidos.....	24
2.2.4.-Contenido y composición en bilinas	27
2.2.5.-Estados de agregación	29
2.2.6.-Propiedades relevantes para sus distintas aplicaciones	31
2.2.6.1.-Propiedades espectroscópicas.	31
2.2.6.2.-Punto isoelectrico y estabilidad de los oligómeros.	35
2.2.7.-Aplicaciones	36
2.2.7.1.-Colorantes naturales	36
2.2.7.2.-Marcadores fluorescentes.....	37
2.2.7.3.-Otras aplicaciones	39
2.3.-PURIFICACIÓN DE PROTEINAS.	40
2.3.1.-Generalidades	40
2.3.2.-Purificación de biliproteínas	42
2.3.2.1.-Metodologías convencionales	42
2.3.2.2.-Metodologías basadas en adsorción en lecho expandido	43
2.4.-CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN EN LECHO EXPANDIDO.	44
2.4.1.-Principios de la adsorción en lecho expandido	47
2.4.2.-Características de diseño	48
2.4.3.-Características de funcionamiento	51
2.5.-SOLUBILIZACIÓN DE PROTEINAS EN MEDIOS APOLARES.....	53
2.5.1.-Generalidades	55
2.5.2.-Técnicas de solubilización	56
2.5.3.-Estructuras de micelas reversas conteniendo proteínas.....	57
2.6.-ESTUDIOS DE COLOR.....	60
2.6.1.-El color	60
2.6.1.1.-La medida del color.....	61

2.6.2.-Colorantes	63
2.6.2.1.-Tipos de colorantes	63
2.6.2.2.-Colorantes en alimentación	64
2.6.2.2.1.-Clasificación y características de los colorantes alimentarios	65

3.- MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1.-MATERIALES.....	70
3.1.1.-Reactivos.....	70
3.1.2.-Instrumentación.....	71
3.1.3.-Material biológico.....	78
3.2.-MÉTODOS.....	79
3.2.1.-Preparación de disoluciones	79
3.2.2.-Técnicas de extracción y purificación	83
3.2.2.1.-Evaluación del contenido total de biliproteínas.....	84
3.2.2.2.-Tratamientos previos	85
3.2.2.2.1.-Optimización del medio de extracción	85
3.2.2.2.2.-Optimización de la fuerza iónica del medio.....	85
3.2.2.2.3.-Optimización de la exposición a ultrasonidos.....	86
3.2.2.2.4.-Extracción preparativa.....	86
3.2.2.3.-Cromatografía de adsorción en lecho expandido.....	87
3.2.2.3.1.-Estimación de la capacidad de adsorción	87
3.2.2.3.2.-Cromatografía en columna de lecho expandido.....	89
3.2.2.4.-Cromatografía de exclusión molecular.....	93
3.2.2.5.-Cromatografía de intercambio iónico.....	94
3.2.3.-Técnicas espectroscópicas	96
3.2.3.1.-Espectroscopía de absorción uv-visible.....	96
3.2.3.2.-Espectroscopía de fluorescencia.....	97
3.2.3.3.-Espectrocolorimetría.....	100
3.2.3.4.-Espectrometría de masas.....	101
3.2.4.-Electroforesis	102
3.2.4.1.-Principio del método.....	102
3.2.4.2.-Composición y preparación de los geles de poliacrilamida.....	104
3.2.4.3.-Preparación de la muestra y desarrollo de la electroforesis.....	106
3.2.5.-Solubilización de proteínas en medios hidrocarbonados.....	107
3.2.6.-Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	111

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.-EVALUACIÓN DEL CONTENIDO EN BILIPROTEINAS.	113
4.2.-PURIFICACIÓN DE BILIPROTEINAS.....	116
4.2.1.-Tratamientos previos	116
4.2.1.1.-Optimización de la fase de extracción.....	116
4.2.1.2.-Optimización de la fuerza iónica del medio de extracción.	122
4.2.1.3.-Optimización de la exposición a ultrasonidos.....	126
4.2.1.4.-Disoluciones enriquecidas en biliproteínas	129
4.2.2.-Cromatografía de adsorción en lecho expandido	130
4.2.2.1.-Cálculo de la capacidad de adsorción del relleno.	131
4.2.2.1.1.-Capacidad estática (Isotermas de adsorción).	131
4.2.2.1.2.-Capacidad dinámica (Curvas de ruptura).....	139
4.2.2.2.-Optimización de variables de trabajo.....	144
4.2.2.2.1.-Comportamiento hidrodinámico del sistema.....	145
4.2.2.2.2.-Influencia del grado de expansión.....	147
4.2.2.2.3.-Influencia de la viscosidad.	149
4.2.2.3.-Escalado del proceso.	153
4.2.2.3.1.-Columna de 1'5 cm.	153
4.2.2.3.2.-Columna de 2'5 cm.	162
4.2.2.3.3.-Columna de 4 cm	168
4.2.2.3.4.-Columna de 6 cm.	172
4.2.3.-Producción de ficocianinas ultrapuras	177
4.2.3.1.-Cromatografía de exclusión molecular.	178
4.2.3.2.-Cromatografía de intercambio iónico.....	179
4.2.3.3.-Evaluación global del proceso de purificación.	183
4.2.4.-Identificación de las biliproteínas purificadas.....	184
4.2.4.1.-Análisis espectroscópico.	185
4.2.4.2.-Electroforesis.....	190
4.2.4.3.-Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	193
4.2.5.-Planta piloto para producción de biliproteínas.....	196
4.2.5.1.-Columna de 50 · 9cm.	197
4.2.5.2.-Columna escala piloto para producción de ficocianinas (15·130cm).....	198

4.3.-CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE BILIPROTEINAS Y SUS SUBUNIDADES.	205
4.3.1.-Caracterización de las biliproteínas purificadas	206
4.3.1.1.-Determinación de pesos moleculares.....	206
4.3.1.2.-Determinación de los parámetros espectroscópicos.	210
4.3.1.2.1.-Coeficiente de extinción molar	210
4.3.1.2.2.-Intervalo lineal intensidad de fluorescencia y concentración.	213
4.3.1.3.-Estabilidad.	217
4.3.1.3.1.-Estabilidad frente al pH	217
4.3.1.3.2.-Estabilidad frente a la fuerza iónica.....	223
4.3.1.3.3.-Estabilidad frente al tiempo	226
4.3.1.4.-Caracterización estructural mediante espectroscopía	227
4.3.2.-Caracterización de las subunidades	235
4.3.2.1.-Obtención mediante HPLC.....	236
4.3.2.2.-Caracterización de subunidades.....	237
4.3.2.2.1.-Caracterización en el medio de separación.....	237
4.3.2.2.2.-Caracterización en medio acuoso.....	239
4.4.-APLICACIÓN DE LAS BILIPROTEINAS COMO COLORANTES.	240
4.4.1.- Ensayos de solubilización en medios hidrocarbonados.....	240
4.4.1.1.-Influencia del tamaño micelar.	241
4.4.1.2.-Estabilidad.	255
4.4.2.-Aplicaciones a muestras reales.	260
4.4.2.1.-Ensayos de coloración.	261
4.4.2.1.1.-Bebidas isotónicas.	261
4.4.2.1.2.-Licores sin alcohol.....	272
4.4.2.1.3.-Helados.	281
4.4.2.2.-Ensayos de estabilidad.....	286
4.4.2.3.-Factores de tinción.....	288
5.- CONCLUSIONES	290
6.- BIBLIOGRAFÍA	293
7.- ANEXOS	312

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>FIGURA</u>	<u>Pag.</u>
Figura 2.1.....	29
Figura 2.2.....	45
Figura 2.3.....	46
Figura 2.4.....	50
Figura 2.5.....	52
Figura 2.6.....	55
Figura 2.7.....	57
Figura 2.8.....	58
Figura 2.9.....	61
Figura 2.10.....	63
Figura 3.1.....	83
Figura 3.2.....	88
Figura 3.3.....	90
Figura 3.4.....	91
Figura 3.5.....	95
Figura 3.6.....	103
Figura 3.7.....	110
Figura 4.1.....	129
Figura 4.2.....	130
Figura 4.3.....	132
Figura 4.4.....	133
Figura 4.5.....	134
Figura 4.6.....	135
Figura 4.7.....	136
Figura 4.8.....	136
Figura 4.9.....	137
Figura 4.10.....	137
Figura 4.11.....	140
Figura 4.12.....	141
Figura 4.13.....	142
Figura 4.14.....	146
Figura 4.15.....	148
Figura 4.16.....	152
Figura 4.17.....	155
Figura 4.18.....	156
Figura 4.19.....	157

Figura 4.20.....	158
Figura 4.21.....	159
Figura 4.22.....	160
Figura 4.23.....	163
Figura 4.24.....	165
Figura 4.25.....	167
Figura 4.26.....	169
Figura 4.27.....	170
Figura 4.28.....	171
Figura 4.29.....	173
Figura 4.30.....	174
Figura 4.31.....	175
Figura 4.32.....	179
Figura 4.33.....	181
Figura 4.34.....	186
Figura 4.35.....	188
Figura 4.36.....	189
Figura 4.37.....	190
Figura 4.38.....	191
Figura 4.39.....	192
Figura 4.40.....	193
Figura 4.41.....	194
Figura 4.42.....	195
Figura 4.43.....	196
Figura 4.44.....	198
Figura 4.45.....	202
Figura 4.46.....	207
Figura 4.47.....	208
Figura 4.48.....	209
Figura 4.49.....	210
Figura 4.50.....	211
Figura 4.51.....	212
Figura 4.52.....	213
Figura 4.53.....	215
Figura 4.54.....	215
Figura 4.55.....	216
Figura 4.56.....	218
Figura 4.57.....	218
Figura 4.58.....	219
Figura 4.59.....	220

Figura 4.60.....	220
Figura 4.61.....	221
Figura 4.62.....	222
Figura 4.63.....	222
Figura 4.64.....	223
Figura 4.65.....	224
Figura 4.66.....	225
Figura 4.67.....	225
Figura 4.68.....	226
Figura 4.69.....	229
Figura 4.70.....	230
Figura 4.71.....	231
Figura 4.72.....	233
Figura 4.73.....	234
Figura 4.74.....	235
Figura 4.75.....	236
Figura 4.76.....	238
Figura 4.77.....	238
Figura 4.78.....	239
Figura 4.79.....	240
Figura 4.80.....	242
Figura 4.81.....	243
Figura 4.82.....	244
Figura 4.83.....	245
Figura 4.84.....	245
Figura 4.85.....	247
Figura 4.86.....	248
Figura 4.87.....	249
Figura 4.88.....	249
Figura 4.89.....	250
Figura 4.90.....	251
Figura 4.91.....	252
Figura 4.92.....	254
Figura 4.93.....	256
Figura 4.94.....	257
Figura 4.95.....	258
Figura 4.96.....	259
Figura 4.97.....	263
Figura 4.98.....	263
Figura 4.99.....	264

Figura 4.100.....	267
Figura 4.101.....	267
Figura 4.102.....	268
Figura 4.103.....	270
Figura 4.104.....	270
Figura 4.105.....	271
Figura 4.106.....	274
Figura 4.107.....	274
Figura 4.108.....	275
Figura 4.109.....	277
Figura 4.110.....	279
Figura 4.111.....	279
Figura 4.112.....	282
Figura 4.113.....	283
Figura 4.114.....	284
Figura 4.115.....	285
Figura 4.116.....	287
Figura 4.117.....	287
Figura 4.118.....	288

ÍNDICE DE TABLAS

<u>TABLA</u>	<u>Pag.</u>
Tabla 2.1	5
Tabla 2.2	5
Tabla 2.3	9
Tabla 2.4	10
Tabla 2.5	19
Tabla 2.6	8
Tabla 2.7	28
Tabla 2.8	32
Tabla 2.9	56
Tabla 2.10	59
Tabla 3.1	81
Tabla 3.2	105
Tabla 3.3	108
Tabla 3.4	109
Tabla 3.5	111
Tabla 3.6	111
Tabla 4.1	113
Tabla 4.2	114
Tabla 4.3	114
Tabla 4.4	115
Tabla 4.5	116
Tabla 4.6	117
Tabla 4.7	119
Tabla 4.8	120
Tabla 4.9	121
Tabla 4.10	122
Tabla 4.11	123
Tabla 4.12	124
Tabla 4.13	125
Tabla 4.14	127
Tabla 4.15	128
Tabla 4.16	138
Tabla 4.17	143
Tabla 4.18	146
Tabla 4.19	147
Tabla 4.20	149
Tabla 4.21	150

Tabla 4.22	151
Tabla 4.23	311
Tabla 4.24	312
Tabla 4.25	314
Tabla 4.26	314
Tabla 4.27	316
Tabla 4.28	316
Tabla 4.29	162
Tabla 4.30	318
Tabla 4.31	319
Tabla 4.32	321
Tabla 4.33	322
Tabla 4.34	324
Tabla 4.35	324
Tabla 4.36	168
Tabla 4.37	326
Tabla 4.38	326
Tabla 4.39	329
Tabla 4.40	330
Tabla 4.41	332
Tabla 4.42	333
Tabla 4.43	172
Tabla 4.44	335
Tabla 4.45	336
Tabla 4.46	339
Tabla 4.47	340
Tabla 4.48	343
Tabla 4.49	344
Tabla 4.50	175
Tabla 4.51	176
Tabla 4.52	176
Tabla 4.53	176
Tabla 4.54	178
Tabla 4.55	180
Tabla 4.56	183
Tabla 4.57	183
Tabla 4.58	184
Tabla 4.59	187
Tabla 4.60	197
Tabla 4.61	346

Tabla 4.62	348
Tabla 4.63	200
Tabla 4.64	350
Tabla 4.65	351
Tabla 4.66	205
Tabla 4.67	211
Tabla 4.68	214
Tabla 4.69	260
Tabla 4.70	262
Tabla 4.71	266
Tabla 4.72	269
Tabla 4.73	273
Tabla 4.74	276
Tabla 4.75	278
Tabla 4.76	281
Tabla 4.77	282
Tabla 4.78	283
Tabla 4.79	289

ÍNDICE DE ECUACIONES

<u>ECUACIÓN</u>	<u>Pag.</u>
Ecuación 2.1	56
Ecuación 2.2	56
Ecuación 3.1	79
Ecuación 3.2	79
Ecuación 3.3	79
Ecuación 3.4	80
Ecuación 3.5	80
Ecuación 3.6	82
Ecuación 3.7	82
Ecuación 3.8	84
Ecuación 3.9	84
Ecuación 3.10	84
Ecuación 3.11	84
Ecuación 3.12	98
Ecuación 3.13	98
Ecuación 3.14	98
Ecuación 3.15	98
Ecuación 3.16	100
Ecuación 3.17	100
Ecuación 3.18	102
Ecuación 3.19	109
Ecuación 3.20	109
Ecuación 3.21	109
Ecuación 4.1	131
Ecuación 4.2	132
Ecuación 4.3	139
Ecuación 4.4	264

ÍNDICE DE IMÁGENES

<u>IMAGEN</u>	<u>Pag.</u>
Imagen 2.1	7
Imagen 3.1	78
Imagen 3.2	86
Imagen 3.3	89
Imagen 3.4	93
Imagen 3.5	94
Imagen 3.6	97
Imagen 3.7	99
Imagen 3.8	103
Imagen 4.1	118
Imagen 4.2	134
Imagen 4.3	143
Imagen 4.4	145
Imagen 4.5	154
Imagen 4.6	164
Imagen 4.7	166
Imagen 4.8	182
Imagen 4.9	185
Imagen 4.10	199
Imagen 4.11	201
Imagen 4.12	203
Imagen 4.13	204
Imagen 4.14	228
Imagen 4.15	232
Imagen 4.16	234
Imagen 4.17	237
Imagen 4.18	265
Imagen 4.19	272
Imagen 4.20	280
Imagen 4.21	284

ABREVIATURAS

AOT: Dioctilsulfosuccinato
APC: aloficocianina
B-PE: B-ficoeritrina
CALE: Cromatografía de adsorción en lecho expandido
CMC: Concentración micelar crítica
C-PC: C-ficocianina
Da: Dalton
DBV: Dihidrobiliverdina
DEAE: Dietilaminoetil
□: coeficiente de extinción molar
EBA: Expanded bed adsorption
EFAs: Ácidos grasos esenciales
EFSA: European Food Safety Authority
FAO: Food and Agriculture Organization
FD: Factor de dilución
FI: Fuerza iónica
FRET: Transferencia resonante de energía por fluorescencia
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
Hz: Hercio
PEB: ficoeritrobilina
PUB: ficourobilina
PUFAS: ácidos grasos poliinsaturados
PCB: ficocianobilina
PXB: ficobiliviolina
Pm: peso molecular
R-PC: R-ficocianina
Rpm: revoluciones por minuto
SDS: dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SBV: Settled bed volume
TEMED: (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina)
TFA: Acido trifluoroacético
UA: Unidades arbitrarias

AMINOÁCIDOS:

A: Alanina

C: Cisteina

D: Acido aspártico

E: Acido glutámico

F: Fenilalanina

G: Glicina

H: Histidina

I: Isoleucina

K: Lisina

L: Leucina

M: Metionina

N: Asparagina

P: Prolina

Q: Glutamina

R: Arginina

S: Serina

T: Treonina

V: Valina

W: Triptófano

Y: Tirosina

1. INTRODUCCIÓN

Las biliproteínas son macromoléculas biológicas con grupos prostéticos tetrapirrólicos lineales (denominados bilinas) enlazados covalentemente a la cadena de la apoproteína, mediante enlaces específicos en los residuos cisteína. Estos compuestos son hidrosolubles y forman complejos antena denominados ficobilisomas, que actúan como accesorios fotosintéticos en diversas microalgas como las cianobacterias, las algas rojas y las cryptomonadales (Glazer, 1994; Glazer, 1999). Tomando como base sus propiedades espectroscópicas, las biliproteínas se pueden dividir en cuatro grupos principales: las ficoeritrinas (con máximos de absorción entre 540-570 nm), las ficocianinas (máximos entre 610-620 nm), aloficocianinas (máximos entre 650-655 nm) y las ficoeritrocianinas (máximos entre 570 y 595 nm).

Las biliproteínas poseen múltiples aplicaciones, destacando su utilización como marcadores fluorescentes de células y otras macromoléculas, en técnicas fluorescentes altamente sensibles e investigación biomédica (Kronic y Grosman, 1983; Glazer y Stryer, 1984). Estas macromoléculas también han mostrado poseer valor terapéutico debido a su efecto protector y su actividad anticarcinogénica (González y col., 1999; Huang y col., 2002). Particularmente, las ficocianinas poseen propiedades muy beneficiosas desde el punto de vista médico y farmacológico, habiendo sido ensayadas en diferentes estudios que demuestran su capacidad anticarcinogénica (Remirez y col., 1999), actividad antioxidante y antiinflamatoria (Benedetti y col., 2006; Bhat y Madyastha., 2000) y su valor para el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer y el Parkinson (Rimbau y col., 2001).

Por otro lado, actualmente existe una tendencia manifiesta a la utilización de colorantes naturales en diversos sectores industriales (alimentación, cosmética, farmacia, etc.) y a disminuir el uso de colorantes sintéticos, algunos de los cuales son potencialmente cancerígenos y buena parte de los mismos generan reacciones alérgicas en individuos susceptibles (Arad y Yaron, 1992; Ayyagari y col., 1995). Los colorantes naturales son considerados en general, compuestos inocuos y consecuentemente las limitaciones específicas en su utilización, son menores que las que afectan a los colorantes sintéticos. Sin embargo, el número de colorantes naturales y su gama de colores, son escasos en relación con las necesidades reales de este tipo de industrias. En este sentido, los colores que presentan las biliproteínas se asocian fácilmente con el mundo natural. Así, las ficoeritrinas son de colores rosas y rojizos, las ficocianinas y ficoeritrocianinas van desde el morado al azul intenso, y las aloficocianinas poseen un característico color verde-azulado. Por todo esto, estas

macromoléculas poseen un enorme potencial como colorantes naturales, para alimentación, cosmética y farmacia, pudiendo sustituir a colorantes sintéticos (Akhilender y col., 1999) y constituyendo una alternativa real para el incremento y diversificación de la oferta actual de colorantes naturales existentes en el mercado.

Hasta el momento, el gran potencial de aplicación que muestran la biliproteínas apenas ha podido ser aprovechado por la escasa disponibilidad de las mismas. Puede decirse que existen diversas microalgas que poseen estas macromoléculas, pero no hay métodos efectivos de aislamiento y purificación. Así, existe un déficit importante de estudios que aborden la obtención y purificación de proteínas en general y de biliproteínas en particular, en la media y gran escala de producción, ya que las metodologías convencionales describen procesos complejos que son difícilmente escalables. Así, las metodologías convencionales para la purificación de biliproteínas constan de múltiples subetapas, cada una de las cuales disminuye el rendimiento de recuperación proteica y produce un incremento en los costes globales del proceso. En términos generales, existen dos etapas principales: inicialmente se realiza un tratamiento previo de la biomasa microalgal que genera un extracto crudo rico en proteínas, listo para ser utilizado en una etapa posterior de refinado del proceso de purificación, que normalmente hace uso de métodos cromatográficos. Los métodos convencionales descritos, obtienen extractos proteicos por combinación de diferentes etapas y subetapas, que en general no son escalables. Además, el elevado número de operaciones unitarias necesarias, incrementa los costes de producción y el tiempo necesario para optimizar la purificación. Así, este tipo de procesos sólo obtiene pequeñas cantidades de proteínas y el fin de la mayor parte de los estudios, es caracterizar las macromoléculas, sin interesarse por el rendimiento de recuperación y la obtención de cantidades apreciables.

Sin embargo, y como se ha comentado anteriormente, la aplicaciones de las proteínas en general y de las biliproteínas en particular, así como la potencial demanda en el mercado de colorantes naturales, hace que se busquen métodos susceptibles de ser utilizados en la media y gran escala de producción. En este sentido, a mediados de los 90's aparece una técnica alternativa de bioseparación denominada cromatografía de adsorción en lecho expandido (CALE), la cual reduce drásticamente el número de etapas a considerar en la purificación de proteínas, mediante la adsorción de las macromoléculas, en rellenos cromatográficos específicamente diseñados y disponibles para intercambio aniónico, catiónico y de afinidad (Chase, 1994; Chang y Chase, 1996). Mediante esta metodología, las subetapas

de clarificación, concentración y captura, se reducen y unifican en una sola, capturándose las proteínas procedentes del extracto original sin necesidad de eliminar el material particulado que forma parte de él (Chang y Chase, 1996; Chang y col., 1998; Clemmitt y Chase, 2000). El uso de esta técnica produce un extracto concentrado y parcialmente puro de la proteína de interés, el cual se utiliza en la siguiente etapa de purificación, que usualmente suele ser de tipo cromatográfico en formato empaquetado, para conseguir obtener el producto puro deseado.

Por tanto, la utilización de CALE permite el escalado del proceso, pues con este tipo de cromatografía se puede estudiar el incremento del tamaño de columna y el aumento de los volúmenes de muestra a aplicar, sin los problemas que supondría para ello la cromatografía convencional empaquetada. Además, se simplifica la ruta de operación para la recuperación con elevados rendimientos de un gran número de proteínas y las consiguientes ventajas en cuanto a la disminución de costos operacionales y de equipamiento necesario.

En resumen, el objetivo final de esta Memoria, ha sido la puesta a punto de una nueva metodología basada en la adsorción en lecho expandido, para la obtención de ficocianinas procedentes de diferentes especies de microalgas. Así, se han optimizado las variables de trabajo en la pequeña escala, para posteriormente abordar el escalado del proceso y obtener estas biliproteínas en grandes cantidades. También se ha realizado la caracterización físico-química completa de las ficocianinas y se ha ensayado la capacidad colorante de estas macromoléculas, estudiando el efecto de su adición a matrices reales constituidas por alimentos y bebidas.

2.

ANTECEDENTES

2.1.-INTERÉS PRÁCTICO DE LAS MICROALGAS.

Los organismos fotosintéticos son aquellos capaces de captar la energía contenida en la luz solar (fuente primaria de alimentos, combustibles y materiales orgánicos) y transformarla en energía química que queda almacenada.

Las microalgas son organismos fotosintéticos que contienen, entre otros componentes, clorofila y diversos pigmentos, capaces de llevar a cabo la conversión de la energía solar en energía química empleando el agua como dador final de electrones. Estos organismos son los más eficientes conversores de energía solar debido a su sencilla estructura celular y conforman un grupo muy heterogéneo, incluyendo miles de especies pertenecientes a diversos grupos taxonómicos, con variada morfología, tamaño y hábitat; son responsables de más del 40% de la fotosíntesis que se lleva a cabo en la Tierra, con una producción de alrededor de 10^{11} Toneladas (peso seco) de biomasa al año (Guerrero y Losada, 1989).

2.1.1.-LAS MICROALGAS FRENTE A CULTIVOS CONVENCIONALES.

Las microalgas, constituyen un grupo de microorganismos fotosintéticos extraordinariamente eficientes en lo que se refiere a la conversión de energía luminosa en energía química almacenada. Así, son más eficientes que las plantas oleaginosas en la captura de la energía solar, pudiendo llegar a alcanzar rendimientos fotosintéticos muy altos (hasta el 5%) con una organización celular más simple.

La productividad de biomasa es notablemente superior a la de los cultivos agrícolas convencionales, del orden de 50 a 200 toneladas (peso seco) por hectárea y año. Los requerimientos para su crecimiento como luz, azúcares, dióxido de carbono, nitrógeno, fósforo y potasio son bajos y tienen alta capacidad para producir sustancias como lípidos, proteínas y carbohidratos en grandes cantidades y en cortos periodos de tiempo (Brennan y Owende, 2010).

Por otro lado, los cortos tiempos de generación permiten un rápido crecimiento y la rápida recuperación del cultivo en caso de que se produzca algún contratiempo o invasión del zooplancton, precisando su cultivo de una superficie muy pequeña en comparación con otros como la soja, maíz, etc. (Tabla 2.1).

Por otra parte, las microalgas presentan la posibilidad de crecer en aguas salobres o marinas (Verma y col., 2010) e incluso con residuos orgánicos, pudiéndose así aprovechar aguas no aptas para la agricultura tradicional ya que el consumo de nutrientes que necesitan es pequeño en comparación al gran aporte que de ellos precisa dicha agricultura (como ejemplo, el cultivo de microalgas necesita una cantidad de agua cinco veces menor que los tradicionales cultivos de alfalfa y maíz) (Tabla 2.2).

Tabla 2.1

Superficie de terreno necesaria para producir 1 kg de proteína (Henrikson, 1994).

Cultivo	Superficie (m ²)	Calidad del Terreno
<i>Spirulina</i> (65% proteína)	0'5	Estéril
Soja (34% proteína)	16	Fértil
Maíz (9% proteína)	22	Fértil
Buey alimentado con grano (20% proteína)	193	Fértil

Tabla 2.2

Agua necesaria para producir 1 kg de proteína (Henrikson, 1994).

Cultivo	Litros	Calidad del agua
<i>Spirulina</i> (65% proteína)	2498	Salobre
Soja (34% proteína)	8860	Dulce
Maíz (9% proteína)	12416	Dulce
Buey alimentado con grano (20% proteína)	104000	Dulce

El cultivo comercial de microalgas a gran escala comenzó al inicio de la década de los 60 en Japón con el cultivo de *Chlorella*, seguido por el establecimiento de mejoras en el cultivo y cosecha de *Arthrospira* en el lago Texcoco a principios de los 70. En 1980 ya había en Asia 46 factorías de producción a gran escala, capaces de producir 1000 kg de microalgas (principalmente *Chlorella*) por mes. En 1986, la producción comercial de *Dunaliella salina* como fuente de β -caroteno por las empresas Western Biotechnology (Hutt Lagoon, Australia) y Betatene (Whyalla, Australia) llegó a ser la tercera industria microalgal más importante. Poco después se establecieron plantas en Israel y EEUU, a la vez que en India comenzó la producción a gran escala de cianobacterias (Spolaore y col., 2006).

La biodiversidad de microalgas es enorme y se estima que hay entre 200.000 y varios millones de especies. Esa gran diversidad y consecuente variabilidad en la composición bioquímica de la biomasa obtenida de cultivos de microalgas, unido a la mejora genética y al establecimiento de tecnología de producción masiva que se han producido en los últimos 30 años, han permitido cultivar comercialmente varias especies, siendo la producción actual de biomasa microalgal de 5.000 toneladas (peso seco). En este sentido, el objetivo del cultivo de microalgas no es sólo la elaboración de alimentos, sino también la obtención de compuestos naturales con alto valor biotecnológico en el mercado: ácidos grasos poliinsaturados, carotenoides, ficobiliproteínas, polisacáridos, vitaminas, esteroides, antioxidantes, compuestos reductores de colesterol, etc., (Olaizola, 2003; Derner y col., 2006; Cadoret y Bernard, 2008).

Con fines comerciales, las microalgas se cultivan en sistemas abiertos o en fotobiorreactores cerrados. Los sistemas abiertos presentan problemas de contaminación de cultivos y dificultad de control de las variables de funcionamiento y por estas razones la producción masiva de microalgas se lleva a cabo en fotobiorreactores cerrados que operan en condiciones controladas, con el objetivo de obtener productividades elevadas y una biomasa más uniforme en su composición y ritmo de producción (Imagen 2.1). En los últimos años se han producido avances significativos en el desarrollo y diseño de fotobiorreactores cerrados, consiguiéndose sistemas más baratos, productivos y estables. Hoy en día, debido a la mejora en los diseños con la introducción de nuevos materiales y el abaratamiento de las materias primas, existen en operación reactores cerrados de gran capacidad, con elevadas productividades de hasta $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ (Acién y col., 1998; Pulz, 2001; Verma y col., 2010).

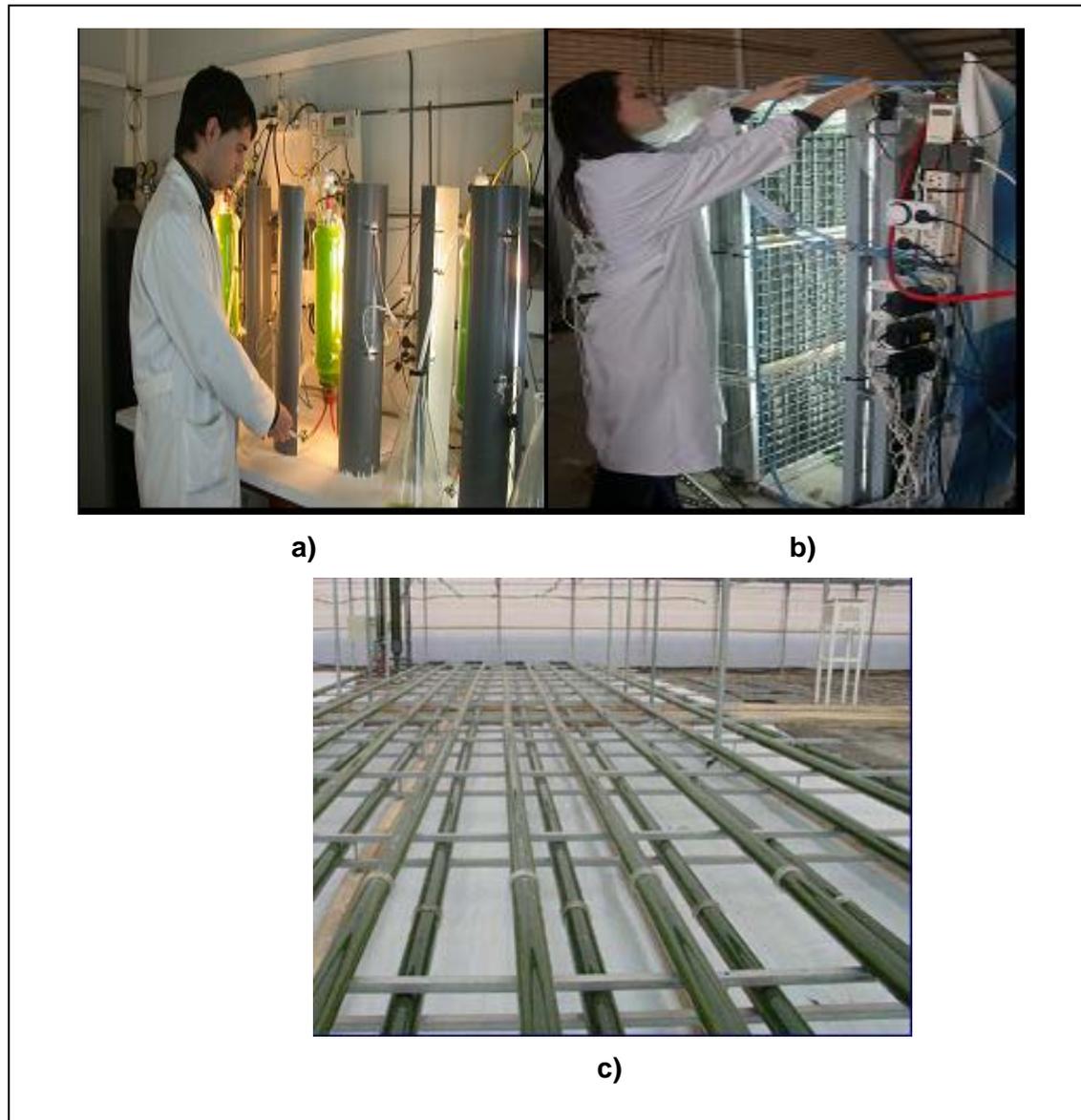


Imagen 2.1

Diferentes fotobiorreactores utilizados para el cultivo de microalgas:

- a) Fotobiorreactor tubular en columna de burbujeo;
- b) Fotobiorreactor vertical plano;
- c) Fotobiorreactor tubular horizontal.

2.1.2.-APLICACIONES.

Durante siglos se han aprovechado limitadamente las ventajas de las poblaciones naturales de microalgas. Sólo recientemente (segunda mitad del siglo XX), se ha intensificado su estudio científico y se ha llegado a desarrollar parcialmente el potencial de la biotecnología microalgal desarrollándose nuevos procesos y obteniéndose una gran variedad de productos novedosos.

Hoy en día una de las principales áreas de investigación en ciencia y tecnología de la alimentación, es la extracción y caracterización de nuevos productos naturales con actividad biológica, por ejemplo antioxidantes, antivirales, antihipertensivos, etc, que pueden contribuir al bienestar de los consumidores como parte de nuevos alimentos funcionales o nutraceuticos. En este sentido, el gran potencial de la biotecnología de microalgas, comprende la producción de una serie enorme de productos entre los que se incluyen alimentos saludables, productos químicos industriales y compuestos con aplicaciones terapéuticas, aunque para la mayoría de esas aplicaciones el mercado está todavía en desarrollo y el uso biotecnológico de microalgas se extenderá probablemente a nuevas áreas (Olaizola, 2003; Mendiola y col., 2008; Raja y col., 2008).

Como ejemplo, cabe destacar a las cianobacterias o algas verdeazuladas, que son organismos procariotas fotosintéticos y se han venido utilizando como alimento para humanos en determinadas regiones del planeta. Así, son reconocidas como fuente de vitaminas y proteínas y como tal se distribuyen como comida saludable en todo el mundo. También es conocido que son fuente de compuestos para química fina, combustibles renovables y compuestos bioactivos que poseen propiedades antivirales, antitumorales, antibacteriales y como aditivos alimentarios (Singh y col., 2005).

Utilización en alimentación.

El primer uso conocido de microalgas data de hace 2000 años en China donde se empleaba la especie *Nostoc* para combatir la hambruna (Spolaore y col., 2006). El alga verdeazulada *Spirulina*, que crece espontáneamente en los lagos Chad (El Chad) y Texcoco (México) entre otros, se recolecta desde tiempo inmemorial para su consumo, después de secada al sol y mezclada con granos de cereales, por los pueblos Kanenbou y Azteca. También existen referencias del consumo humano de algas verde-azuladas fijadoras de nitrógeno (como *Aphanizomenon*) en otros países como Chile, Perú y Filipinas.

Las microalgas poseen excelentes cualidades para ser empleadas en la alimentación animal así como en la humana. La calidad de la biomasa de microalgas viene dada por la ausencia de tejidos y órganos no aprovechables, así como por el bajo contenido en materiales estructurales. Algunas especies no tienen celulosa dura en la pared celular, lo que facilita la digestión y asimilación de las proteínas por el organismo humano y contienen cantidades

favorables de ácidos grasos insaturados, muy poco colesterol y una cantidad moderada de carbohidratos, factores que reducen las afecciones coronarias y la obesidad, objetivos primarios en la sociedad moderna de nuestros días (Durand-Chastel, 1980).

Por otro lado, algunas especies de microalgas poseen un alto contenido en proteínas (pudiendo alcanzar valores de proteína bruta del orden del 50 al 70% del peso seco), carbohidratos y lípidos. Así, poseen porcentajes comparables e incluso superiores a los de otras fuentes tradicionales de proteínas (Tabla 2.3).

Tabla 2.3
Comparación de la composición de alimentos y microalgas (%peso seco)
(Spolaore y col., 2006; Bruton y col., 2009)

Materia	PROTEINAS	CARBOHIDRATOS	LÍPIDOS
Levadura	39	38	1
Carne	43	1	34
Leche	26	38	28
Arroz	8	77	2
Soja	37	30	20
<i>Alga Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Alga Chlamidomonas reinhardii</i>	48	17	21
<i>Alga Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Alga Chlorella pirenoidosa</i>	57	26	2
<i>Alga Eugleria gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Alga tetraselmis maculata</i>	52	15	3
<i>Alga Dunaliella bioculata</i>	49	4	8
<i>Alga Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Alga Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Alga Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Alga Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
<i>Alga Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Alga Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Alga Synechococcus sp.</i>	63	15	11

Las proteínas de microalgas presentan un aminograma bastante equilibrado, similar al de la harina de soja o de pescado, así como al estándar de la F.A.O., siendo únicamente algo deficientes en aminoácidos azufrados (Tabla 2.4). Los estudios de digestibilidad llevados a cabo con distintas especies de microalgas en diversos grupos de animales (peces, moluscos, aves, rumiantes, etc.), han arrojado resultados satisfactorios.

Tabla 2.4

Aminoácidos esenciales del huevo entero, caseína y algunas especies de microalgas.

(Valores en g por 100 g de proteína).

Aminoácidos	Huevo entero (a)	Caseína (a)	<i>Spirulina</i> <i>Máxima</i> (a)	<i>Chlorella</i> <i>Pyrenoidosa</i> (a)	<i>Porphyra</i> <i>Acanthophora</i> (b)	<i>Pterocladia</i> <i>capillacea</i> (b)
Isoleucina	6'6	9'7	5'8	3'4	4'1	3'7
Leucina	8'8	9'7	8'3	6'0	8'1	6'8
Lisina	4'6	2'6	4'5	4'5	6'3	7'9
Metionina	3'1	3'6	1'8	2'0	1'1	1'1
Fenilalanina	5'8	3'9	5'2	7'2	4'7	5'3
Treonina	5'1	3'9	4'6	5'2	5'8	5'2
Triptófano	1'6	2'2	1'1	1'1	--	--
Valina	7'3	7'9	6'6	6'2	6'4	5'5

a)Durán-Chastel, 1980; b) Barbarino y Lourenco, (2005).

Por otra parte, el contenido en vitaminas y minerales se suma al interés alimenticio de las microalgas. Representan una fuente de casi todas las vitaminas esenciales (A, B1, B2, B6, B12, C, E, biotina, ácido fólico y ácido pantoténico (B5)). Además son ricas en pigmentos como la clorofila, carotenoides y ficobiliproteínas (Spolaore y col., 2006). Como ejemplo, la especie *Porphyridium cruentum*, contiene carotenos, vitaminas, hidratos de carbono y elementos tales como Sodio, Potasio, Magnesio, Hierro, Cobre, Zinc, Cromo, Manganeso y Cobalto (Reboloso y col., 2000). La especie *Spirulina platensis* también contiene aminoácidos esenciales, vitaminas, sustancias minerales, ácidos grasos indispensables, polisacáridos, β -caroteno y otros pigmentos (Blinkova y col., 2001).

Actualmente las microalgas para alimentación humana se presentan en el mercado en diferentes formatos comerciales como tabletas, cápsulas y líquidos. También se encuentran incorporadas a pastas, aperitivos, bebidas, golosinas o chicles (Yamaguchi, 1997; Liang y col., 2004).

Aplicaciones Clínicas.

En cuanto a las aplicaciones clínicas de las microalgas, se han realizado multitud de estudios que demuestran sus beneficios terapéuticos. Así, la especie *Spirulina platensis* se usa como nutraceutico alimenticio por sus beneficios terapéuticos en una serie de afecciones tales como enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, hipercolesterol, hiperglucemia, cáncer y enfermedades virales. Los beneficios cardiovasculares de *Spirulina* son el resultado de sus actividades hipolipídicas, antioxidantes y antiinflamatorias (Deng y Chow, 2010). Además, produce efectos inmunoestimulantes aumentando la resistencia de humanos, mamíferos, gallinas y pescado a infecciones, estimulando la producción de anticuerpos y contribuyendo a la preservación de la microflora intestinal (Blinkova y col., 2001).

Por otro lado, porciones sulfolípidicas presentes en los glucolípidos de algunas algas como *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Anabaena* y *Spirulina*, han demostrado ser efectivas contra el virus del Sida (Gustafson, 1989; Blinkova y col., 2001).

Estudios farmacológicos de extractos hidrosolubles de *Chlorella stigmatophora* y *Phaeodactylum tricornutum*, indican que ambas especies muestran actividad antiinflamatoria, analgésica y antirradicales libres (Guzmán y col., 2001). La especie *Arthrospira* aporta varios beneficios a la salud como alivio de la hiperlipidemia, supresión de la hipertensión, protección contra enfermedades renales, promueve el crecimiento del *Lactobacillus* intestinal y suprime los niveles elevados de glucosa en sangre. Otro ejemplo es la especie *Chlorella*, que se muestra eficaz contra la úlcera gástrica, las heridas y el estreñimiento, previene la arteriosclerosis y el colesterol, reduce los lípidos en sangre y tiene acción antitumoral (Yamaguchi, 1997; Liang y col., 2004; Jong-Yuh y Mei-Fen, 2005).

Alimentación animal.

Las microalgas pueden ser utilizadas como alimento para una gran variedad de animales, que van desde peces (acuicultura), hasta mascotas o animales de granja. De hecho, el 30% de la producción mundial de microalgas se vende para alimentación animal (Becker, 2004). Como ejemplo, la especie *Arthrospira* se usa como alimento para muchos tipos de animales como gatos, perros, peces de acuario, pájaros ornamentales, caballos, vacas y crías de toro. Aporta vitaminas naturales, minerales y ácidos grasos esenciales, mejorando la respuesta inmunitaria, la fertilidad y el control de peso, así como la apariencia externa a través de una piel saludable y aspecto lustroso (Certik y Shimizu, 1999).

La acuicultura es una de las áreas de mayor crecimiento en el campo de la producción de alimentos en los últimos años. Ésta va aumentando su producción cada día, tanto en cantidad como en variedad de nuevas especies, siendo una parte cada vez más importante respecto al volumen de capturas en el mar.

En este sentido, la demanda actual de pescado es más grande de la que el océano puede aportar, por lo que las predicciones sugieren que la acuicultura puede ser muy necesaria en un futuro inmediato (Arthur, 2009).

La importancia del cultivo de microalgas en acuicultura estriba en la posición basal que éstas ocupan en la pirámide alimenticia. La capacidad que poseen de convertir sales inorgánicas en compuestos orgánicos con la ayuda de la luz (fotosíntesis), las hace imprescindibles en la producción de alimentos (Tamiya, 1957; Starr, 1971). En este sentido y dado que las microalgas son el punto de inicio biológico del flujo de energía a través de las más importantes cadenas alimenticias acuáticas, puede entenderse el hecho de que la obtención y manipulación de estos microorganismos sea una parte fundamental dentro del diagrama de operaciones acuícolas.

En 1999 la producción de microalgas para acuicultura alcanzó las 1000 toneladas (62% para moluscos, 21% para camarones y el 16% para pescado) para una producción mundial de acuicultura de $43 \cdot 10^6$ toneladas (Muller-Feuga, 2000).

Las microalgas juegan un papel muy importante para el desarrollo de peces, moluscos y crustáceos, al menos durante las fases larvaria y post-larvaria. Su presencia influye también en el contenido de oxígeno y anhídrido carbónico del medio, lo cual afecta de forma directa al crecimiento de la fauna de los ecosistemas acuáticos (Pruder, 1983). Así, existen varias posibilidades para la utilización de microalgas en la alimentación de las larvas de peces, moluscos y crustáceos, así como de los animales adultos. Lo más usual es la aplicación directa de las microalgas a estos consumidores. En este sentido, se utilizan determinadas especies cultivadas para este fin y que resultan imprescindibles en la dieta de muchos moluscos marinos bivalvos (ostras, almejas), larvas de algunos crustáceos y gasterópodos (abalone), larvas de gambas (*Penaeus* y *Metapenaeus*), algunos peces (*Tilapia*, carpas), rotíferos y zoopláncton (Kanazawa y col., 1985; Lavens y col., 1995; Reitan y col., 1997; Knauer y Southgate, 1999).

Aunque para algunos peces y moluscos las algas pueden no ser esenciales, el aporte de las mismas como nutriente aumenta significativamente su supervivencia, debido probablemente a que añaden un factor de crecimiento o producen una acción bactericida en el medio (Cohen y col., 1976; Malecha, 1983). Hoy en día existen más de 40 especies diferentes de microalgas de aplicación práctica en acuicultura, aisladas en diferentes partes del mundo y cuyo tamaño oscila desde unos pocos μm hasta más de 100 μm . Para su uso en acuicultura, las microalgas deben cumplir varios criterios como facilidad de cultivo, forma y tamaño adecuados, altos valores nutricionales y digestibilidad de sus células para facilitar el acceso a los nutrientes (Brown y col., 1999).

Las microalgas son incluso utilizadas en el refinamiento de la acuicultura, como ejemplo se utiliza *Haslea ostrearia* para dar color verdeazulado a las agallas y el apéndice móvil de las ostras (técnica francesa) lo que incrementa el valor del producto en un 40% (Muller-Feuga, 2000).

Fuente de productos químicos naturales.

Otra importante utilidad de las microalgas es la obtención de productos químicos naturales. Las algas de tamaño macroscópico se cosechan por su contenido en polisacáridos, incluido el agar y el ácido algínico, los cuales se extraen comercialmente a gran escala.

Las microalgas han desarrollado diferentes estrategias para su supervivencia en condiciones extremas de forma que mediante simulación de estas condiciones en los sistemas de cultivo, el metabolismo celular puede dirigirse hacia la biosíntesis de las sustancias cuya producción se persigue (Gudin y Thepenier, 1986).

-Obtención de proteínas.

La obtención de proteínas a partir de microalgas fue una de las primeras aplicaciones en desarrollarse dentro de este campo, al igual que se hacía con cultivos de bacterias o levaduras, utilizados desde hace tiempo como fuente de proteína de origen unicelular. Hay que considerar que el contenido en proteínas de las microalgas varía en función de la especie y puede llegar a ser superior al 50% de la biomasa seca.

-Obtención de vitaminas.

Las vitaminas sintetizadas por las microalgas que pueden dar lugar a un aprovechamiento comercial, son principalmente la B₁₂ y la vitamina E (Tocoferol). Sin embargo, son capaces de sintetizar la mayoría de las vitaminas y los contenidos observados en las mismas, son perfectamente comparables a los de otros microorganismos, como levaduras y bacterias.

Numerosas vitaminas hidrosolubles han sido detectadas en el sobrenadante de los cultivos de microalgas, éstas pueden ser excretadas por estos microorganismos de forma activa como resultado de su metabolismo, o bien pueden pasar a formar parte del sobrenadante una vez que la microalga ha muerto y su biomasa se ha desintegrado. En algunas ocasiones, la proporción de vitaminas que son excretadas al medio, puede llegar a ser muy elevada. Por ejemplo, Koptera (1970) señala que la microalga verdeazulada *Anabaena hassali*, excreta hasta el 94% de su contenido en biotina. La microalga *Phaeodactylum tricorutum*, cuenta en su composición bioquímica con determinadas vitaminas, como pueden ser la B₁ y la biotina (ambas segregadas al medio), así como la B₁₂, la cual permanece en el interior celular.

-Obtención de pigmentos.

Como organismos fotosintéticos, las microalgas contienen pigmentos antena que, bajo ciertas condiciones fisiológicas pueden acumularse en la célula, alcanzando notables concentraciones. El principal pigmento son las clorofilas, compuestos esenciales en muchos

productos diarios. Así, se usan como aditivos en productos cosméticos y farmacéuticos, pero también como biocolorantes en alimentación. Tienen propiedades antioxidantes y antimutagénicas (Halim y col., 2010).

Además de las clorofilas, los pigmentos más importantes desde el punto de vista económico son las biliproteínas como ficocianinas y ficoeritrinas, así como una gran variedad de carotenoides, de los que existen unos 400 tipos diferentes. Sin embargo, de éstos sólo se explotan comercialmente unos pocos, entre los que se encuentran: β -caroteno, zeaxantina, astaxantina y luteína. Estos pigmentos tienen aplicación en las industrias farmacológica y alimentaria como colorantes naturales, potenciadores de la pigmentación de aves de corral, en cosmética, como precursores de vitamina A, etc. (Borowitzka, 1988). El organismo más utilizado para la producción de β -caroteno es la especie *Dunaliella salina* con un 14% de su peso seco (Metting, 1996).

La astaxantina es usada como pigmento en la industria del salmón y se extrae principalmente de *Haematococcus pluvialis*, donde puede alcanzar contenidos entre 1'5 y 3% de peso seco (Todd Lorenz y Cysewski, 2000). Aunque por su mayor precio no puede competir con su forma sintética, para ciertas aplicaciones como la alimentación de carpas, pollos y bremas rojos se utiliza la astaxantina procedente de microalgas por las exigencias reguladoras y por la preferencia de los consumidores a los productos naturales (Cysewski y Todd Lorenz, 2004).

-Obtención de polisacáridos.

Otros productos obtenidos de las microalgas, que encuentran gran aplicación en la industria, son los polisacáridos. Las especies comercialmente más prometedoras son las algas rojas unicelulares *Porphyridium cruentum* y *Porphyridium aerugineum*, que bajo determinadas condiciones de crecimiento pueden producir cantidades importantes de polisacáridos extracelulares, constituidos de los siguientes monómeros: D-glucosa, D- y L-galactosa, 3-0-metilxilosa, 3- y 4-0-metilgalactosa y ácido D-glucurónico (Richmond, 1990). Su competencia la encuentran en las macroalgas que sintetizan polisacáridos, principalmente alginatos, carragenatos, agarosa, así como en ciertas bacterias y hongos. La particularidad desde el punto de vista químico de los polisacáridos producidos por *Porphyridium* es que están sulfatados, como los carragenatos, compuestos de xilosa y glucosa así como de galactosa. Son considerados efectivos antiinflamatorios para uso tópico (Matsui y col., 2003).

-Obtención de lípidos.

Los lípidos contenidos en las microalgas son fundamentalmente ésteres de la glicerina y ácidos grasos, con un número de átomos de carbono comprendidos entre 12 y 24. Casi todos los ácidos grasos encontrados en los lípidos de las microalgas, están formados por cadenas moleculares lineales, con un número par de átomos de carbono. Los más interesantes comercialmente son los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), en general, y los ácidos grasos esenciales (EFAs), en particular. Los EFAs para la nutrición humana son los ácidos linoleico, araquidónico, linolénico y eicosapentaenoico. Excepto el linoleico, estos ácidos grasos son poco frecuentes en los animales y plantas superiores, estando presentes en relativamente grandes cantidades en algunas especies de microalgas.

-Obtención de isótopos bioquímicos estables.

Las microalgas son fuente de compuestos marcadores isotópicos estables. La habilidad para llevar a cabo la fotosíntesis les permite incorporar isótopos estables (^{13}C , ^{15}N y ^2H) de moléculas inorgánicas de bajo coste ($^{13}\text{CO}_2$, $^{15}\text{NO}_3$ y $^2\text{H}_2\text{O}$) a compuestos orgánicos de alto valor como aminoácidos, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. Los isótopos estables se usan para dos propósitos: la incorporación dentro de proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos para facilitar su determinación estructural a nivel atómico y para estudios metabólicos a través del incremento de masa de los compuestos etiquetados (Apt y Behrens, 1999; Acién y col., 2003).

Obtención de biocombustibles.

Las algas, particularmente las microalgas unicelulares verdes se vienen proponiendo desde hace tiempo como potenciales fuentes de biofuel (Oswald y Golueke, 1960; Benemann y col., 1977).

En la actualidad existen numerosos proyectos de investigación que utilizan los cultivos de microalgas para la producción de biocombustibles. Así, mediante este tipo de cultivos se obtiene biodiesel, bioetanol, biohidrógeno y biogás (Chisti, 2007; Seefeldt, 2007; Li y col., 2008).

Según las predicciones tecnológicas, la tercera generación de biocombustibles derivará de las microalgas, ya que no presentan las desventajas de los de primera y segunda generación

como necesidad de gran superficie de cultivo y de agua (Costa y de Morais, 2011). Así, numerosos estudios argumentan que la producción de biofuel a partir de microalgas, particularmente la producción de biodiesel, es económica y medioambientalmente sostenible (Huntley y Redalje, 2007; Chisti, 2008; Brune y col., 2009; Stephens y col., 2010) aunque también existen algunos puntos de vista escépticos sobre su viabilidad (Reijnders, 2008; Walker, 2009; Van Beilen, 2010).

Este tipo de investigaciones han cobrado mucha importancia, ya que además de producir biocombustibles, suelen llevar como objetivo paralelo y complementario, la reducción de problemas ambientales. Así, uno de los problemas ambientales actuales es el progresivo avance y acumulación en la atmósfera de los gases de efecto invernadero, de los cuales el más importante es el CO₂. En este sentido, se están desarrollando los cultivos de microalgas y utilizando el CO₂ procedente de las líneas efluentes industriales, como línea de gas nutriente (Chang y Yang, 2003; González y col., 2009; Stephen y col., 2010).

Otra aplicación cada vez más utilizada es la eliminación de compuestos químicos contaminantes en aguas residuales mediante el cultivo en las mismas de microalgas, las cuales a través de su metabolismo pueden eliminar distintos elementos como nitrógeno y fósforo (Hoffmann, 1998; Mallick, 2002; Aslan y Kapdan, 2006; Hernández y col., 2006; Hameed, 2007; de-Bashan y Bashan, 2010; Pittman y col., 2011).

Uso en cosméticos.

Algunas especies de microalgas son utilizadas en la formulación de productos para el cuidado de la piel, como cremas antiedad, productos refrescantes, antirritantes y regenerantes de la piel y en emolientes. Entre ellas destacan *Arthrospira* y *Chlorella* (Stolz y Obermayer, 2005). También se encuentran en productos para el cuidado del cabello y protectores solares. Ciertas empresas cosméticas han invertido en su propio sistema de producción de microalgas (Spolaore y col., 2006).

2.2.-BILIPROTEINAS.

2.2.1.-GENERALIDADES.

Las biliproteínas son una familia de proteínas homólogas solubles en agua, que están compuestas por subunidades del tipo α y β que conjuntamente forman monómeros. Dichos monómeros se ensamblan pudiendo formar agregados tales como trímeros o hexámeros. El estado de agregación de la biliproteína depende de la fuerza iónica, del pH (Scott y Berns, 1965; MacColl y col.,1971), de la temperatura (Scott y Berns, 1965), de la presencia de agentes desnaturizantes (Berns y Scott, 1966; Berns y Morgenstern, 1968) y de la composición del tampón y concentración de la proteína (Saxena,1988).

Estas macromoléculas se caracterizan por poseer grupos prostéticos tetrapirrólicos de cadena abierta llamados bilinas, enlazados covalentemente a los residuos de cisteína a través de enlaces tioéter. Dicho nombre se debe a que su estructura cerrada es muy similar a la de los conocidos pigmentos biliares humanos bilirrubina y biliverdina (Lemberg y Legge, 1949).

Los cromóforos les confieren altos coeficientes de extinción en una zona amplia del espectro electromagnético, lo que unido a su alto rendimiento cuántico proporciona excelentes propiedades fluorescentes. Las propiedades espectroscópicas de las biliproteínas dependen de la estructura y del número de bilinas que contienen, del ambiente proteico que rodea a estos cromóforos y de las relaciones estéricas entre ellos (Scheer, 1981; Glazer, 1984). Existen cuatro bilinas isoméricas que son: ficocianobilina (PCB), ficoeritobilina (PEB), ficourobilina (PUB) y ficobiliviolina (PXB).

En función de sus características espectroscópicas, las biliproteínas se clasifican en tres grupos:

-Ficocianinas: son biliproteínas azules cuyo cromóforo es la ficocianobilina (PCB). Poseen un cromóforo en la subunidad α y dos en la subunidad β . La R-ficocianina es una ficocianina especial que además de PCB posee PEB.

-Aloficocianinas: son biliproteínas azules cuyo cromóforo es la ficocianobilina (PCB). Poseen un PCB en la subunidad α y otro en la subunidad β .

-Ficoeritrinas: son biliproteínas rojas cuyos cromóforos son la ficoeritobilina (PEB) y la ficourobilina (PUB). Poseen dos o tres bilinas en la subunidad α y tres en la subunidad β .

Solo unas pocas especies de cianobacterias poseen un cuarto grupo de biliproteínas denominadas ficoeritrocianinas cuyos cromóforos son PCB y ficobiliviolina (PXB). La Tabla 2.5 muestra los máximos de absorción y de emisión de las biliproteínas.

Tabla 2.5
Máximos de absorción y de emisión de biliproteínas.

Biliproteína	Absorción $\lambda_{\max}(\text{nm})$	Emisión $\lambda_{\max}(\text{nm})$
C-ficocianina (C-PC)	615-620	630-642
Aloficocianina (APC)	650 (hombro a 620)	660
R-ficocianina (R-PC)	618, 555	642
B-ficoeritrina (BPE)	498, 543, 562	576
C-ficoeritrina (CPE)	565	575-581
R-ficoeritrina (RPE)	495, 536, 564	576

Las biliproteínas se encuentran en las cianobacterias (comúnmente llamadas algas verde-azuladas) (Stanier y col., 1971; Rippka y col., 1979), en los cloroplastos de las rodofitas (algas rojas) (Glazer y col., 1982; Honsell y col., 1984; Mörschel y Rhiel, 1987) y en especies pertenecientes a las algas criptomonadales (criptofíceas), una clase de algas eucariotas unicelulares y biflageladas (Allen y col., 1959; Haxo y Fork, 1959; Gantt, 1979; Glazer y Wedemayer, 1995; Wedemayer y col., 1996). En todos estos organismos, la función de las biliproteínas es la de actuar como accesorio fotosintético. Absorben luz en un amplio rango de longitud de onda del espectro visible y transfieren la energía de excitación mediante procesos no radiativos hacia los centros de reacción localizados en las membranas fotosintéticas donde es convertida en energía química (Gantt, 1979; 1980; Glazer, 1976; 1981; 1984; 1985; 1986; 1989).

Las cianobacterias son un grupo muy diverso de organismos procariotas (Rippka y col., 1979; Rippka, 1988). Crecen en una gran variedad de hábitats: áridos desiertos, lagos de aguas frías, en salinas, en las frías aguas del Antártico, en el océano abierto, en tierra y en superficies rocosas. La mayoría de las especies de cianobacterias son fototrópicas, están limitadas a ambientes iluminados, aunque en algunos de sus hábitats, tales como cavernas, los niveles de luz son muy bajos (Fogg y col., 1973). El cultivo de muchas cianobacterias es posible debido a la disponibilidad de fuentes tales como la colección Pasteur de cianobacterias (PCC; Institut Pasteur, Paris), la colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Rockville, Maryland), o la colección de cultivo de Algas de la Universidad de Texas (UTEX). Las cianobacterias pueden crecer fácilmente en cultivos masivos hasta densidades de bastantes gramos por litro (peso húmedo), siempre que se suministre por agitación (o circulación) en el cultivo la adecuada iluminación y el apropiado aporte de dióxido de carbono. Las mayores cantidades de biliproteínas se encuentran en organismos cultivados con luz blanca de baja intensidad (Myers y Kratz, 1955).

Las algas rojas son un grupo extremadamente diverso con más de 400 géneros y 4000 especies. Morfológicamente conforman un amplio grupo, desde organismos unicelulares hasta plantas superiores. Son predominantemente organismos marinos y se encuentran tanto en aguas tropicales como en aguas frías (Cole y Sneath, 1990). Las algas rojas unicelulares tales como *Porphyridium cruentum* (Lee y Bazin, 1990; Dermoun y col., 1992; Chaumont, 1993) o *Rhodella reticulata* (Mihova y col., 1996), pueden crecer fácilmente como cultivos puros, en grandes cantidades, en el laboratorio. Algunas algas rojas multicelulares pueden también mantenerse en cultivo puro en el laboratorio, pero en general crecen muy despacio y su destino es la utilización en trabajos bioquímicos.

Las algas criptomonadales se encuentran tanto en aguas marinas como en aguas frías continentales (Gantt, 1979). Muchas especies están disponibles en cultivos puros y pueden desarrollarse fácilmente en gran escala.

Las biliproteínas dentro de las células de cianobacterias y de los cloroplastos de algas rojas, forman agregados moleculares llamados ficobilisomas, de forma esférica y aproximadamente 600 nm de diámetro y de masa en torno a los 2500KDa. Se encuentran unidos a la cara externa de la membrana tilacoidal y actúan como pigmentos antena que absorben la luz y canalizan la energía de excitación. Consisten en dos subestructuras

morfológicas distintas, un núcleo central formado por tres cilindros constituidos cada uno por cuatro discos apilados (Bryant y col., 1979; Yamanaka y col., 1980) y seis varillas radiales que parten del núcleo central, cada una de las cuales está compuesta por varios discos apilados. Están constituidos exclusivamente de biliproteínas y polipéptidos enlazantes. Las biliproteínas constituyen el 85% de la masa del ficobilisoma y se organizan en orden a su máxima absorción: ficoeritrinas en la periferia, ficocianinas en el centro y aloficocianinas muy cerca de los centros de reacción en la membrana tilacoidal (Gantt, 1980). La ruta de transferencia de la energía dentro de la célula es:

Ficoeritrina → Ficocianina → Aloficocianina → Clorofila

En los ficobilisomas intactos, las biliproteínas no fluorescen ya que su energía de excitación es transferida con gran eficacia al centro de reacción. Sin embargo las biliproteínas fluorescen con intensidad en ausencia del captador de energía.

El valor como reactivo de una determinada biliproteína, ya sea como marcador fluorescente en análisis celular, en inmunoensayo o en histoquímica depende, ante todo, de: (a) composición de las subunidades; (b) composición y contenido de bilinas; (c) estado de oligomerización; (d) monodispersidad del oligómero; (e) espectro de absorción en el visible y coeficientes de extinción en los máximos y (f) rendimiento cuántico de fluorescencia.

2.2.2.-COMPOSICIÓN EN SUBUNIDADES.

Las biliproteínas procedentes de cianobacterias y de rodofitas se pueden dividir en tres clases según su secuencia de aminoácidos y sus principales máximos de absorción: ficoeritrinas ($\lambda_{\max} \approx 550-565\text{nm}$), ficocianinas ($\lambda_{\max} \approx 610-625\text{nm}$) y aloficocianinas ($\lambda_{\max} \approx 650\text{nm}$) (Glazer, 1981; 1985). A simple vista, las ficoeritrinas son rojas, las ficocianinas varían de púrpura (ficoeritrocianina, R-ficocianina) a azul intenso (C-ficocianina) y las aloficocianinas son azules con un matiz verdoso. Para cada uno de estos distintos tipos de proteínas, la unidad estructural es un heterodímero $\alpha\beta$. El peso molecular de las subunidades α y β oscila entre 18000 y 22000 Da. El heterodímero es una unidad muy estable que resiste la disociación, a concentraciones proteicas de hasta 10^{-12} M o en presencia de agentes caotrópicos (MacColl y col., 1981), como por ejemplo el tiocianato de amonio.

La composición en subunidades de biliproteínas procedentes de algas criptomonadales es $\alpha\alpha'\beta_2$ donde las subunidades α tienen una masa molecular de aproximadamente 8000-9000 Da y las subunidades β aproximadamente de 20000 Da y por tanto el tetrámero $\alpha\alpha'\beta_2$ posee una masa molecular de entre 50000 y 60000 Da. Al igual que la unidad estructural del heterodímero de cianobacterias y algas rojas ($\alpha\beta$), el tetrámero $\alpha\alpha'\beta_2$ es muy estable (Mörschel y Wehrmeyer, 1975; 1977; Sidler y col., 1985; 1990).

En la Tabla 2.6 se muestran valores de peso molecular de las subunidades de distintas biliproteínas. La causa de la diferencia entre los valores aportados por los distintos autores puede ser la posible acción proteolítica durante los diferentes procesos de extracción y purificación o bien las diferentes técnicas utilizadas para el cálculo de sus pesos moleculares (electroforesis SDS-PAGE, sedimentación, cromatografía de exclusión molecular, propiedades coligativas, etc.), así como su diferente procedencia.

Tabla 2.6

Peso molecular de subunidades de biliproteínas procedentes de diferentes organismos.

Biliproteína	PM (Subunidad α) (Da)	PM (Subunidad β) (Da)
C-ficocianina	16300	17600 ^a
	15900	19000 ^b
	16600	20200 ^b
	18500	20500 ^c
	19300	21600 ^d
	17700	19000 ^e
	17000	21500 ^f
	17500	22000 ^g
	19000	21500 ^l
C-ficoeritrina	18700	20000 ^a
	20000	22000 ^b
	19000	23000 ^c
Aloficocianina	15200	16000 ^a
	15200	17500 ^b
	18600	19700 ^f
	17000	18000 ^g
	16000	17000 ^h
	16200	17400 ⁱ
	17700	19600 ^l
B-ficoeritrina	17500	17500 ^j
	18000	20000 ^k
	16500	18000 ^m

^a Bennett y Bogorad (1971).^b Glazer y Cohen-Bazire (1971).^c O'Carra (1970); O'Carra y Kilillea (1971).^d Hilditch y col., (1991).^e Glazer y Fangs (1973).^f Algarra y col., (1990)^g Wolfgang y Werner (1988)^h Rusckowski y Zilinskas (1982)ⁱ Cohen-Bazire y col., (1977).^j Glazer y Hixson (1977).^k Sidler y col., (1989).^l Bermejo y col., (1997).^m Bermejo y col., (2001).

2.2.3.-SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS.

Las secuencias de aminoácidos de muchas biliproteínas han sido determinadas. A continuación, se muestran las secuencias de aminoácidos de las subunidades α y β de C-ficocianina, aloficocianina, R-ficocianina y B-ficoeritrina (Uniprot KB).

2.2.3.1.-Secuencia de aminoácidos de las subunidades de C-ficocianina procedente de *Spirulina platensis*.

Subunidad α :

10	20	30	40	50
MKTPLTEAVS IADSQGRFLS STEIQVAFGR FRQAKAGLEA AKALTSKADS				
60	70	80	90	100
LISGAAQAVY NKFPYTTQM GPNYAADQRG KDKCARDIGY YLRMVTYCLI				
110	120	130	140	150
AGGTGPMDEY LIAGIDEINR TFELSPSWYI EALKYIKANH GLSGDAATEA				
160				
NSYLDYAINA LS				

Subunidad β :

10	20	30	40	50
MFDAFTKVVS QADTRGEMLS TAQIDALSQM VAESNKRLDA VNRITSNAST				
60	70	80	90	100
IVSNAARSLF AEQPQLIAPG GNAYTSRRMA ACLRDMEIIL RYVTYAVFAG				
110	120	130	140	150
DASVLEDRCL NGLRETYLAL GTPGSSVAVG VGKMKEAALA IVNDPAGITP				
160	170			
GDICALASEI ASYFDRACAA VS				

2.2.3.2.-Secuencia de aminoácidos de las subunidades de aloficocianina procedente de *Spirulina platensis*.

Subunidad α :

```

      10           20           30           40           50
MSIVTKSIVN ADAEARYLSP GELDRIKSFV TSGERRVRIA ETMTGARERI
      60           70           80           90          100
IKEAGNQLFQ KRPDVVSPGG NAYGEEMTAT CLRDLDYCLR LITYGIVAGD
     110          120          130          140          150
VTPIEEIGVV GVREMYKSLG TPIEAVAEGV RAMKSVATSL LSGEDAAEAG
      160
AYFDYLIGAM S

```

Subunidad β :

```

      10           20           30           40           50
MQDAITSVIN SSDVQGKYLD RSAIQKCLKAY FATGELRVRA ATTISANAAN
      60           70           80           90          100
IVKEAVAKSL LYSDITRPGG NMYTTRRYAA CIRDLDYCLR YATYAMLAGD
     110          120          130          140          150
PSILDERVLN GLKETYNLSG VPIGATVQAI QAMKEVTAGL VGADAGKEMG
      160
IYFDYICSGL S

```

2.2.3.3.-Secuencia de aminoácidos de las subunidades de R-ficocianina procedente de *Porphyridium cruentum*.

Subunidad α :

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>
MKTPITEAIA TADNQGRFLS NTELQAVNGR YQRATASLTA AKALTGSAQR				
<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>
LITGAAQAVY NKFPYTTQMP GPAYASSAIG KAKCARDIGY YLRMVTYTLV				
<u>110</u>	<u>120</u>	<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>
VGGTGPMDEY LVAGLEEINR SFDLSPSWYI EALQYIKNSH GLSGQVANEAA				
<u>160</u>				
NAYIDYAIN T SL				

Subunidad β :

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>
MLDAFAKVVVA QADARGEFLS NTQIDALSKM VKEGNQRLDI VNKVTSNASAA				
<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>
IVTNSARALF AEQPQLIQPG GNAYTSRNMA ACLRDMEIVL RYVSYAMLAG				
<u>110</u>	<u>120</u>	<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>
DSSVLDDRCL NGLRETYQAL GTPGSSVAVA IQKMKDASVA LANDTTGTPI				
<u>160</u>	<u>170</u>			
GDCSSLVAEL AGYFDRAAVS VV				

2.2.3.4.-Secuencia de aminoácidos de las subunidades de B-ficoeritrina procedente de *Porphyridium cruentum*.

Subunidad α :

```

      10           20           30           40           50
MKSVITTVVS AADAAGRFPS NSDLESIQGN IQRSAARLEA AEKLAGNHEA
      60           70           80           90           100
VVKEAGDACF AKYAYLKNPG EAGENQEKIN KCYRDVDHYM RLVNYDLVVG
      110          120          130          140          150
GTGPLDEWGI AGAREVYRTL NLPTSAYVAS IAYTRDRLCV PRDMSAQAGV
      160
EFSAYLDYLI NALS

```

Subunidad β :

```

      10           20           30           40           50
MLDAFSRVVV NSDAKAAYVG GSDLQALKSF IADGNKRLDA VNSIVSNASC
      60           70           80           90           100
MVSDAVSGMI CENPGLISPG GNCYTNRRMA ACLRDGEIIL RYVSYALLAG
      110          120          130          140          150
DASVLEDRCL NGLKETYIAL GVPTNSSIRA VSIMKAQAVA FITNTATERK
      160          170
MSFAAGDCTS LASEVASYFD RVGAAIS

```

2.2.4.-CONTENIDO Y COMPOSICIÓN EN BILINAS.

En cianobacterias y rodofitas existen cuatro bilinas isoméricas: ficourobilina (PUB), ficobiliviolina (PXB), ficoeritrobilina (PEB) y ficocianobilina (PCB) que se encuentran unidas a las cadenas peptídicas de las apoproteínas (Glazer, 1985; Ong y Glazer, 1991). Estas bilinas están unidas al polipéptido a través de enlaces tioéter con los residuos de cisteína. La Figura 2.1 muestra un ejemplo de las uniones entre bilinas y polipéptidos. En las biliproteínas nativas, PUB presenta un máximo de absorción a ≈ 495 nm, PEB a 540-565 nm, PXB a 568 nm y PCB a 590-625 nm.

Las secuencias de muchas biliproteínas han sido determinadas bien por el análisis de la secuencia de aminoácidos o bien determinando las secuencias de ADN de los genes que codifican estas proteínas (Wilbanks y Glazer, 1993a, b; Sidler, 1994). Muchos estudios han establecido las localizaciones para los residuos de cisteína que sirven como lugares de adhesión a la bilina y la identidad de la bilina en cada uno de esos lugares (Tabla 2.7). Las aloficocianinas portan una bilina en cada subunidad α y β ; las ficocianinas una bilina en la subunidad α y dos bilinas en la subunidad β y las ficoeritrinas tienen dos o tres bilinas en la subunidad α y tres bilinas en la subunidad β .

Tabla 2.7

Tipos de bilinas y lugares de unión en algunas ficocianinas y ficoeritrinas.

La nomenclatura indica el número de residuo de aminoácido al que se une la bilina y la subunidad donde se encuentra.

	α -84 (α -1)		β -82 (β -1)	β -155 (β -2)	
Ficocianinas					
C-ficocianina	PCB		PCB	PCB	
R-ficocianina	PCB		PCB	PEB	
	α -83 (α -1)	α -140 (α -2)	β -50,61 (β -3)	β -82 (β -1)	β -159 (β -2)
Ficoeritrinas					
C-ficoeritrina	PEB	PEB	PEB	PEB	PEB
B-ficoeritrina	PEB	PEB	PEB	PEB	PEB
R-ficoeritrina	PEB	PEB	PUB	PEB	PEB

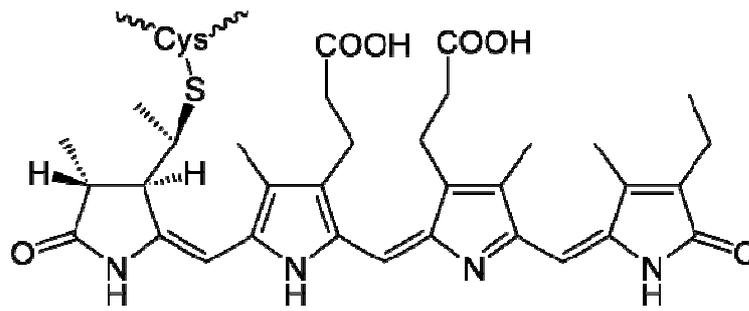


Figura 2.1

Ejemplo de enlace bilina-péptido en biliproteínas.

Ficocianobilina enlazada a través del anillo A.

Por otro lado, seis bilinas diferentes pueden encontrarse enlazadas en biliproteínas procedentes de algas criptomonadales. Estas son PEB, PCB, dihidrobiliverdina (DBV), bilina 584, bilina 618 y bilina 684. Debido a la gran diversidad de bilinas, las biliproteínas procedentes de algas criptomonadales tienen complejos espectros de absorción (Glazer y Wedemayer, 1995; Wedemayer y col., 1996).

2.2.5.-ESTADOS DE AGREGACIÓN.

Las biliproteínas son componentes de grandes estructuras denominadas ficobilisomas los cuales están unidos a la superficie citoplasmática de las lamelas fotosintéticas. Los ficobilisomas se componen de biliproteínas triméricas con forma de disco, $(\alpha\beta)_3$ y hexaméricas, $(\alpha\beta)_6$ que se forman por una interacción *cara a cara* de los trímeros, los cuales tienen aproximadamente 12 nm de diámetro y 3 nm de grosor. En los ficobilisomas, la unión de los trímeros y los hexámeros se realiza mediante los denominados polipéptidos enlazantes, los cuales también se encargan de dar estabilidad a la estructura (Gantt, 1980; Glazer, 1985; 1988 a; 1989; Wilbanks y Glazer, 1993 b).

La estabilidad de los trímeros y de los hexámeros varía notablemente según el organismo en que se encuentre la biliproteína, aunque son menos estables que los heterodímeros $(\alpha\beta)$. Cuando las biliproteínas se liberan debido a una ruptura celular y se someten a los procedimientos convencionales para purificación de proteínas, los polipéptidos enlazantes se liberan en la mayor parte de los casos y el estado de agregación depende ante todo de las condiciones de purificación (Glazer, 1988 b). Tan sólo algunas ficoeritrinas de

cianobacterias unicelulares marinas y algas rojas, sobreviven a la purificación como estructuras de doble disco monodispersas tipo $(\alpha\beta)_6\gamma$ de aproximadamente 250.000 Da donde γ es un polipéptido enlazante (Glazer y Hixson, 1977; Yu y col., 1981).

Las biliproteínas simples son por tanto artefactos de la purificación, los oligómeros que se quedan aislados comparten muchas características estructurales con porciones de ficobilisomas de los que proceden. Sin embargo, en general carecen de las interacciones con los polipéptidos enlazantes y con las estructuras de biliproteínas vecinas más cercanas que tienen características de un ficobilisoma intacto.

Si un oligómero se usa como marcador fluorescente, es muy importante considerar que esté monodisperso a bajas concentraciones proteicas (Glazer, 1984; 1985). Esta condición se conoce para B y R ficoeritrinas, donde la estructura $(\alpha\beta)_6$ no se disocia incluso hasta 10^{-12} M. Mientras algunas ficocianinas forman trímeros o hexámeros a concentraciones que oscilan entre 10^{-5} - 10^{-6} M, a menores concentraciones se disocian, en función de la concentración, al heterodímero $(\alpha\beta)$ (Neufeld y Riggs, 1969; MacColl y col., 1971; Glazer y Fangs, 1973). El monómero con solo tres bilinas es mucho menos efectivo como marcador fluorescente que el hexámero con 18 bilinas.

La disociación de las aloficocianinas a monómeros presenta algunos problemas (Ong y Glazer, 1985). Cerca del pH neutro y a una concentración igual o superior a 10^{-5} M las aloficocianinas están formando trímeros $(\alpha\beta)_3$ con λ_{\max} de absorción a 650 nm y máximo de fluorescencia a 660 nm. Sin embargo, en disoluciones a baja concentración, las aloficocianinas se disocian en el heterodímero $(\alpha\beta)$, el cual tiene una tercera parte de absortividad molar, un desplazamiento en la λ_{\max} de absorción a 615 nm y una caída en el rendimiento cuántico de fluorescencia (Ong y Glazer 1985; Yeh y col., 1986). Afortunadamente el trímero se puede estabilizar por la unión a un punto específico, con el 1-etil-3-(3dimetilaminopropil)-carbodiámidato (Ong y Glazer, 1985) y las propiedades espectroscópicas de estos trímeros enlazados son virtualmente iguales que las de los no modificados. Sin embargo, presentan algunas diferencias como que el trímero no modificado es completamente estable a una dilución inferior a 10^{-12} M, a la presencia de sales caotrópicas o que el trímero enlazado muestra una termoestabilidad más elevada que su clon sin modificar

(Yeh y col., 1987). Debido a la utilidad de estos trímeros modificados, las aloficocianinas tienen un amplio uso como marcadores fluorescentes en la zona del rojo-cercano.

Es importante destacar que no puede darse por supuesto que la misma biliproteína aislada de diferentes organismos vaya a tener el mismo estado de agregación o estabilidad oligomérica.

2.2.6.-PROPIEDADES RELEVANTES PARA SUS DISTINTAS APLICACIONES.

Las biliproteínas se usan ampliamente en diversas técnicas como son la clasificación celular activada por fluorescencia o el análisis de poblaciones celulares mediante citometría de flujo (Oi y col., 1982; Glazer y Stryer, 1984; 1990; Glazer, 1994). Asimismo, los conjugados de biliproteínas se emplean de forma rutinaria en gran cantidad de análisis de tipo clínico. Anualmente cientos de trabajos de investigación utilizan estas proteínas como reactivos. Desde su introducción en 1982, las aplicaciones de las biliproteínas como etiquetas fluorescentes están en continua expansión.

2.2.6.1.-Propiedades espectroscópicas.

Propiedades absorciométricas.

En la Tabla 2.8 se muestran los valores de la longitud de onda de máxima absorción de las biliproteínas más comunes. La presencia de numerosas bilinas hace que sus coeficientes de extinción sean bastante superiores a los de otros colorantes en la región visible del espectro electromagnético.

Tabla 2.8

Propiedades espectroscópicas de las biliproteínas más representativas (Glazer, 1999).

Proteína (Composición en subunidades)	Peso Molecular (Da)	λ_{\max} Absorción	ϵ_M ($M^{-1}cm^{-1}$)	λ_{\max} Fluorescencia	Φ_F^*
Aloficocianina ($\alpha\beta$) ₃	100000	650	696.000	660	0'68
C-ficocianina ($\alpha\beta$) _{n=1-6}	36700 ($\alpha\beta$)	620	281.000	642	0'51
B-ficoeritrina ($\alpha\beta$) _{6\gamma}	240000	545	2.410.000	575	0'98
R-ficoeritrina ($\alpha\beta$) _{6\gamma}	240000	565	1.960.000	578	0'82
R-ficocianina ($\alpha\beta$) ₃	140000	550	240.000	636	---

* Φ_F : rendimiento cuántico de fluorescencia. ϵ_M : Coeficiente de extinción molar.

Se han publicado estudios estructurales de alta resolución utilizando cristales de numerosas biliproteínas: **aloficocianina** (Brejc y col., 1995; Liu y col., 1999; Murray y col., 2007; McGregor y col., 2008), **C-ficocianina** (Duerring y col., 1991; Adir y col., 2001; Padyana y col., 2001; Nield y col., 2003; Contreras-Martel y col., 2007; David y col., 2010), **R-ficocianina** (Jiang y col., 2001), **ficoeritrocianina** (Duerring y col., 1990) y **B-ficoeritrina** (Ficner y col., 1992; Ficner y Huber, 1993). En todos ellos, en las biliproteínas en estado nativo, las bilinas se encuentran en forma de configuraciones extendidas y por ello exhiben una alta absorbancia en el máximo de absorción del visible (Scheer y Kufer, 1977). Cuando las biliproteínas se desnaturalizan por la acción de agentes como la urea, el dodecilsulfato sódico o pH extremos, las bilinas se liberan de su constricción tridimensional, asumiendo conformaciones en forma de ciclohélices y ésto produce una importante disminución de la

absorbancia y la pérdida completa de la emisión de fluorescencia (Scheer y Kufer, 1977; Glazer, 1984; 1986).

Propiedades espectrofluorimétricas.

Los grupos prostéticos (bilinas) en las biliproteínas están rígidamente unidos y ampliamente protegidos del disolvente. La excitación de las biliproteínas produce la desactivación mediante emisión de fluorescencia con altos rendimientos cuánticos (Tabla 2.8). La pérdida de radiación debida al movimiento o a la colisión con moléculas desactivadoras (“quenchers”) es mínima. En contraste, cuando las bilinas se encuentran libres o formando parte de biliproteínas desnaturalizadas, no son fluorescentes.

El gran número de bilinas que poseen las biliproteínas y sus características de unión hace que estas macromoléculas posean rendimientos cuánticos de fluorescencia que son superiores a los de los mejores fluoróforos orgánicos disponibles (Haugland, 1996). El rendimiento cuántico de las biliproteínas es alto y suele estar comprendido entre 0’3 y 0’9 (Grabowski y Gantt, 1978). Las bilinas están localizadas en el interior de la estructura proteica (Duerring y col., 1990; 1991; Ficner y col., 1992; Ficner y Huber, 1993; Brejc y col., 1995) y por ésto cuando las biliproteínas se encuentran en estado nativo, su fluorescencia no es desactivada por otras moléculas presentes en la disolución, no se ve afectada por el pH de forma considerable en un amplio rango y además no varía marcadamente con la temperatura (Yeh y col., 1987).

B-ficoeritrina posee un rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_f) de 0’98 superior incluso al de la fluoresceína que es el fluoróforo más ampliamente usado y tiene un Φ_f de 0’93 a pH 9 (Haugland, 1996). El trímero de aloficocianina ($\alpha\beta$)₃ posee un rendimiento cuántico de 0’68 (Grabowski y Gantt, 1978) mientras que fluoróforos como el Cy5.18 y Cy5.205 poseen valores de 0’27 y 0’23 y longitudes de onda máximas de emisión de ($\lambda_{\max F}$) de 667 y 704 nm respectivamente (Mujumdar y col., 1996).

Otro parámetro muy importante para evaluar el valor de un fluoróforo como etiqueta fluorescente es la fotoestabilidad. En este sentido las biliproteínas muestran una excelente fotoestabilidad y como ejemplo White y Stryer (1987) reportaron que el rendimiento cuántico de fotodestrucción (Φ_D) a 514’5 nm para R-ficoeritrina procedente de *Gastrodonium coulterii*

y C- y aloficocianina de *Anabaena variabilis* era de $1'1 \cdot 10^{-5}$, $2'5 \cdot 10^{-6}$ y $4'5 \cdot 10^{-6}$ respectivamente. Estos rendimientos cuánticos son similares a los de fluoresceína ($\Phi_D=2'7 \cdot 10^{-5}$, Mathies y Stryer, 1986) y rodamina ($\Phi_D=5'6 \cdot 10^{-6} - 5'5 \cdot 10^{-5}$, Soper y col., 1993) en disolución acuosa. Análogamente Lao y Glazer (1996) informaron que el rendimiento cuántico para C-ficocianina, por fotones visibles está entorno a $1'6-2'7 \cdot 10^{-7}$ bajo diferentes condiciones experimentales.

Desplazamiento de Stokes.

Cuando se excita una disolución de un fluoróforo, el espectro de emisión es exactamente el mismo independientemente de la longitud de onda de excitación elegida. La emisión de fluorescencia se produce a mayor longitud de onda que el espectro de absorbancia y este desplazamiento hacia el rojo de la banda de emisión se puede explicar como sigue: cuando un fotón ($h\nu_{\text{exci}}$) de energía es absorbido por el fluoróforo que se encuentra en el estado fundamental (S_0) el fluoróforo se promociona a un estado excitado electrónico (S'_1) que decae rápidamente (10^{-12} s) al nivel excitado singlete inferior S_1 . Esta pérdida energética es muy rápida comparada con el tiempo de vida del estado excitado (10^{-9} s). La transición S_1 hasta S_0 esta acompañada en el caso de moléculas fluorescentes por la emisión de un fotón energético $h\nu_{\text{em}}$. La diferencia energética o en longitud de onda representada por $\Delta E=h\nu_{\text{exci}} - h\nu_{\text{em}}$ se denomina desplazamiento de Stokes y mediante él se puede distinguir entre fotones emitidos y fotones absorbidos. A mayor desplazamiento de Stokes, mayor sensibilidad en la detección del fluoróforo. Con grandes desplazamientos, los fotones de emisión están bien separados de los de excitación evitando fenómenos indeseables tales como Scattering, dispersión Rayleigh y la fluorescencia de fondo de materiales como plásticos o porfirinas y flavinas que se encuentran comúnmente como contaminantes en muestras biológicas. Un ejemplo de sistemas que poseen grandes desplazamientos de Stokes, son aquellos que utilizan las biliproteínas como etiquetas fluorescentes.

Las múltiples bilinas que porta una biliproteína en particular son espectroscópicamente distinguibles y generan amplias bandas de absorción en el visible. En otras palabras, en el interior de las biliproteínas multiméricas, los niveles energéticos de las bilinas no son equivalentes y en consecuencia mientras todas las bilinas en una biliproteína absorben energía de excitación, la fluorescencia de la proteína es originada por las bilinas que poseen las bandas de absorción a mayor longitud de onda. Las bilinas que absorben radiación energética

y la transfieren a otras bilinas se denominan dadoras, mientras que las que absorben energía de excitación y fluorescen se denominan aceptoras. La transferencia energética intramolecular en biliproteínas en estado hexamérico y trimérico es muy rápida y en consecuencia la emisión de fluorescencia en estado estacionario es originada casi exclusivamente por los aceptores (Glazer, 1989; Ong y Glazer, 1991). Las amplias bandas de absorción y la alta eficiencia de transferencia energética intramolecular, permiten elegir longitudes de onda de excitación que provocan grandes desplazamientos de Stokes. Por ejemplo B- y R-ficoeritrinas se pueden excitar eficientemente a 488 nm conduciendo a una emisión máxima a 576 nm, esto representa un desplazamiento de Stokes de 88 nm, tres veces el de la fluoresceína. La intensa absorbancia y los grandes desplazamientos de Stokes de la emisión fluorescente hacen posible la detección de moléculas individuales de B-ficoeritrina, en disolución (Peck y col., 1989) y en superficies celulares (Wilson y col., 1996).

2.2.6.2.-Punto isoelectrico y estabilidad de los oligómeros.

Los puntos isoelectricos de las biliproteínas se encuentran comprendidos en el intervalo de pH de 4'7 a 5'5 por lo que estas proteínas se encuentran cargadas negativamente a pH fisiológico. Esta característica es bastante importante, sobre todo, cuando los conjugados de biliproteína se utilizan como etiquetas fluorescentes para marcadores de superficies celulares, en citometría de flujo u otras técnicas análogas. Generalmente las superficies celulares, están dotadas de carga negativa y no enlazan conjugados de biliproteínas de forma inespecífica.

Respecto a la estabilidad de los oligómeros, los hexámeros de ficoeritrina con una composición en subunidades $(\alpha\beta)_6\gamma$ son extremadamente estables, incluso a concentraciones proteicas muy bajas, así como los trímeros $(\alpha\beta)_3$ químicamente modificados de aloficocianina, que no se disocian hasta diluciones inferiores a 10^{-9} M (Ong y Glazer, 1985).

2.2.7.-APLICACIONES.

2.2.7.1.-Colorantes naturales.

En la actualidad, existe una demanda por parte de los consumidores, de reemplazar los colorantes sintéticos por compuestos de origen natural, a la que los sectores industriales implicados deben dar respuesta (Bermejo, 2008; 2009). Ésto es debido a la existencia de numerosos estudios que indican que los colorantes sintéticos son potencialmente tóxicos e incluso cancerígenos, generando reacciones alérgicas en individuos susceptibles. Sin embargo, estos problemas no aparecen cuando se utilizan compuestos naturales obtenidos a partir de organismos vivos, denominados biocolorantes. No obstante, el número de colorantes naturales y su gama de colores, son escasos en relación a las necesidades reales existentes, por lo que la utilización de compuestos sintéticos sigue siguiendo predominante. Como ejemplo, la industria del sector lácteo utiliza actualmente un gran número de colorantes sintéticos, tanto en productos frescos (postres, leches fermentadas, queso, etc.), como en productos de larga vida (leches aromatizadas, postres esterilizados, etc.), siendo muy restringido el uso de colorantes de tipo natural, pues además de escasos, la mayoría son poco estables frente a las condiciones de tratamiento térmico y conservación, otros producen sabores anómalos y algunos presentan problemas de solubilidad.

En este sentido, las biliproteínas poseen diferentes colores muy intensos y atractivos que hacen que estas macromoléculas posean un elevado potencial de utilización como colorantes naturales en amplios sectores, pudiendo reemplazar a los tradicionales colorantes sintéticos. Las biliproteínas más abundantes en la naturaleza son las ficoeritrinas y las ficocianinas. Las ficoeritrinas poseen tonalidades rosas, rojas y anaranjadas, mientras que las ficocianinas poseen colores de la gama de los azules y morados. Por tanto, la gama y la intensidad de colores disponibles, así como la abundancia relativa de estas proteínas en los organismos de procedencia, hacen de estas macromoléculas excelentes candidatos para su empleo como colorantes, constituyendo una alternativa real para el incremento y diversificación de la oferta de colorantes naturales existentes en el mercado.

Las reglamentaciones existentes hoy en día sobre el empleo de colorantes sintéticos en productos alimenticios son muy estrictas, fomentándose la puesta en marcha de programas de producción de colorantes de origen natural. Estas investigaciones han dado lugar al incremento de registro de patentes sobre colorantes naturales frente a las de colorantes

sintéticos. Grandes compañías, como Eastman Kodak y Hoffmann La Roche están implicadas activamente en este campo (Klausner, 1986; Parkinson, 1987; Guerrero y Losada, 1989).

En Japón, donde la industria del cultivo de microalgas esta muy bien desarrollada, se ha patentado el uso de biliproteínas como colorantes alimenticios en productos lácteos fermentados como el yogur (Dainnipon, 1979). De igual modo ficocianinas procedentes de algas verdes azuladas son utilizadas en productos cosméticos y en golosinas (Dainnipon, 1987; Arad y Yaron, 1992; Spolaore y col., 2006).

Las biliproteínas son altamente solubles en agua pero algunas de las anteriores aplicaciones como colorante requieren su solubilización en medios apolares. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha comenzado estudiando la inclusión de biliproteínas tales como C-ficocianina y B-ficoeritrina en los núcleos acuosos de microemulsiones formadas por AOT/agua/isooctano, como un sistema previo a su inclusión en medios apolares como los existentes en productos lácteos (Bermejo y col., 2000; 2003b).

2.2.7.2.-**Marcadores fluorescentes.**

Otra aplicación de las biliproteínas es la utilización como marcadores fluorescentes. A este respecto, sustituyen con ventajas a la fluoresceína que es el colorante más utilizado como marcador en bioquímica y biología. En efecto, la fluoresceína presenta algunos inconvenientes tales como la disminución de la solubilidad en agua de las proteínas a las que etiqueta y el aumento de la tendencia de éstas a unirse inespecíficamente a otras sustancias. Además, el tipo de emisión verde característico de la fluoresceína, es producida también por algunas sustancias naturales presentes en los fluidos y tejidos biológicos, lo que provoca la consiguiente falta de especificidad en la señal fluorescente.

Las biliproteínas presentan muchas ventajas respecto a los marcadores fluorescentes tradicionales: así, fluorescen con un alto rendimiento cuántico; su emisión no se altera prácticamente en márgenes amplios de temperatura y de pH; son muy solubles en agua; debido a su estabilidad se pueden almacenar durante meses y la fluorescencia anaranjada que producen es fácil de diferenciar de la fluorescencia verde producida por sustancias naturales. Por todas estas propiedades, las biliproteínas pueden ser catalogadas como inmejorables marcadores fluorescentes útiles en diferentes técnicas de estudio diagnóstico e investigación

biomédica (Kronick y Grossman, 1983; Glazer y Stryer, 1984; MacColl y Guar-Friar, 1987; Zola y col., 1992; Aráoz y col., 1998; Batard y col., 2002; Bermejo y col., 2002a; Sun y col., 2003). Por esta razón, nuestro grupo de investigación ha estudiado la utilización de biliproteínas (C-PC, APC y B-PE) como etiquetas fluorescentes de ácidos nucleicos para la detección de la hibridación de éstos en medios homogéneos mediante espectroscopía de fluorescencia (Bermejo y col., 2002b).

Las biliproteínas pueden conjugarse fácilmente con una gran variedad de moléculas para formar combinados denominados "phycofluors" por Glazer y Stryer (1984), mediante reacciones entre los grupos NH₂ de sus abundantes cadenas laterales de lisina. Se han obtenido conjugados de este tipo mediante la unión de biliproteínas con inmunoglobulinas y avidina (Oi y col., 1982; Triantafilou y col., 2000; Intrarapuk y col., 2001; Zhou y col., 2010). También moléculas pequeñas como la biotina se pueden unir a las biliproteínas por reacción con un activador apropiado de la molécula pequeña. Incluso se han obtenido conjugados entre diferentes biliproteínas (Ma y col., 2003; Wang y col., 2004; Sun y col., 2006). Estos conjugados se purifican mediante HPLC o por filtración en columna y cromatografía sobre hidroxapatito obteniéndose combinados muy utilizados en inmunoensayos fluorimétricos y en citometría de flujo.

En los inmunoensayos se genera una señal por algún elemento radiactivo, fluorescente, etc. Los marcadores radiactivos han sido usados extensamente en inmunoensayos, a pesar de las dificultades de desgaste, peligro de exposición a niveles altos de radiación y vida limitada. Sin embargo, los conjugados fluorescentes no tienen este tipo de inconvenientes (Soini y Hemmitä, 1979). Los "phycofluors" han sido examinados para su uso como marcadores fluorescentes de alta sensibilidad en estos tipos de análisis y se utilizan ventajosamente en inmunoensayos homogéneos, ya que no requieren una etapa posterior de separación tras la mezcla de anticuerpo y analito (Kronick y Grossman, 1983; Tjioe y col., 2001).

Las biliproteínas pueden usarse además en técnicas de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia, existiendo un número considerable de patentes (Paulus, 1985; Schwartz, 1986; 1990; Cohen y col., 1988; Dolbeare y Gray, 1989; Loken y Terstappen, 1989; Terstappen y col., 1989).

2.2.7.3.-Otras aplicaciones.

Se han desarrollado estudios clínicos dirigidos a comprobar la eficiencia de las biliproteínas en el tratamiento de distintas formas de cáncer. Estas macromoléculas han mostrado poseer valor terapéutico debido a su efecto protector y su actividad anticarcinogénica (Koho, 1982; González y col., 1999; Huang y col., 2002). Particularmente, las ficocianinas poseen propiedades muy beneficiosas desde el punto de vista médico y farmacológico, habiendo sido ensayadas en diferentes estudios que demuestran su capacidad anticarcinogénica (Remirez y col., 1999), actividad antioxidante y antiinflamatoria (Benedetti y col., 2006; Bhat y Madyastha, 2000). Asimismo, se ha demostrado que la ficocianina posee efectos positivos sobre el sistema inmunitario. Así, experimentos de administración oral de extracto de ficocianina a ratones con cáncer de hígado demostraron que el índice de supervivencia del grupo de tratamiento fue significativamente más alto que el observado en el grupo de control no tratado con ficocianina, encontrándose además un incremento de la actividad linfocitaria.

Otros autores han estudiado los efectos positivos de ficocianinas como agente protector antioxidante de eritrocitos en humanos, frente a la ruptura provocada por radicales peroxi (Romay y González, 2000) y en animales como ratones (Romay y col., 1999). Actualmente se está estudiando el efecto antioxidante y el efecto quelante sobre el hierro de extractos de ficocianinas procedentes de la microalga *Spirulina platensis* (Bermejo y col., 2008).

Otro tipo de aplicación en continuo desarrollo en la actualidad, es la utilización de biliproteínas como parte fundamental de biosensores. Así, la B-ficoeritrina se ha utilizado para la determinación de contaminación ambiental provocada por insecticidas organoclorados (Ayyagari y col., 1995).

2.3.-PURIFICACIÓN DE PROTEINAS.

2.3.1.-GENERALIDADES.

Buena parte de los procesos biotecnológicos para producir productos farmacéuticos o de diagnóstico, implican la purificación de proteínas y péptidos procedentes de diversas fuentes. Así, fuentes de este tipo son: bacterias, levaduras, fluidos procedentes de células de cultivo de mamíferos y extractos de tejidos de origen natural tanto animales como vegetales.

Los esquemas de purificación contienen múltiples operaciones unitarias, incluyendo diversos pasos cromatográficos necesarios para garantizar la eliminación de impurezas contaminantes. El carácter del producto obtenido y el uso que se pretende hacer de él, dictaminarán el grado de purificación necesario. Así, cada paso en el proceso de recuperación afectará a la economía total del mismo, debido a que el coste se verá incrementado por el mayor tiempo invertido en el proceso y también por pérdidas en el rendimiento. Una selección cuidadosa y una combinación de las operaciones unitarias adecuadas durante la fase de diseño, pueden reducir el número de etapas necesarias.

El primer paso en la purificación de la macromolécula de interés, tradicionalmente ha sido realizado mediante cromatografía de adsorción utilizando un lecho empaquetado convencional. Esto precisa del pretratamiento de la muestra antes de introducirla en la columna de cromatografía, involucrando diversas subetapas.

Las técnicas estándar utilizadas para la eliminación de restos celulares y material particulado han sido tradicionalmente la centrifugación y microfiltración. La eficacia de la etapa de centrifugación depende del tamaño de la partícula, diferencia de densidades entre las partículas y la fase móvil, y la viscosidad de la muestra. La utilización de material particulado en la muestra (como por ejemplo el procedente de *E. coli*), con pequeño tamaño de partícula y alta viscosidad, reduce la capacidad de alimentación durante la centrifugación y algunas veces, hace difícil la obtención de un líquido completamente libre de partículas. Para obtener una disolución libre de partículas que posteriormente pueda ser purificada en cromatografía de lecho empaquetado, normalmente se combina centrifugación con microfiltración. Sin embargo, la microfiltración también tiene inconvenientes. Aunque la microfiltración produce disoluciones libres de material particulado, el flujo de líquido por unidad de área de membrana, a menudo disminuye durante el proceso de filtración y además la contaminación

de las membranas de microfiltración es otro problema que añadir al coste de operación. El uso combinado de centrifugación y filtración produce un coste temporal adicional que es causa de un significativo gasto de capital por generación de costes relacionados con el mantenimiento de los equipos y además existen pérdidas significativas de producto debido a la degradación del mismo.

Una alternativa a la clarificación tradicional y a la cromatografía de lecho empaquetado, es la adsorción en la fase estacionaria en un tanque agitado. Esta técnica puede ser usada cuando se recupera el compuesto de interés procedente de un gran volumen de muestra. Además, el proceso para la adsorción de una muestra compleja es un procedimiento de adsorción en una sola fase que requiere más adsorbente para lograr el mismo grado de adsorción que en un proceso de muchas etapas tal como la cromatografía de lecho empaquetado. Por eso, un proceso de muchas etapas representa una utilización más eficaz del adsorbente, lo cual reduce el coste del proceso.

La adsorción de la macromolécula de interés por un adsorbente en un lecho fluidizado también elimina la necesidad de la eliminación previa de partículas. Los lechos fluidizados han sido utilizados en la industria durante muchos años para la recuperación de compuestos tales como los antibióticos (Barthels y col., 1958; Belter y col., 1973; Gailliot y col., 1990). En el lecho fluidizado, es inevitable la formación de canales preferentes, las turbulencias y el remezclado. La existencia de una única etapa de equilibrio en lecho fluidizado, disminuye la eficacia de los procesos de adsorción, produciendo un bajo rendimiento, precisando de procesos de lavado altamente ineficaces y de tiempos de operación bastante elevados.

Se han realizado varios intentos de estabilización de lechos fluidizados para conseguir un reactor de lecho fluidizado en multietapas con características similares a la cromatografía de lecho empaquetado. La primera aproximación consistió en la utilización de la segmentación del lecho por la inserción de una serie de platos con orificios de tamaño adecuado, en la columna de adsorción (Buijs y Wesselingh, 1980). Otra aproximación fue el uso de partículas magnéticas adsorbentes y campos magnéticos generados sobre la columna de lecho fluidizado para estabilizarla (Burns y Graves, 1985; Nixon y col., 1991). Una estabilización considerable del lecho, se ha logrado usando adsorbentes magnéticos pero los experimentos ha sido realizados a escala de laboratorio y para escalas superiores se requieren complejos y costosos equipos.

2.3.2.-PURIFICACIÓN DE BILIPROTEINAS.

2.3.2.1.-Metodologías convencionales.

La obtención de biliproteínas puras ha sido motivo de numerosas investigaciones y los primeros éxitos relevantes en la purificación de las mismas, fueron conseguidos por Gantt y Lipschultz (1974), bien por doble electroforesis en gel de acrilamida, por centrifugación en gradiente de sacarosa o por filtración en columna de Sephadex G-200 seguida de electroforesis en gel de acrilamida. Se han utilizado variaciones sobre estas técnicas, como son el empleo de HPLC y la ultracentrifugación, que han permitido la purificación de algunas biliproteínas en escala semipreparativa. Es importante resaltar, que un procedimiento de purificación que vaya bien para una biliproteína de un organismo no es necesariamente un buen método para la correspondiente proteína de otro organismo (Gombos y col., 1984; Schatz y Witt, 1984; Stewart y Farmer, 1984; Duval y col., 1987; Padgett y Krogmann, 1987; Glazer, 1988a; Hilditch y col., 1991).

La mayor parte de los procedimientos utilizan una serie de tratamientos previos cuyo objetivo es la obtención de una disolución mezcla de biliproteínas, para la purificación de las cuales, es necesaria la combinación de diferentes etapas cromatográficas o electroforéticas y la precipitación mediante adición de sulfato amónico. La principal etapa en los pretratamientos es la ruptura celular y para ésto se han ensayado diferentes técnicas que van desde la utilización de ultrasonidos (la más común) (Glazer y Hixson, 1977; Grabowski y Gantt, 1978; Duerring y col., 1991; Ficner y col., 1992; Bermejo y col., 1997; 2001) hasta otras técnicas como la utilización de acetona (Hilditch y col., 1991), medios mecánicos (Galland-Irmouli y col., 2000), utilización de rivanol (Tchernov y col., 1993) y tratamiento con lisozima (Jung y Dailey, 1989). En todos los procedimientos que utilizan etapas cromatográficas se hace uso de gradientes continuos o discontinuos de fuerza iónica e incluso de pH.

Se suele tomar como criterio de la pureza alcanzada en las separaciones cromatográficas, valores concretos de relaciones absorciométricas a longitudes de onda características. Uno de los más utilizados preconiza que, por ejemplo, la C-ficocianina se encuentra pura cuando la relación A_{615}/A_{280} es mayor de 3'4, mientras que para aloficocianina el criterio adoptado es que la relación A_{650}/A_{280} sea mayor de 3 o bien que la relación A_{620}/A_{650} permanezca constante en una serie de fracciones (Bryant y col., 1978; Siegelman y

Kycia, 1978; Zilinskas y col., 1978; MacColl y col., 1980; Gombos y col., 1984; Padgett y Krogman, 1987; Hilditch y col., 1991). Sin embargo, la utilización exclusiva de estos criterios ha sido ampliamente criticada y la pureza debe establecerse y corroborarse por otras técnicas, como son la electroforesis en condiciones desnaturalizantes o la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y las pruebas espectroscópicas (absorción y fluorescencia).

2.3.2.2.-Metodologías basadas en adsorción en lecho expandido.

En términos generales, las metodologías convencionales utilizadas para la obtención de biliproteínas, están constituidas por múltiples y tediosas etapas que generan una cantidad muy pequeña de muestra purificada, con elevados costes económicos y se caracterizan por ser procesos no susceptibles de ser escalados y por tanto poco importantes desde el punto de vista de la explotación industrial biotecnológica.

Como alternativa a los procesos de purificación convencionales para biliproteínas, se vienen desarrollando en los últimos años, nuevos procesos de separación y purificación, basados en la adsorción en lecho expandido, para la recuperación con alto rendimiento y en cantidades apreciables de ficoeritrinas y ficocianinas procedentes de algas tales como *Porphyridium cruentum* y *Spirulina platensis* (Bermejo y col., 2003a; 2006; 2007; 2008; 2009; Niu y col., 2007).

Se trata de una metodología más sencilla en cuanto a la reducción del número de etapas necesarias, lo que provoca una disminución de los costes operacionales y de procesado, además de un aumento muy importante del rendimiento de recuperación proteico.

El proceso global de purificación de una biliproteína mediante esta metodología consta de tres etapas fundamentales: los pretratamientos, una etapa de adsorción en lecho expandido y una tercera de cromatografía convencional en lecho empaquetado.

La etapa que dota de singularidad a esta metodología es sin duda la segunda, constituida por la adsorción de la proteína de interés en una columna de adsorción de lecho expandido. Inicialmente es necesario conocer la capacidad del lecho cromatográfico y para ello se realizan experiencias en modo estático (isotermas de adsorción) y en modo dinámico

(curvas de ruptura). Una vez conocida la capacidad del sistema, se deben evaluar el resto de variables de trabajo tales como viscosidad, grado de expansión, etc.

Es importante resaltar, que el seguimiento de la pureza alcanzada en los distintos extractos proteicos obtenidos tras cada etapa, se realiza mediante espectroscopia uv-visible, electroforesis tipo SDS-PAGE y HPLC. Este seguimiento suele detectar la presencia de contaminación en las muestras procedentes de lecho expandido, por lo que una tercera y última etapa cromatográfica es necesaria para la obtención de biliproteínas puras. Se suele utilizar normalmente cromatografía convencional de intercambio iónico o bien cromatografía de exclusión molecular (filtración por gel).

Este tipo de metodología permite obtener biliproteínas con rendimientos globales de proceso superiores al 60%, siendo un avance importante frente a las metodologías convencionales existentes hasta el momento, y constituyendo un método sencillo y susceptible de ser pasado a mayor escala. Además, esta metodología supone una disminución del tiempo necesario en el proceso y por tanto del coste del mismo.

2.4.-CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN EN LECHO EXPANDIDO.

Draeger y Chase (1990) consiguieron crear un lecho fluidizado estable (lecho expandido), con características cromatográficas similares a las de un lecho empaquetado, usando adsorbentes cromatográficos convencionales sobre una matriz de agarosa en una columna provista con entrada de distribución de líquido diseñada para tal finalidad. La Figura 2.2 muestra la diferencia entre el sistema de lecho empaquetado convencional y el sistema de lecho expandido. La aplicación de mezclas proteicas y celulares sobre estos lechos expandidos muestran el potencial de la técnica para recuperar proteínas de muestras que contienen material particulado (Draeger y Chase, 1991). Durante las dos últimas décadas se han realizado numerosos estudios utilizando este tipo de técnica.

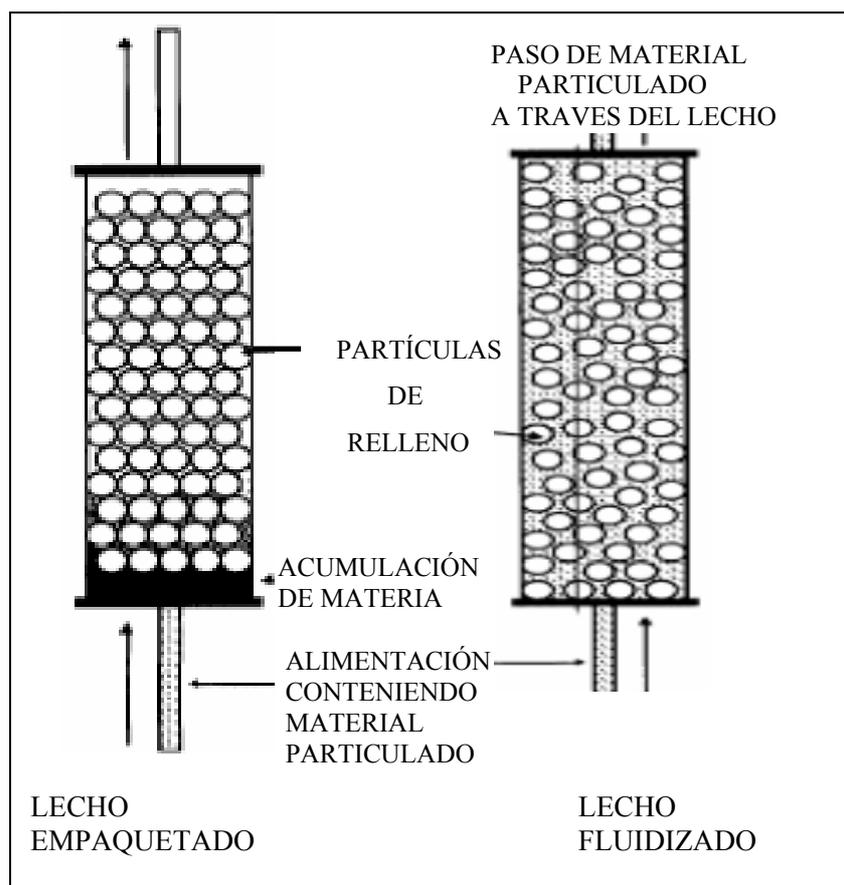


Figura 2.2

Sistemas de lecho empaquetado y lecho expandido.

La eficacia en este tipo de lecho expandido es muy similar a la obtenida en un lecho empaquetado, utilizando factores de expansión (H/H_0) (altura expandida / altura sedimentada) comprendidos entre 2 y 3 y bajas velocidades de flujo para evitar que el lecho se expanda demasiado, resultando un rendimiento global bajo. En 1992 fue presentado el primer prototipo de adsorbentes sobre matriz de agarosa (Barnfield Frej y col., 1992; Hedman y Barnfield Frej, 1992; Johansson y Wnukowski, 1992; Wnukowski y Lindgren, 1992). En 1993, la casa Pharmacia Biotech introdujo un tipo de adsorbentes cromatográficos y columnas denominadas Streamline (McCormick, 1993; Schmidt y col., 1993), materiales especialmente diseñados para utilización en adsorción en lecho expandido. Las columnas y adsorbentes Streamline permiten la formación de lechos fluidizados estables a altas velocidades de flujo de operación. La primera medida fue introducir dos cambiadores iónicos, Streamline DEAE y Streamline SP, ambos desarrollados para la biocompatibilidad de la matriz de agarosa por la inclusión de un núcleo de material inerte de cuarzo cristalino para proporcionar la densidad requerida (Figura 2.3). El tamaño de partícula definido y la distribución de densidad de los

adsorbentes, junto con el diseño especial de las columnas, dieron como resultado lechos expandidos con unas propiedades hidrodinámicas consistentes y bien definidas, y con características de adsorción similares a las de los lechos empaquetados de medios cromatográficos estándar (Chase y Chang, 1993; Kämpe y col., 1993; Hjorth y col., 1995; Chang y Chase, 1996).

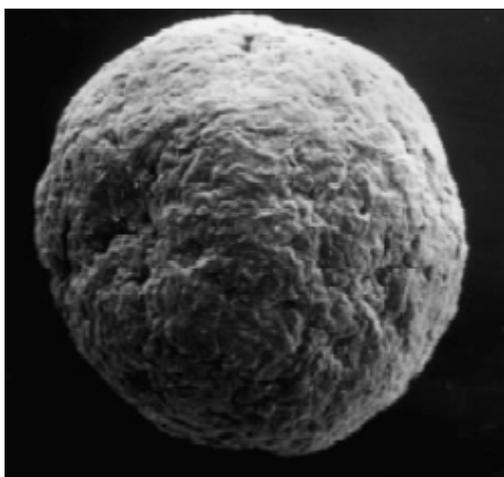


Figura 2.3

Imagen de una partícula de STREAMLINE DEAE al microscopio electrónico (80 aumentos).

Desde entonces, el desarrollo de adsorbentes está en continua expansión, existiendo en la actualidad una gran gama de materiales adsorbentes enlazados a diferentes matrices de diferentes materiales compuestos susceptibles de ser utilizados en lechos expandidos (Gao y col., 2007; Li y col., 2007; Xia y col., 2007; Zhao y col., 2009). Estos adsorbentes son más densos que los adsorbentes enlazados a agarosa, pero el pequeño tamaño de la partícula hace posible que este material complejo se expanda en el mismo grado que los lechos de agarosa con velocidades de flujo comparables, pero con rendimientos globales de recuperación muy altos.

Las propiedades de adsorción en lecho expandido, lo convierten en el procedimiento más innovador para la recuperación de macromoléculas procedentes de una mezcla compleja. Los procesos de clarificación, concentración y purificación inicial pueden ser combinados y reducidos a una única operación, disminuyendo el número de etapas necesarias, lo que implica un abaratamiento importante del proceso. Además, esto implica un aumento del rendimiento, una reducción del tiempo global de operación y una reducción de los costes de mano de obra y de mantenimiento de los equipos (Schmidt y col., 1993; Suding y Tomusiak,

1993; Batt y col., 1995). Por todo esto, la adsorción en lecho expandido también ha demostrado ser una metodología muy versátil que puede ser aplicada a un gran conjunto de muestras de diferente procedencia (Sköld y col., 1993; Suding y Tomusiak, 1993; Hansson y col., 1994; Thömmes, 1995; Johansson y col., 1995; 1996; Chang y Chase, 1996; Jägersten y col., 1996; Barnfield Frej y col., 1997; Balasundaram y col., 2008; Poulin y col., 2008) y lo que es más importante ha demostrado ser también una técnica escalable (Johansson y col., 1993; Lindgren y col., 1993; Zapata y col., 1996; Barnfield Frej y col., 1997; LØkra y col., 2008; Sharma y col., 2008; Titchener-Hooker y col., 2008; Li y Chase, 2009; Campbell y Glatz, 2010; Chong y col., 2010; Yap y col., 2010) con gran potencial de utilización en las industrias biotecnológicas de tipo químico y farmacéutico.

2.4.1.-PRINCIPIOS DE LA ADSORCIÓN EN LECHO EXPANDIDO.

La adsorción en lecho expandido es una operación unitaria en la cual, las macromoléculas de interés son retenidas procedentes de la muestra de alimentación, sin requerir etapas previas de clarificación, concentración y purificación inicial. La expansión del adsorbente en el lecho crea una separación entre las partículas que lo constituyen, lo que permite el paso de las células, restos celulares y otras partículas durante la aplicación de la muestra a la columna sin que se produzca el taponamiento de la misma (Figura 2.2).

Las columnas preparadas con adsorbentes del tipo Streamline son susceptibles de ser expandidas y equilibradas mediante la aplicación del flujo de fase móvil en sentido ascendente. Un lecho expandido estable se forma cuando las partículas adsorbentes se mantienen suspendidas en equilibrio debido al balance entre la velocidad de sedimentación de las partículas y la velocidad de flujo de la fase móvil ascendente.

La alimentación de la columna, constituida por la muestra inicial particulada, se aplica al lecho con el mismo flujo de fase móvil ascendente usado durante las subetapas de expansión y equilibrado. La proteína de interés se unirá al adsorbente mientras que los restos de células, material particulado y otros componentes contaminantes, pasarán a través del lecho cromatográfico sin encontrar obstáculo. El material débilmente enlazado es eliminado en la etapa de lavado utilizando una corriente ascendente de fase móvil. Finalizada esta etapa de lavado se detiene el flujo de fase móvil y se deja sedimentar el lecho. Entonces el adaptador de la columna se posiciona en las cercanías de la superficie del lecho sedimentado y

el sentido del flujo se invierte, siendo la proteína adsorbida en la fase estacionaria eluida con una fase móvil de composición adecuada. El resultado es una disolución eluida que contiene la proteína de interés en una elevada concentración y parcialmente purificada.

Después de la elución, el lecho se regenera lavándolo con flujo descendente en el modo de lecho empaquetado usando fases móviles de diferente naturaleza. Esta regeneración elimina las moléculas más fuertemente enlazadas que no han podido ser desorbidas durante la fase de elución correspondiente y deja la columna en condiciones de ser utilizada en una nueva experiencia.

La adsorción en lecho expandido se basa en la obtención de una fluidización estable, la cual combina las propiedades hidrodinámicas del lecho fluidizado con las propiedades de la cromatografía en lecho empaquetado. La fluidización permite que la muestra a tratar atraviese el lecho sin encontrar obstáculos. El principio del lecho expandido es la obtención de una fluidización estable que minimice la mezcla, la formación de canales preferentes y la turbulencia en el lecho, permitiendo la formación de varias unidades de transferencia de masa (platos teóricos) en el lecho expandido, imitando de esta forma el funcionamiento de una columna tradicional de lecho empaquetado (Johansson y Wnukowski, 1992; Wnukowski y Lindgren, 1992).

2.4.2.-CARACTERÍSTICAS DE DISEÑO.

El adsorbente

Especificar las características cromatográficas de un adsorbente para su uso en adsorción en lecho expandido incluye un control cuidadoso de la velocidad de sedimentación de las partículas del mismo. La velocidad de sedimentación es proporcional a la diferencia de densidad entre el adsorbente y el fluido circundante. Para lograr un alto rendimiento requerido en aplicaciones industriales de la cromatografía de adsorción, las velocidades de flujo deben ser altas a lo largo de todo el ciclo de purificación. Los primeros resultados obtenidos en la adsorción en lecho expandido usando adsorbentes cromatográficos convencionales basados en agarosa (Draeger y Chase, 1990), revelaron una evidente necesidad de partículas con alta velocidad de sedimentación, para permitir la operación de lechos expandidos a velocidades de flujo altas, sin que se produzca un arrastre de las partículas que constituyen el relleno de la columna, por parte del flujo de líquido ascendente.

Los adsorbentes están basados en matrices de agarosa, un material que ha demostrado un buen rendimiento para trabajo en cromatografía a escala industrial. La estructura macroporosa de las matrices de agarosa, fuertemente entrecruzadas de modo transversal, combina la buena capacidad de adsorber macromoléculas, con la alta estabilidad química y mecánica. La estabilidad mecánica es una propiedad importante en una matriz para ser usada en lecho expandido, para reducir el deterioro cuando las partículas se mueven libremente en el lecho. La matriz de agarosa modificada, usada en la fabricación de los adsorbentes, es menos frágil que el material inorgánico como el vidrio o la cerámica y la estabilidad mecánica ha sido verificada por medio de repetidos ciclos de expansión y sedimentación (Hansson, 1995).

Las partículas fabricadas con material orgánico tienen limitada la densidad y necesitarán tener diámetros muy grandes para la alta velocidad de sedimentación requerida. El gran diámetro de la partícula da como resultado una larga trayectoria difusional, lo que causa una gran resistencia a la transferencia de masa, contrarrestando la productividad. Los adsorbentes para CALE están basados en materiales compuestos de un núcleo de material inerte, que es más denso que otros materiales orgánicos y se diseñan para que su velocidad de sedimentación sea alta para un tamaño de partícula razonable.

La diversidad de partículas es un factor importante en el diseño del lecho expandido, contribuyendo a su estabilidad. Los gradientes de densidad y tamaño posicionan las partículas a alturas específicas en el lecho expandido, dependiendo de la velocidad de sedimentación de las partículas adsorbentes individuales. Las partículas pequeñas y ligeras se colocan en la parte superior del lecho y las grandes y pesadas, en el fondo, resultando una expansión estable y uniforme. En otras palabras, las partículas encuentran su posición ideal en la columna, lo cual es razón para la baja dispersión axial en la adsorción del lecho expandido (Figura 2.4).

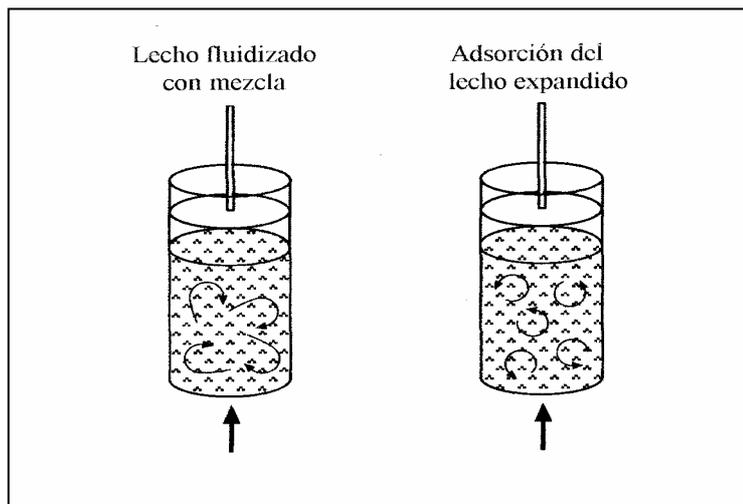


Figura 2.4

Comparación del movimiento de las partículas en un lecho fluidizado con mezcla extensiva, con el movimiento de partículas en un lecho expandido. En la fluidización estable de un lecho expandido solo se pueden ver movimientos circulares de las partículas adsorbentes.

La columna

La columna también tiene gran importancia en la formación de un lecho expandido estable y suele estar equipada con un sistema de distribución de líquido especialmente diseñado para permitir su formación. La necesidad de un sistema de distribución de líquido especialmente diseñado para lechos expandidos, deriva de la caída de presión en el lecho expandido. Usualmente, el flujo a través de un lecho empaquetado genera una caída de presión tan alta sobre el lecho, que puede ayudar al distribuidor a producir un flujo en “tapón” a través de la columna. Debido a que la caída de presión sobre un lecho expandido es mucho más pequeña, el distribuidor en una columna de lecho expandido debe producir un flujo tipo “tapón” por sí mismo. Además de generar una caída de presión, el distribuidor también tiene que dirigir el flujo en una sola dirección vertical y cualquier flujo en dirección radial dentro del lecho, causará turbulencia que se propagará a través de la columna.

Otra función del sistema de distribución es evitar que el adsorbente salga de la columna. Esto se consigue normalmente por medio de una red montada en el lado del distribuidor que está de cara al adsorbente. La red debe tener un tamaño de malla que permita que los materiales particulados la atraviesen y que a la vez mantenga al adsorbente en el interior de la columna.

2.4.3.-CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO.

Expansión del lecho

La fluidización tiene lugar cuando las partículas son empujadas hacia arriba en una columna a una velocidad correspondiente a su velocidad de sedimentación. El grado hasta el cuál un lecho se expande, es decir la altura que alcanza una partícula cuando es transportada, es controlada por el tamaño y la densidad de las partículas de adsorbente, la velocidad de flujo lineal de la fase móvil y la viscosidad de ésta. El tamaño y la densidad de las partículas adsorbentes han sido definidos para permitir una expansión óptima a velocidades de flujo que aseguran alta productividad del sistema de purificación.

Es importante resaltar que los valores absolutos para el grado de expansión, variarán con la temperatura de trabajo y el sistema amortiguador utilizado (densidad y viscosidad del líquido). El efecto de un incremento en la viscosidad del sistema amortiguador es un incremento en el grado de expansión. Esta es una consideración importante durante la aplicación de la muestra en bruto (Chang y Chase, 1996).

Características de la adsorción

La estabilidad de los lechos expandidos proporciona características de adsorción similares a aquellas de cromatografía en lecho empaquetado y la capacidad de unión disponible depende del peso molecular de la molécula de interés, de la fuerza de unión a los ligados en la matriz, de la velocidad de flujo y otras condiciones del proceso. Los valores absolutos para capacidad de unión de proteínas son solamente válidos para proteínas específicas sometidas a velocidades de flujo y condiciones de proceso definidas.

La dispersión axial es normalmente un orden de magnitud más alto en un lecho expandido si lo comparamos con un lecho empaquetado. Sin embargo, las características de adsorción de un lecho expandido son muy similares a las de un lecho empaquetado (Chase y Chang, 1993).

Evaluación de la estabilidad del lecho

El control de la hidrodinámica del lecho expandido es crucial para la realización de una operación de adsorción en lecho expandido. La hidrodinámica de un lecho expandido estable, realizada bajo condiciones de proceso bien definidas, está caracterizada por un alto

grado de reproducibilidad, lo que permite el uso de test eficientes y sencillos para verificar la estabilidad antes de que la alimentación sea aplicada a la columna y los mismos tipos de test utilizados para verificar la funcionalidad de una columna de cromatografía empaquetada, se utilizan en adsorción en lecho expandido.

Inspección visual

Cuando se trabaja con columnas a escala piloto y de laboratorio con tubos de cristal, una inspección visual de los movimientos en el lecho expandido se puede llevar a cabo antes de empezar la aplicación de la muestra. El lecho es estable cuando solo se observan pequeños movimientos circulatorios de las partículas de adsorbente. Otros movimientos pueden indicar flujo o canalización turbulentos, lo cual llevaría a una adsorción ineficiente. Amplios movimientos circulares de las partículas en la parte superior del lecho indican normalmente que la columna no está en posición vertical (Figura 2.5). El efecto de canalización en la parte inferior del lecho, indica normalmente que hay aire debajo del plato de distribución o un sistema de distribución parcialmente obstruido.

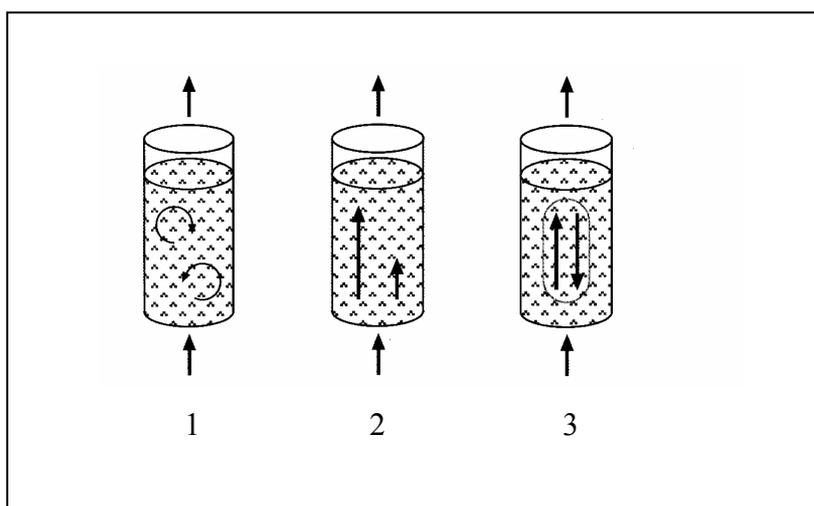


Figura 2.5

Modelos de comportamiento en el movimiento de las partículas de adsorbente en un lecho expandido. (1) Lecho expandido estable con pequeños movimientos circulares de las partículas, no hay mezclado retroactivo o mezcla de partículas. (2) Efecto de canalización en el líquido por causa de aire debajo del plato de distribución o por el efecto de pulsación de la bomba. (3) Grandes movimientos circulares y efecto de canalización causados porque la columna no está nivelada.

Sin embargo, la inspección visual por sí misma no nos da una imagen completa de la distribución del flujo a través de toda la sección transversal de la columna. La estabilidad del lecho debería ser evaluada con técnicas más precisas, como la medición del grado de expansión.

Medición del grado de expansión

La medición del grado de expansión es una medida útil y rápida de la estabilidad del lecho. El grado de expansión es determinado por la relación entre la altura del lecho expandido y el lecho sedimentado (H/H_0). Si el grado de expansión difiere del valor esperado, puede indicar un lecho inestable. Solo pueden compararse valores absolutos para el grado de expansión si la disolución reguladora (densidad y viscosidad del líquido) y las temperaturas son constantes entre operaciones. Un descenso significativo en el grado de expansión puede indicar efecto de canalización o estabilidad pobre debido a que puede haber aire atrapado debajo del plato de distribución, que la columna no esté en posición vertical, o bien un plato de distribución bloqueado.

2.5.-SOLUBILIZACIÓN DE PROTEINAS EN MEDIOS APOLARES.

La solubilización de proteínas en medios apolares implica la transferencia de la proteína hidratada dentro del espacio formado en el interior de un agregado de moléculas surfactantes (normalmente de dioctilsulfosuccinato) formando un agregado molecular (micela reversa) que se disuelve en un disolvente de baja viscosidad (normalmente un alcano de cadena corta).

En los últimos años se ha dedicado mucha atención a la solubilización de proteínas en medios apolares hidrocarbonados con la ayuda de tensioactivos iónicos. Este creciente interés se fundamenta en dos razones principales, por un lado el procedimiento puede abrir el camino hacia nuevas aplicaciones técnicas de estas biomoléculas y además su confinamiento en los núcleos acuosos de microemulsiones de este tipo es motivo de planteamiento de una serie de cuestiones relevantes en la investigación básica de medios microheterogéneos y de la química de proteínas. Este campo sigue estando en pleno desarrollo en la actualidad, ofreciendo un modelo sencillo de interfase agua-membrana.

Gitler y Montal (1972, a y b) fueron los primeros en solubilizar una proteína en medios hidrocarbonados, intentando reconstruir una membrana mediante la utilización de proteolípidos y aunque su trabajo no estaba directamente relacionado con microemulsiones de tipo micelar, sí que representó el principio de las nociones básicas para la adaptación de proteínas a un ambiente hidrocarbonado. El término “proteínas en micelas reversas” fue introducido por primera vez por Wells (1974), quien usó la fosfolipasa en mezclas de dietiléter/metanol, con fosfatidilcolina como tensioactivo.

El grupo de Luisi y col. comenzó a estudiar el transporte de péptidos desde la fase acuosa hacia la fase orgánica, usando cloruro de trioctil metil amonio, lo que permitió transferir péptidos de alto peso molecular como la α -quimiotripsina hasta ciclohexano, haciendo posible el estudio de sus propiedades espectroscópicas, aunque con la consiguiente pérdida de la actividad enzimática (Dossena y col., 1976; Luisi y col., 1977). Martinek y col. (1978) suministraron datos acerca de la actividad de α -quimiotripsina y peroxidasa solubilizadas en medio n-octano usando di(2-etil-hexil) sulfosuccinato sódico (AOT).

El sistema AOT-agua-disolvente hidrocarbonado (usualmente n-octano o isooctano), es uno de los más utilizados para la solubilización vía microemulsiones micelares. El grupo de Luisi propuso un modelo estructural para los sistemas micelares conteniendo biomoléculas como las proteínas, considerando parámetros cinéticos, pH locales, etc. Posteriormente, Kotlarchyk (1985) utilizó la técnica de dispersión de neutrones para determinar la estructura de las micelas reversas con AOT como tensioactivo.

El parámetro estructural clave en este tipo de medios microheterogéneos, es la relación molar agua/tensioactivo (w_0), la cual determina su tamaño así como el grado de desviación de las propiedades del agua del interior micelar, como son la polaridad y la constante dieléctrica, la microviscosidad, la actividad, el punto de congelación, la eficiencia en la transferencia protónica, así como el potencial de enlace de hidrógeno del núcleo acuoso. Estas propiedades se pueden modificar experimentalmente variando w_0 , dotando a los medios micelares de un único y versátil campo de reacción (Nicot y col., 1985; Gallay y col., 1987). El agua del núcleo acuoso de estos sistemas influye de forma notable en los estados conformacionales y dinámicos de las macromoléculas biológicas solubilizadas en ella. Además, debido a su transparencia óptica, permite realizar medidas de tipo espectroscópico. Las microemulsiones formadas por micelas reversas constituyen un modelo de membrana para el estudio de

péptidos, proteínas, etc., en un ambiente acuoso (Ferreria y Gratton, 1990; Bhattacharyya y Basak, 1993).

En la actualidad, continúa el desarrollo y estudio de la solubilización de proteínas y derivados proteicos en medios hidrocarbonados, mediante la inclusión de las mismas en micelas reversas, por constituir estos sistemas, medios microheterogéneos que simulan situaciones específicas que suceden a nivel celular (Leodidis y Hatton, 1990 a y b; Bhattacharyya y Basak, 1993; 1995; Singh y Aruna, 1995; Hasmann y col., 2001; Zhao y col., 2010).

2.5.1.-GENERALIDADES.

Las micelas reversas son agregados esferoidales formados por moléculas surfactantes en medios apolares. Las moléculas de tensioactivo por encima de una cierta concentración denominada concentración micelar crítica (CMC), forman un agregado más o menos esférico, termodinámicamente estable, cuyas cabezas polares se orientan formando un núcleo donde el agua puede solubilizarse (Figura 2.6). El contenido acuoso del sistema micelar se expresa normalmente en términos de w_0 (Ecuación 2.1), es decir de la razón molar de moléculas de agua a moléculas de tensioactivo (Fendler y Fendler, 1975). Este parámetro determina la mayoría de propiedades físicas y estructurales de las micelas reversas. El agua solubilizada en el interior de estas micelas reversas constituye el denominado núcleo acuoso y por tanto moléculas polares como las proteínas hidrosolubles pueden encontrarse en éste.

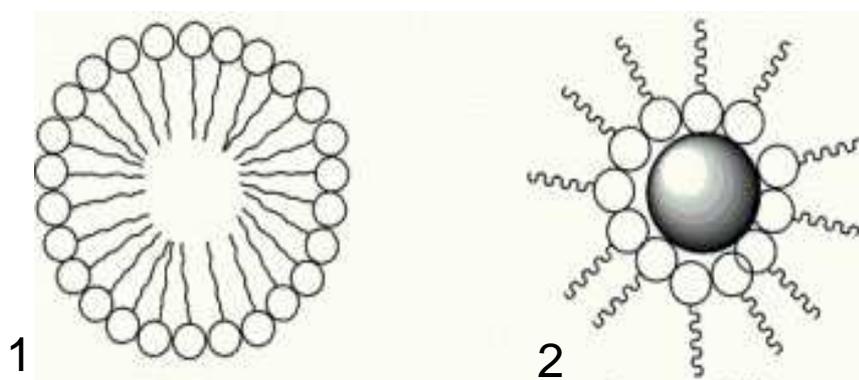


Figura 2.6

Tipos de micelas: 1) Micela normal (núcleo apolar); 2) Micela reversa (núcleo polar).

$$W_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{Surfactante}] \quad \text{Ecuación 2.1}$$

Un sistema micelar ideal sería aquel que tuviera muchas micelas vacías y sólo unas pocas contuvieran una molécula de proteína, sin que existieran micelas que incluyeran más de una molécula. En 1980, Turro y col. proporcionaron datos experimentales que relacionaban la probabilidad de encontrar “n” moléculas de proteína por cada micela, con el parámetro “s”, que es la razón molar de moléculas de proteína a moléculas de micela (Ecuación 2.2) (Tabla 2.9). De esta forma los resultados que se deriven de posteriores estudios no serán afectados por las posibles interacciones entre moléculas de proteína que compartan el núcleo acuoso del sistema micelar.

$$S = [\text{Proteína}]/[\text{Micelas}] \quad \text{Ecuación 2.2}$$

Tabla 2.9

Probabilidad de encontrar una o más moléculas de proteína en función del parámetro “s”
(Turro y col., 1980).

S	P(n=0)	P(n=1)	P(n>1)
0,1	0,90	0,09	0,00
0,5	0,61	0,30	0,06
1,0	0,37	0,37	0,23
2,0	0,13	0,27	0,49

P (n=0): Probabilidad de encontrar micelas vacías.

P (n=1): Probabilidad de encontrar micelas conteniendo una molécula de proteína.

P (n>1): Probabilidad de encontrar micelas conteniendo más de una molécula de proteína.

2.5.2.-TÉCNICAS DE SOLUBILIZACIÓN.

Existen fundamentalmente tres técnicas para la solubilización de biomoléculas en micelas reversas (Figura 2.7):

a) Técnica de transferencia de fase. Consiste en poner en contacto la disolución hidrocarbonada del tensioactivo con la disolución acuosa del biopolímero. En este caso

pueden estudiarse de forma más precisa fenómenos cinéticos y de transporte de masa desde la fase acuosa a la disolución hidrocarbonada.

b) Técnica de inyección. Consiste en adicionar una pequeña cantidad de disolución madre de proteína en el tampón adecuado, a la disolución hidrocarbonada del tensioactivo. Esta técnica es la más rápida y simple, pero presenta pequeñas desventajas como es la dificultad de conseguir concentraciones suficientemente altas de proteína en la disolución hidrocarbonada, no existiendo además la seguridad de preparar las disoluciones termodinamicamente estables.

c) Técnica de extracción del estado sólido. Elimina las desventajas anteriores pero requiere más tiempo. En este caso la proteína es suspendida en la disolución acuosa-hidrocarbonada del tensioactivo. Este procedimiento se emplea en los casos de solubilidad limitada de proteínas en agua.

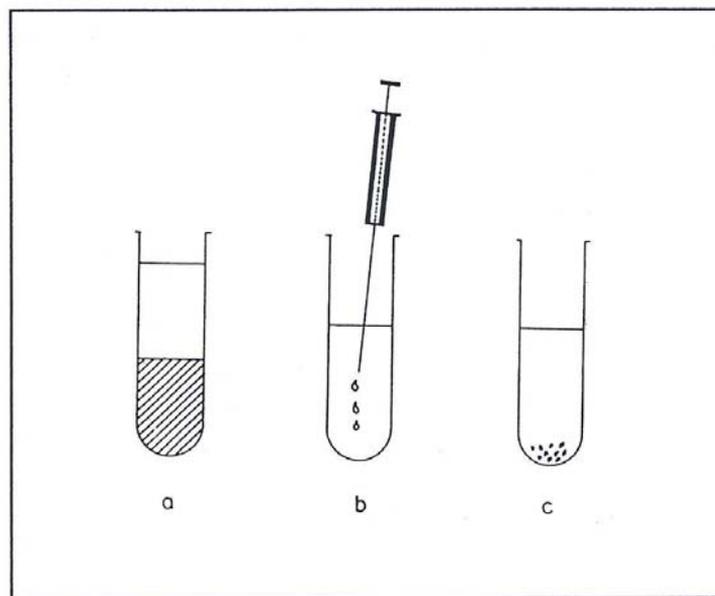


Figura 2.7

Procedimientos de solubilización de biopolímeros en medios micelares hidrocarbonados:

a) Técnica de transferencia de fase; b) Técnica de inyección; c) Técnica de extracción del estado sólido.

2.5.3.-ESTRUCTURA DE MICELAS REVERSAS CONTENIENDO PROTEINAS.

La forma, tamaño y otras propiedades estructurales de las micelas reversas han sido motivo de debate y discusión (Eicke y col., 1976; Rouviere y col., 1979). Eicke y col. demostraron que, admitida su forma esférica, las dimensiones de una micela se pueden

incrementar por aumento de w_0 , aunque la presencia del biopolímero puede hacer que esta situación varíe. Así, para una proteína pequeña solubilizada en el núcleo acuoso, es razonable asumir que la situación no se altera mucho y únicamente debe haber un pequeño incremento en el tamaño total de la micela. Sin embargo la situación puede ser difícil de evaluar para valores de w_0 bajos, donde el núcleo es relativamente pequeño, pudiendo ocurrir alguna de las situaciones que a continuación se describen o bien una combinación de dos o más de estos modelos (Figura 2.8). En el primer caso (Figura 2.8a), la proteína está confinada en el núcleo acuoso y aislada de las cabezas del tensioactivo por una capa de moléculas de agua. En el segundo (2.8b), la solubilización es debida a la acción concertada de varias micelas pequeñas, cuyas superficies lipófilas interaccionan con las regiones hidrofóbicas de la proteína. En el caso (2.8c), las partes lipófilas de la proteína están expuestas directamente al disolvente hidrocarbonado, e/o interaccionan con las cadenas lipófilas de las moléculas de tensioactivo. Finalmente (2.8d), la solubilización puede ocurrir vía interacciones de pares iónicos entre grupos cargados de las cabezas del tensioactivo y zonas ionizadas de las cadenas de la proteína.

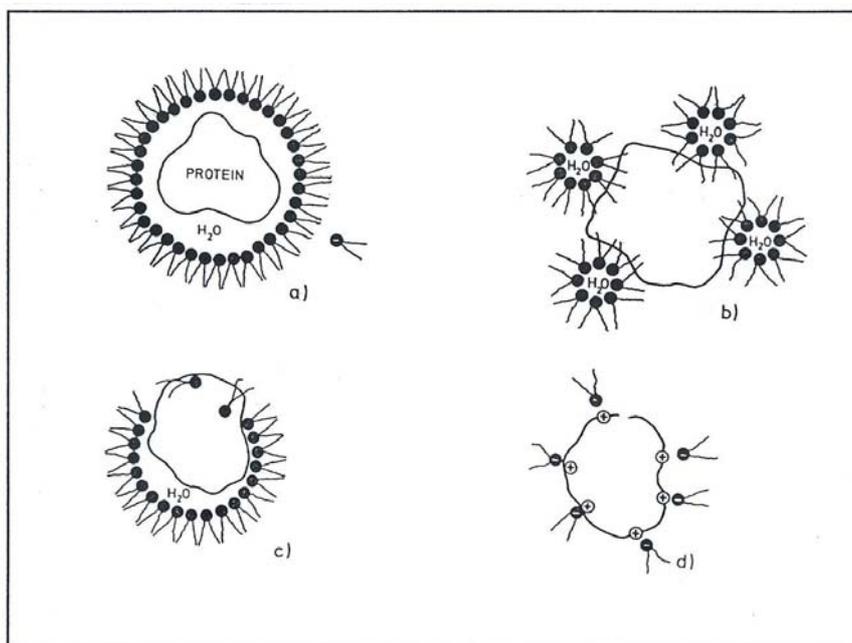


Figura 2.8

Posibles situaciones para un biopolímero solubilizado en una micela inversa:

- a)** proteína rodeada totalmente por agua; **b)** mecanismo de micelas concertadas; **c)** proteína expuesta parcialmente al medio hidrocarbonado y **d)** interacciones de pares iónicos entre el biopolímero y las cabezas ionizadas del tensioactivo.

Para poder determinar cuál de estas situaciones ocurre preferentemente bajo unas determinadas condiciones, hay que hacer uso de técnicas tales como la espectroscopia de fluorescencia (en estado estacionario y resuelta en el tiempo), la espectroscopía uv-visible, el dicroísmo circular, etc.

Luisi y Wolf (1982) teniendo en cuenta todo lo anterior, han desarrollado un modelo por el cual, conociendo las dimensiones de la proteína y la de las micelas no ocupadas (micelas que en su interior sólo tienen agua), se pueden predecir diversos parámetros estructurales y geométricos de micelas reversas de AOT. Algunos de estos parámetros se muestran en la Tabla 2.10.

Tabla 2.10

Parámetros estructurales para micelas reversas conteniendo proteínas (Luisi y Wolf, 1982).

Sistema	W_0	n^b	j^c	$r_0(\text{Å})^d$
RNAasa Isooctano/AOT (0'05M)	5'7	91	521	19'5
RNAasa Isooctano/AOT (0'05M)	11'1	193	2128	26'6
RNAasa Isooctano/AOT (0'05M)	22'3	395	8823	40'6
Lisozima n-octano/AOT (0'05M)	22'5	364	8195	39'9
Lisozima n-octano/AOT (0'05M)	27'4	636	17452	50'6
LADH Isooctano/AOT (0'05M)	46'4	2022	93844	89'6

n^b = número de agregación del tensioactivo.

j^c = número de moléculas de agua en el núcleo acuoso, el cual contiene únicamente una molécula de proteína.

r_0 = radio del núcleo polar de la micela conteniendo proteína. Para obtener el radio total habrá que adicionar 12 Å que es el tamaño de una molécula de AOT.

2.6.-ESTUDIOS DE COLOR.

2.6.1.-EL COLOR.

El color es una percepción que se genera en el cerebro al interpretar las señales nerviosas que le envían los fotorreceptores de la retina del ojo que a su vez interpretan y distinguen las distintas longitudes de onda que captan de la parte visible del espectro electromagnético. Se puede decir que el color no existe por sí mismo, es una percepción relativa.

El fenómeno del color puede ser dividido en dos partes, la primera consiste en el fenómeno puramente físico y requiere tres elementos: una fuente de luz, un objeto y un detector. La interacción de la luz con el objeto puede dar lugar a fenómenos físicos como la refracción, la transmisión, la dispersión, etc. En la segunda ocurren una serie de procesos complicados y no del todo conocidos donde el receptor (el ojo) transmite información al cerebro que lo interpretará como color (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003).

El color depende de la luz y consecuentemente de la fuente de ésta. La luz está compuesta de diferentes longitudes de onda de radiación y la luz visible es el componente más importante en relación a la apreciación del color. La luz visible comprende una parte muy pequeña del espectro electromagnético, con radiaciones de longitudes de onda entre 380 y 750 nm (Figura 2.9). Los colores percibidos por el ojo humano están asociados con la radiación de luz en el siguiente rango de valores: azul-violeta ($380 < \lambda < 480 \text{nm}$), verde ($480 < \lambda < 560 \text{nm}$), amarillo ($560 < \lambda < 590 \text{nm}$), naranja ($590 < \lambda < 630 \text{nm}$) y rojo ($630 < \lambda < 750 \text{nm}$).

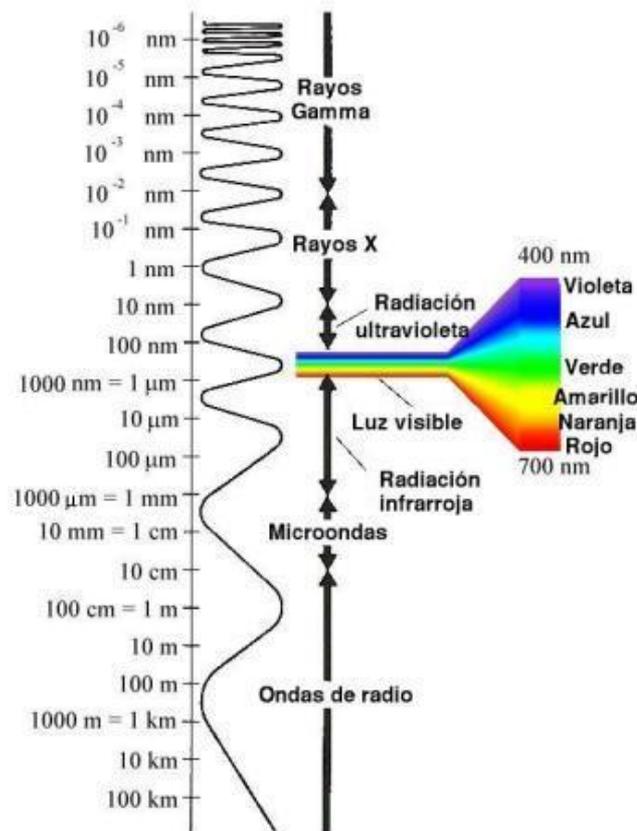


Figura 2.9
Espectro electromagnético.

2.6.1.1.-La medida del color.

Los principales atributos del color de los objetos son el tono, brillo y saturación. El tono es la cualidad que normalmente se identifica con el nombre del color, como rojo, verde o azul. El brillo es un término relacionado con el concepto de luz y oscuridad considerando al color como fuente de luz reflejada. El brillo es la luz reflejada por una superficie en comparación a una superficie blanca bajo condiciones similares de iluminación. La saturación es la claridad o pureza del color. Un color está más saturado cuanto menor sea su contenido de grises o de blancos. También puede ser entendida como la intensidad del tono en comparación a su propio brillo; un color saturado parece claro y brillante mientras que un color insaturado parece pálido. El tono y la saturación son los principales atributos de la cromaticidad.

La evaluación del color por inspección visual es una medida subjetiva que depende de quien realiza la medida. Las aplicaciones prácticas de la medida del color requieren medidas reproducibles, para ello existen numerosas técnicas colorimétricas, entre las que destacan principalmente tres: la primera es una serie de sistemas visuales en la que el objeto de estudio se compara con una serie de estándares visuales. La segunda técnica es un sistema físico en el cual un espectro de reflexión o transmisión se obtiene y se usa directamente o se convierte a un sistema triestímulo. Por último, la tercera técnica se trata de un sistema de colorimetría triestímulo en el que las señales de una muestra por reflexión o transmisión se calculan directamente en unidades referidas a cómo ve el color el ojo humano (Francis, 1995).

La colorimetría es la medida del color con instrumentos fotoeléctricos usando tres (o cuatro) luces coloreadas. Por otro lado métodos espectroscópicos usan luces monocromáticas para iluminar el objeto. La reflectancia espectral del objeto es medida a cada longitud de onda del espectro visible. Todos esos valores son parte de la curva de reflectancia del objeto. Esta curva tiene toda la información necesaria para calcular el color de la muestra para cualquier fuente y cualquier observador. Esta información es usada para generar números que describan el color, por ejemplo las coordenadas de color.

Hoy en día la evaluación instrumental del color está basada en la generalización tricromática. Esta generalización implica que cualquier color puede conseguirse por la combinación de tres colores primarios. Los colores primarios son aquellos que no pueden obtenerse por la mezcla o adición de otros.

El espacio de color CIELAB es una transformación matemática del espacio XYZ en el cual se fija un blanco de referencia y cuyos valores de triestímulo son (X_n, Y_n, Z_n) . Ese blanco de referencia puede ser, por ejemplo una fuente luminosa, el iluminante al que se haya adaptado el observador, un difusor perfecto o el color neutro más reflectante o transmisor de un medio de reproducción. En el sistema CIELAB, los colores deben verse sobre un fondo que vaya de blanco a gris medio por un observador adaptado a un iluminante que no sea demasiado distinto a la luz natural del mediodía. Los tres ejes del sistema CIELAB se indican con los nombres L^* , a^* y b^* , que representan respectivamente la luminosidad, la tonalidad de rojo a verde y la tonalidad de amarillo a azul. Los asteriscos sirven para distinguir el espacio de color CIELAB de otros con nombres similares.

En la Figura 2.10 se muestra el espacio de color CIELAB. Los colores que están en el eje L^* tienen las coordenadas a^* y b^* iguales a 0, son colores acromáticos (blanco, negro y grises). Los valores situados en el eje L^* van de 0 (negro) a 100 (blanco).

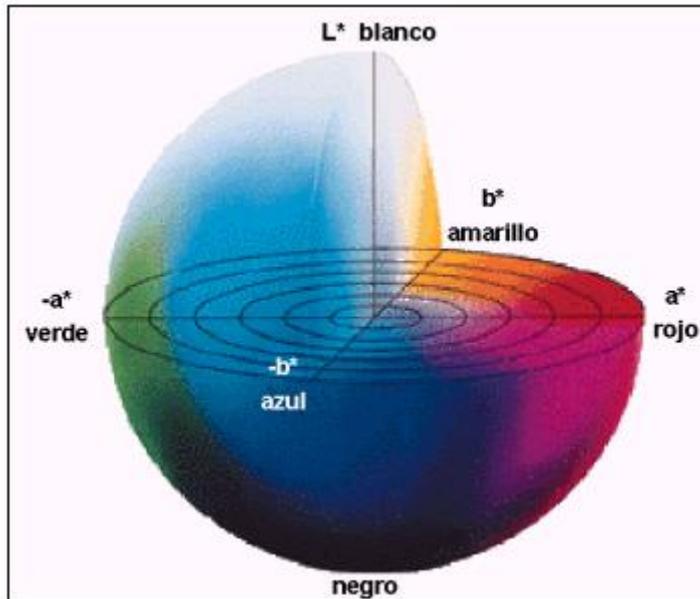


Figura 2.10

Espacio de color CIELAB con las coordenadas L^* , a^* y b^* .

2.6.2.-COLORANTES.

Los colorantes son compuestos capaces de absorber determinadas longitudes de onda del espectro visible y que modifican el color que se percibe de los objetos o dotan de color a objetos no coloreados. Las aplicaciones de los colorantes son muy variadas comprendidas en sectores como la alimentación, cosmética, industria farmacéutica, textil, fibras o plásticos.

2.6.2.1.-Tipos de colorantes.

Los colorantes se clasifican en dos grupos en función de su procedencia: **colorantes naturales**, son los que proceden de organismos vivos o se encuentran en la naturaleza y **colorantes sintéticos** que se obtienen por síntesis química.

Los colorantes sintéticos son abundantes y existen en una amplia gama de colores. Se caracterizan por ser estables, económicos y pueden ser usados en una amplia variedad de aplicaciones. Sin embargo, debido a su naturaleza, pueden ser potencialmente tóxicos y/o carcinogénicos y pueden presentar reacciones alérgicas en individuos susceptibles.

Los colorantes naturales, por el contrario, existen en menor número y la variedad de colores es escasa comparada con la demanda del mercado. Sus costes de producción son relativamente elevados, pero presentan la ventaja de ser biodegradables e inocuos.

En la actualidad, existe una demanda por parte de los consumidores de reemplazar los colorantes sintéticos por colorantes de origen natural en diversos sectores industriales como la alimentación, cosmética y farmacia. Esta demanda viene motivada por la existencia de numerosos estudios que indican la potencial toxicidad de los colorantes sintéticos y por el hecho de que el uso de colorantes naturales no presenta problemas de ese tipo (Bermejo, 2009).

2.6.2.2.-Colorantes en alimentación.

El color es uno de los más importantes atributos de calidad para la aceptación de alimentos por parte del consumidor. La impresión inicial de la calidad y aceptabilidad de un producto alimenticio está basada en su apariencia visual (Wrolstad y col., 2005).

Sin embargo, los necesarios procesos tecnológicos a los que se someten las materias primas alimenticias pueden ocasionar modificaciones o alteraciones del color. Tanto los procesos de elaboración como los métodos de conservación, dan lugar a que los colores naturales de los alimentos sean modificados o deteriorados. Por ello, la industria alimentaria se ha encontrado ante la necesidad de vigilar la inalterabilidad del color de los alimentos que produce, tanto en lo que respecta a su uniformidad como en lo que afecta a su brillo. En la práctica resulta tan importante evitar que aparezcan coloraciones anormales, como mantener un color natural. Así, la industria ha acudido al uso de aditivos como los colorantes para ofrecer el color que considera adecuado para cada alimento.

La práctica de la coloración de alimentos tiene una larga tradición, ya que algunos productos naturales como el azafrán o la cochinilla, eran ya conocidos por las civilizaciones antiguas. Sin embargo esta práctica alcanzó su apogeo con el desarrollo de la industria de los colorantes orgánicos de síntesis en el siglo XIX.

Hoy en día, la mayoría de los países limitan severamente el número de colorantes permitidos así como sus niveles de uso pero no existe uniformidad en las regulaciones de diferentes países (Frick, 2003).

En la Unión Europea, el uso de colorantes en alimentación está regulado por las directivas 94/36/EC, 95/45/EC, 99/75/EC y 2001/50EC, que determinan las sustancias permitidas para la coloración de los alimentos que se permiten colorear así como sus criterios de pureza y niveles máximos permitidos. En total son 43 los colorantes alimentarios permitidos, siendo aproximadamente la mitad de origen sintético y la otra mitad de origen natural.

En la actualidad, motivado por el desarrollo de una nueva normativa sobre aditivos alimentarios (Reglamento 1333/2008) se está revisando la conveniencia del uso de parte de los colorantes alimentarios permitidos por la Unión Europea, debido a la detección de indicios de que pueden ser nocivos para la salud (EFSA, 2009 a-f; 2010, a-j). Los colorantes sometidos a evaluación son en su mayoría de origen sintético.

2.6.2.2.1.-Clasificación y características de los colorantes alimentarios.

Los colorantes alimentarios sintéticos pueden clasificarse en diferentes grupos:

-Azocolorantes: los colorantes más abundantes, estables y más usados dentro del grupo de los sintéticos son los azocolorantes, de los cuales se conocen varios miles. Los azocolorantes se caracterizan por poseer uno o más enlaces azo (-N=N-). Los azocolorantes utilizados en alimentación (normativa europea) son el rojo allura (E129), el amarillo ocaso (E110), la tartracina (E102), la azorrubina (E122), el amaranto (E123), los rojos cochinilla a, 2G y Allura AC (E124, E128 y E129), los azules patente V y brillante FCF (E131 y E133), los marrones FK y HT (E154 y E155) y la litolrubina BK (E180).

Amarillo ocaso (E110): Se utiliza para colorear refrescos de naranja, productos para aperitivo, helados, caramelos, postres, etc.

Tartracina (E102): Es ampliamente utilizado en productos de repostería, conservas vegetales, sopas, helados, caramelos y derivados cárnicos. También se utiliza en bebidas a las que les confiere el color de “limón” y es el aditivo utilizado para colorear paellas.

Azorrubina (E122): Se utiliza en caramelos, helados y postres para conseguir el color de la frambuesa.

Amaranto (E123): Es un colorante rojo cuyo uso tiende a limitarse debido a los resultados de diversos estudios que concluían que podía ser potencialmente nocivo para la salud.

Rojo cochinitilla a (E124): Se utiliza para dar color rosa a los caramelos, productos de pastelería y helados, también para sucedáneos de caviar y derivados cárnicos. A pesar de la semejanza de nombres no tiene relación con la cochinitilla (E120).

Azul patente V (E131): Se utiliza para conseguir tonos verdes en los alimentos al combinarlo con colorantes amarillos como el E102 y el E104. Se usa en conservas vegetales y mermeladas, en pastelería, caramelos y bebidas.

-Quinoleinas: los colorantes de quinoleinas son compuestos orgánicos heterocíclicos formados por la unión de un núcleo derivado del benceno y otro piridínico. Presentan gran estabilidad y el más representativo es el **amarillo de quinoleína (E104)**. El amarillo de quinoleína es una mezcla de varias sustancias químicas muy semejantes entre sí. Se utiliza en bebidas refrescantes de naranja, en bebidas alcohólicas y en elaboración de productos de repostería, conservas vegetales, derivados cárnicos, helados, etc.

-Xantenos: la **eritrosina (E127)** es el único xanteno utilizado como colorante alimentario. Es de color rojo magenta muy brillante. Es poco estable a la luz, muy estable al calor e insoluble a bajo pH. Una característica peculiar es, que incluye en su molécula cuatro átomos de yodo, lo que hace que represente más de la mitad de su peso total. Es el colorante más utilizado en los postres lácteos con aroma de fresa.

-Indigoides: el **carmin indigo (E132)** es el único colorante alimentario dentro del grupo de los indigoides. Presenta limitaciones técnicas ya que su solubilidad en agua es limitada y es inestable en sistemas con alta actividad del agua como bebidas. Se utiliza en confitería, helados y caramelos.

Los colorantes alimentarios naturales utilizados en alimentación son:

-Curcumina (turmerico, E100): De color amarillo brillante y uso universal, procede de la planta *cúrcuma longa* cultivada en La India. Es poco estable a la luz y a las condiciones alcalinas, pero muy estable al calor. Se utiliza como colorante de mostazas, en preparados para sopas, caldos y en algunos productos cárnicos.

-Annato, bixina o norbixina (E160b): Es un carotenoide que procede de las semillas del árbol Annato, cultivado en climas tropicales. El annato es la denominación dada al extracto crudo mientras que la bixina es la parte liposoluble del colorante y la norbixina es la parte hidrosoluble. Presentan colores amarillos dorados y se utilizan para colorear productos lácteos, ya que el calentamiento produce que se aclare su tono amarillo obteniendo un tono adecuado.

-Extracto de pimentón (capsantina, capsorubina, E160c): Procede del pimiento rojo dulce *Capsicum annum*. Es liposoluble y produce formas rojizas y anaranjadas. Son muy importantes en la fabricación de embutidos.

-Mezcla de carotenos (E160ai y β -caroteno E160aii): Son colorantes anaranjados. Las especificaciones de la Unión europea señalan como posibles fuentes para las mezclas de carotenos a plantas, zanahorias, aceites vegetales, hierba, alfalfa y ortiga. Para la extracción del β -caroteno puro, las fuentes son el alga *Dunaliella salina* y procesos de fermentación usando el hongo *Blakslea trispora*.

-Cochinilla (carmín, ácido carmínico, E120): La fuente de este colorante es el insecto femenino cochinilla, insecto parásito de algunas especies de cactus. Estos insectos son muy ricos en este colorante (hasta el 20% de su peso seco) pero también son muy pequeños siendo necesarios 100000 para obtener 1kg de este colorante. El extracto acuoso de cochinilla contiene ácido carmínico, proteínas y pequeñas cantidades de sales. El carmín es el complejo del ácido carmínico con aluminio que presenta gran estabilidad a la luz y al calor. Es probablemente el colorante natural con mejores características tecnológicas, pero se utiliza cada vez menos debido a su alto precio. Se utiliza en conservas vegetales, mermeladas, helados, productos cárnicos, bebidas y productos lácteos.

-Antocianinas (E163): Son un grupo amplio de sustancias naturales formadas por un azúcar unido a la estructura química responsable del color. Son las responsables de muchos de los colores rojos, naranjas, azules y violetas en las plantas. Hay alrededor de 275 conocidas y forman parte del grupo de flavonoides. Son estables al calor y a la luz pero sensibles al pH. Se utilizan relativamente poco, en algunos derivados lácteos, helados, caramelo, productos de pastelería y conservas vegetales

-Rojo de remolacha (betanina, E162): es el extracto acuoso de la raíz de la remolacha roja (*Beta vulgaris*), de color rojizo. Como extracto, es una mezcla compleja no totalmente conocida. Resiste bien las condiciones ácidas pero se altera fácilmente con el calentamiento pasando su color a marrón. Está ganando aceptación ante la demanda del mercado del uso de

colorantes naturales, especialmente en productos de repostería, helados y derivados lácteos dirigidos al público infantil. También se utiliza en conservas de pescado, mermeladas y conservas de vegetales.

-Caramelo (E150): Los colorantes caramelo están disponibles en una variedad de formas que van desde marrón amarillento a rojizo. Están formados por mezclas complejas elaboradas a través del secado en caliente y del quemado de azúcares en presencia de álcalis, amoníaco o sulfuros. Son bastante estables a la luz y al calor. Es el colorante más utilizado en alimentación representando más del 90% del total de todos los añadidos. Es el colorante típico de las bebidas de cola así como de muchas bebidas alcohólicas como ron y coñac. También se utiliza en repostería, en la fabricación de caramelos, cerveza, helados, postres, sopas, conservas y diversos productos cárnicos.

-Clorofilas (E140): Son un grupo de pigmentos presentes en las plantas fotosintéticas responsables del color verde de las hojas y pieza clave en la fotosíntesis. Incluyen un átomo de magnesio en el centro de la molécula. Son inestables al calor, a la luz, al oxígeno y a la acidez. Se utilizan en aceites, chicles, helados, bebidas, sopas y productos lácteos. El reemplazamiento del átomo de magnesio central por un átomo de cobre produce complejos cúpricos de clorofila (E141), cuyo color es mucho más estable.

-Luteína (E161b): Es un pigmento carotenoide amarillo que se encuentra en flores, vegetales, frutas, maíz, en la yema del huevo y en algunas especies de microalgas. Comercialmente se prepara a partir de ortigas, césped y de la especie tagetes. Es parcialmente soluble en agua.

-Licopeno (E160d): Es el carotenoide de cadena abierta que aporta el color rojizo-anaranjado a una gran variedad de frutas. Se extrae comercialmente del tomate y es susceptible a la oxidación, calor, luz y pH extremos por lo que se usan antioxidantes para minimizar la degradación.

-Dióxido de titanio (E171): Es de color blanco brillante y estable a cualquier condición. Se usa para atenuar o matizar algún color presente en el alimento.

-Carbón vegetal (E153): Es producido por la carbonización de material vegetal en condiciones controladas. La principal fuente es la turba. Es de color negro y muy estable. Su uso es limitado debido a su insolubilidad en agua.

-Óxidos de hierro (E172): Las formas más usadas son los óxidos amarillos, rojos y negros. Son muy estables y muy usados en alimentos para mascotas.

Aunque existen aproximadamente igual número de colorantes sintéticos y naturales disponibles como colorantes alimentarios, el menor precio de los sintéticos y el hecho de que los colores amarillos y rojos (predominantes en los sintéticos) sean los más comunes, hacen que el 70% de todos los colorantes usados en alimentación sean colorantes de origen sintético y más concretamente colorantes azoicos (EFSA 2010 k).

3.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

3.1.-MATERIALES.

Se describen a continuación, en apartados sucesivos, los reactivos y la instrumentación empleados.

3.1.1.-REACTIVOS.

- Acetato sódico. Sigma.
- Acetonitrilo. Panreac
- Ácido acético. Panreac.
- Ácido clorhídrico. Panreac.
- Ácido sulfúrico. Panreac.
- Ácido trifluoroacético (TFA). Panreac.
- Acrilamida. Sigma.
- Agua destilada (destilación física).
- Agua ultrapura tipo Milli-Q (procedente de un equipo Millipore).
- Azida sódica. Sigma.
- Azul de bromofenol. Sigma.
- Bisacrilamida (N,N,N',N'-metilen-bis-acrilamida). Sigma.
- Cloruro de guanidinio. Panreac.
- Cloruro sódico. Panreac.
- Coomassie Brilliant Blue. Sigma.
- Dioctilsulfosuccinato (AOT). Sigma.
- Dodecil sulfato sódico (SDS). Fluka.
- Etanol. Probus.
- Fosfato disódico. Panreac.
- Fosfato monopotásico. Panreac.
- Hidróxido sódico. Panreac
- Glicerina. Panreac
- Glicina. Merck.
- Matriz cromatográfica DEAE DE-52. Whatman.
- Matriz cromatográfica Streamline DEAE. GE Healthcare.
- Matriz cromatográfica Sephadex G-100. Pharmacia.
- 2-β-Mercaptoetanol. Sigma.
- Metanol. Probus y Merck uvasol.

- Patrones de pesos moleculares para electroforesis (14400-94000 Da). Pharmacia.
- Persulfato amónico. Panreac.
- Sulfato amónico. Panreac.
- Trizma-Base. Sigma.
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina).Sigma.

3.1.2.-INSTRUMENTACIÓN.

-Espectrofotómetro:

Para la obtención de los espectros uv-visible de las diferentes muestras y sus correspondientes valores de absorbancia, se ha empleado un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo Lambda 20. Las principales características del aparato son: doble haz; posibilidad de hacer medidas de absorbancia, % de Transmitancia; primera, segunda, tercera y cuarta derivadas; margen de longitudes de onda entre 190 y 900 nm; velocidad de exploración comprendida entre 7'5 y 480 nm/min con una precisión en la longitud de onda de $\pm 0'3$ nm; rendijas desde 0'25 a 4 nm; tiempos de respuesta desde 0'2 segundos hasta 10 segundos. Posee control por vía externa a través de ordenador personal con un software UV Data Manager, con opción de acoplarse a una impresora. El sistema óptico consta de un premonocromador con una red holográfica cóncava (660 líneas/mm) y de un monocromador red-filtro en configuración Littrow con red holográfica (1440 líneas/mm). Para las medidas de absorción uv-visible se emplearon células de cuarzo con tapón de teflón de 1 · 1 cm (célula normal) y de 0'2 · 1 cm (microcélula), suministradas por la casa Hellma.

-Espectrofluorímetro:

Para la obtención de los espectros de fluorescencia de estado estacionario, se ha utilizado un espectrofluorímetro Jasco FP-6500. Las principales características del equipo son: lámpara de xenon (150 W); monocromadores compuestos por redes holográficas de 1800 líneas/mm; rango de excitación y emisión de 220 a 750 nm; rendijas de anchuras variables de 1, 3, 5, 10 y 20 nm; 1 nm de resolución; velocidad de barrido comprendida entre 10-20000 nm/min; respuesta comprendida entre 0'01 y 8 segundos; ganancia en el fototubo multiplicador variable (alta, media, baja o manual). Para medidas de polarización de fluorescencia se han utilizado los polarizadores de excitación y emisión FDP-203 de Jasco, convenientemente colocados en las ventanas de excitación y emisión. Además el compartimento de las muestras está equipado de sistema termostatzable para el control de

temperatura con baño externo de recirculación. Posee control por vía externa a través de ordenador personal con un software Jasco Manager, con conexión a impresora. Para las medidas de fluorescencia se emplearon células de cuarzo con tapón de teflón de 1 · 1 cm (célula normal) y de 0'2 · 1 cm (microcélula), suministradas por la casa Hellma.

-Espectrocolorímetro:

Para las medidas de color se ha utilizado un espectrocolorímetro Minolta CM-3500d. El rango de longitud de onda es de 400-700 nm y el rango fotométrico 0-175% con resolución de 0'01%. La fuente de luz es una lámpara de arco de xenón pulsada. La geometría de la medida es d/8 (reflectancia) y d/0 (transmitancia). La repetibilidad es del 0'2%SD para la reflectancia espectral y 0'05 para la cromaticidad. El rango de temperatura y humedad de trabajo es de 0-40°C y menos del 85% de humedad. El software utilizado ha sido SpectraMagic 3.6.1.

-Espectrómetro de masas:

Uno de los procedimientos utilizados para la determinación de la masa de las biliproteínas ha sido la espectrometría de masas utilizando para ello el espectrómetro Q-ToF micromass de Waters, con ionización por electrospray y detector de cuadrupolo y tiempo de vuelo, conectado al software MassLynx.

-Liofilizador:

Se ha utilizado un liofilizador Lyoquest de Telstar para la eliminación del disolvente en las disoluciones de biliproteínas para su almacenamiento. El sistema está compuesto por una bomba de vacío de doble etapa modelo G-6/2G-6 provista de lastre de aire y un sistema frigorífico formado por un compresor hermético y un condensador de acero inoxidable.

-HPLC:

El equipo utilizado para la cromatografía líquida de alta resolución ha sido un Agilent 1100 Series que consta de los siguientes módulos:

-Sistema de bombeo de gradiente cuaternario:

El sistema hidráulico está constituido por una bomba con émbolo dual en serie con motor de émbolo variable servo controlado, émbolos pivotantes y válvula de entrada activa con capacidad de mezcla/gradiente cuaternario a baja presión utilizando una válvula de

partición de alta velocidad. El volumen de retraso varía de 800 a 1100 μ l. El rango de flujo va de 0'001 a 10 ml/min con incrementos de 0'001 ml/min. La precisión de flujo es <0'3 % RSD. La presión varía en un rango de 0 a 40 MPa para flujos menores de 5ml/min y entre 0 y 20MPa hasta 10ml/min. El pulso de presión es menor del 2% de amplitud (a 1ml/min de isopropanol para presiones mayores a 1MPa). El pH puede variar en el rango de 1 a 12'5. El rango de composición seleccionable puede variar de 0-95 % ó de 5-100%. La precisión de la composición es <0'2% SD (a 0'2 y 1 ml/min). El control se lleva a cabo a través de la Chemstation Agilent para HPLC. El sistema realiza un mantenimiento preventivo asistido y registros electrónicos de las tareas de mantenimiento y errores. Sus dimensiones son de 140·345·435 mm y su peso de 11 kg.

-Desgasificador de vacío:

Consta de un contenedor de vacío de 4 canales y una bomba de vacío. El flujo máximo es de 10ml/min por canal y el volumen interno del canal es de 12 ml. Sus dimensiones son 80·345·435 mm y su peso 7'5kg.

-Compartimento termostatzado de columna:

El rango de temperatura va desde 10 grados por debajo de la temperatura ambiente hasta 80°C con una estabilidad de $\pm 0'15^{\circ}\text{C}$ y precisión de $\pm 0'8^{\circ}\text{C}$. Tiene capacidad para 3 columnas de 30 cm. Los volúmenes internos de los intercambiadores derecho e izquierdo son 6 y 3 μ l respectivamente. El tiempo que tarda el sistema en llegar a 40°C desde temperatura ambiente es de 5 minutos y el tiempo de retorno a la temperatura ambiente es de 10 minutos. Sus dimensiones son 140·410·435 mm y su peso 10'2 kg.

-Detector de diodos y de longitud de onda múltiple:

Consta de una matriz de 1024 fotodiodos. La fuente de luz es una lámpara de deuterio para el rango UV y una de wolframio para el rango visible. El rango de longitudes de onda es 190-950 nm con un error de ± 1 nm. La anchura de la ranura es de 1, 2, 4, 8 y 16 nm. La anchura del diodo <1nm. La señal de ruido es de $\pm 1 \cdot 10^{-5}$ UA a 254 y 750 nm. La deriva es de $2 \cdot 10^{-3}$ UA/h a 254 nm. La celda de flujo estándar tiene 13 μ l de volumen, 10 mm de longitud de paso de la celda y 120 bar de presión máxima.

Además, el equipo está formado por el sistema de control, adquisición de datos y evaluación (Agilent Chemstation) y por el sistema de inyección de muestra que está formado por una válvula de inyección serie 7725i de acero inoxidable. La válvula tiene conectado un loop de acero inoxidable intercambiable, habiéndose usado loops de 20 y 1000 μl , con diámetros internos de 0'51 y 0'76 mm respectivamente.

Las columnas cromatográficas utilizadas han sido:

-Zorbax Eclipse XDB-C8 de Agilent, cuyas dimensiones son 150·4'6mm, 5 μm . La fase estacionaria es una densa monocapa de dimetil-n-octilsilano.

-Mediterranea Sea4 de Teknokroma, de dimensiones 250·10'0mm, 5 μm .

-Vydac protein C4 de Grace, de dimensiones 250·4'6mm, 5 μm .

La presión y temperatura máximas de operación para estas columnas son 350 bares y 60°C.

-Centrífugas:

Se han utilizado tres modelos de centrifugas. Centrífuga MEDITRONIC BL-S de SELECTA. Su principal característica es que tiene un rango de velocidad comprendido entre 300 y 18000 rpm. Posee un panel de control compuesto por regulador de velocidad y controlador de tiempo. Se han empleado dos rotores: 7001449 y 7001447 de Selecta fabricados en acero inoxidable y diseñados para alcanzar velocidades máximas de 12000 y 15000 rpm, con capacidad para seis tubos de 60 y 25 ml respectivamente; Centrífuga Selecta Centro-8 con rotor de ángulo fijo y capacidad para ocho tubos de 10 ml de capacidad. Posee control digital de velocidad y tiempo de centrifugación. La velocidad máxima alcanzable es de 5000 rpm. Además, se ha utilizado una microcentrífuga Sprout de Heathrow Scientific con un rotor para tubos eppendorfs de 1'5 ml, cuya velocidad máxima es de 6000 rpm.

-Agitadores:

Para la agitación se ha utilizado un motor agitador-homogenizador Heidolph RZR 1 con velocidad variable entre 35-250 min^{-1} y 280-2200 min^{-1} , dependiendo de la posición operativa seleccionada. Además se ha utilizado un agitador de movimiento horizontal OS10E de Ovan de velocidad variable y 10kg de capacidad.

-Obtención de agua destilada:

Se han utilizado los equipos MERIT W4000-euro (destilación física) y un equipo Milli-Q A10 Gradiente de Millipore para la obtención de agua ultrapura tipo Milli-Q.

-Sonicador:

Se ha utilizado un sonicador Selecta P con generador de 150 W, que produce ondas sonoras de 40 kHz y posee temporizador sincronizado con lámpara de señalización.

-pH-metros:

Las medidas de pH se han realizado con un potenciómetro Crison digilab 517, con un electrodo combinado Crison y también con un Crison GLP 21+ con electrodo fino para medir microvolúmenes de muestra. Para su calibración se han usado tampones de referencia de la misma casa (pH 9, 7 y 4'01).

-Conductímetros:

Para medidas de conductividad se empleó un conductímetro modelo Crison 522, dotado de sonda de compensación de temperatura. Para su calibración se han usado disoluciones de referencia de KCl suministradas por la misma casa (1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y 12'88 mS/cm).

-Viscosímetros:

Se han utilizado viscosímetros Cannon-Fenske Serie 75 (Cannon Instrument Company, 2139 High Tech Road, State College, PA16803), para las medidas de viscosidad de las diferentes muestras a aplicar a las columnas de lecho expandido.

-Equipos de termostación:

Baño termostático Stuart Scientific modelo SBS 30 con bandeja de agitación orbital por inducción electromagnética y baño termostático convencional Memmert dotado con bomba para recirculación externa o interna. Baño de precisión para viscosímetros VB-1423 de Selecta, con cuerpo en vidrio borosilicatado de 20 l de capacidad y regulador electrónico de temperatura desde 25 hasta 100°C. Posee un sensor de temperatura por termoresistencia Pt100 y sistema de agitación. El equipo viene dotado de placa fondo blanca para facilitar la medida utilizando viscosímetros.

-Balanza:

Se ha utilizado una balanza analítica electrónica Cobos modelo A-100-CS, provista de un sistema de calibración interno y externo. La desviación estándar de la misma, es de $\pm 0'1$ mg y el tiempo de respuesta de 3 seg.

-Granatario:

Se ha utilizado un Granatario Scaltec modelo SAC 51 (Genesys Instrumentación) (200 g $\pm 0'01$ g).

-Columnas y accesorios para cromatografía:

Para las experiencias de cromatografía de adsorción en lecho expandido, se han utilizado diferentes columnas de vidrio, de distintas dimensiones:

- 1'5 · 50 cm (Pobel).
- 2'5 · 50 cm (Pobel)
- 2'5 · 100 cm (Streamline)
- 4 · 50 cm (Pobel)
- 6 · 40 cm (Pobel)
- 9 · 40 cm (Pobel)
- 15 · 130 cm (Pobel)

Las conducciones utilizadas han sido de silicona de diferentes diámetros internos de la casa Masterflex (96400-13; 96400-14; 96400-16; 96410-15 y 96410-35). Para las experiencias de cromatografía convencional de exclusión molecular se ha utilizado una columna de vidrio (Pobel) de 90 · 2'5 cm y para intercambio iónico una columna de metacrilato (Pharmacia) de 20 · 2'5 cm.

-Bombas peristálticas:

Se han utilizado diferentes bombas peristálticas para las experiencias de cromatografía. Para realizar las experiencias de cromatografía de adsorción en lecho expandido, se han utilizado las siguientes bombas:

- Bomba peristáltica Heidolph PD-5101 dotada de cabezal intercambiable Heidolph SP-Mini con control de revoluciones y sentido del flujo de fase móvil.
- Bomba peristáltica Selecta PR-2003 que puede trabajar en modo dosificación o de flujo.
- Bomba peristáltica Heidolph 5006.

Para las experiencias de cromatografía convencional en lecho empaquetado, se ha utilizado una bomba peristáltica Minipuls 3 de Gilson, dotada de 4 canales y con control digital de revoluciones y sentido del flujo de fase móvil.

-Colector de fracciones:

Para recoger los eluidos de las columnas se ha utilizado un colector de fracciones de Pharmacia Biotech, con capacidad para 95 tubos de 1'5cm de diámetro y programación automática por tiempo o por gotas.

-Sistema de electroforesis:

El equipo utilizado para la electroforesis es el formado por una cubeta de electroforesis Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad) de desarrollo vertical y con capacidad para analizar 10 muestras diferentes y una fuente de alimentación Power Pack 300 (Bio-Rad) de corriente continua para electroforesis, dotada de reguladores de voltaje y amperaje, así como de temporizador.

-Membranas de diálisis:

Para la diálisis del material biológico se han utilizado membranas de celulosa de 32 mm de ancho (Sigma), de 6'3 mm (Eurolab) y de 21'5 mm (Medicell internacional). El cierre hermético de dichas membranas se ha conseguido mediante pinzas de 8 cm suministradas por Spectrum Medical Industries y de 5 cm suministradas por Mediclip.

-Jeringas:

Las jeringas utilizadas para la inyección de la muestra en HPLC han sido una Hamilton Gastight con capacidad de 1000 μ l y una Agilent de 50 μ l de capacidad. Para la aplicación de muestras proteicas en gel de electroforesis se han usado microjeringas Hamilton (capacidad de 10 μ l).

3.1.3.-MATERIAL BIOLÓGICO.

-Microalgas:

Se han utilizado tres tipos diferentes de microalgas cianofíceas (verdeazuladas) y un alga roja, para la obtención de ficocianinas. Estas han sido: *Anabaena marina*, *Spirulina platensis* y *Synechocystis aquatilis* y el alga roja *Porphyridium cruentum*. Todas ellas han sido cultivadas en fotobiorreactores por el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería y liofilizadas para su transporte (Imagen 3.1).



Imagen 3.1

Biomasa de *Spirulina platensis*.

-Muestras de alimentos y bebidas:

Las muestras alimenticias utilizadas para los ensayos de colorimetría han sido:

-Bebidas isotónicas: de las marcas Powerade (Aquaplus e Ice store (colorante E-133)).

-Licores sin alcohol: licor de manzana marca Mayerling y licores azules de las marcas Dama de Baza (colorante E-142) y Rives (colorante E-142).

-Helados: de la marca Nestlé de nata.

3.2.-MÉTODOS.

3.2.1.-PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES.

Las disoluciones de tampón fosfato pH 7 y de tampón acetato pH 5'5 de diferentes fuerzas iónicas, se prepararon utilizando las cantidades necesarias de cada reactivo calculadas utilizando las ecuaciones de Henderson Haselbach, de Davies y la ecuación para el cálculo de la fuerza iónica (Ecuaciones 3.1 y 3.2 y 3.3)

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

$$\log \gamma = -0'51 \cdot |z| \cdot \left[\left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \right) - 0'3 \cdot I \right] \quad \text{Ecuación 3.2}$$

$$I = \frac{1}{2} (\sum z_i^2 \cdot m_i) \quad \text{Ecuación 3.3}$$

Disoluciones tampón fosfato pH 7

El segundo pK_a del ácido fosfórico es el más cercano a pH 7, $pK_a = 7'097$.



$$K_a = \left(\frac{a_{HPO_4^{2-}} \cdot a_{H^+}}{a_{H_2PO_4^-}} \right)$$

$$\log K_a = \log (a_{H^+}) + \log \left(\frac{a_{HPO_4^{2-}}}{a_{H_2PO_4^-}} \right)$$

$$-\log K_a = -\log (a_{H^+}) - \log \left(\frac{a_{HPO_4^{2-}}}{a_{H_2PO_4^-}} \right)$$

Sustituyendo el valor de $pK_a = 7'097$ y las actividades por su expresión $a = c \cdot \gamma$

(c = concentración y γ = coeficiente de actividad).

$$7'097 = pH - \log \frac{[m_{HPO_4^{2-}}]}{[m_{H_2PO_4^-}]} - \log \frac{[\gamma_{HPO_4^{2-}}]}{[\gamma_{H_2PO_4^-}]}$$

$$7'097 = pH - \log \frac{[m_{HPO_4^{2-}}]}{[m_{H_2PO_4^-}]} - (\log \gamma_{HPO_4^{2-}} - \log \gamma_{H_2PO_4^-})$$

sustituyendo los logaritmos de los coeficientes de actividad por su expresión en la ecuación de Davies (Ecuación 3.2):

$$7.097 = pH - \log \frac{[m_{HPO_4^{2-}}]}{[m_{H_2PO_4^-}]} - \left(\left[-0.51 \cdot |z_{HPO_4^{2-}}| \cdot \left[\left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \right) - 0.3 \cdot I \right] \right] - \left[-0.51 \cdot |z_{H_2PO_4^-}| \cdot \left[\left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \right) - 0.3 \cdot I \right] \right] \right)$$

Sustituyendo los correspondientes valores de carga queda:

$$7.097 = pH - \log \frac{[m_{HPO_4^{2-}}]}{[m_{H_2PO_4^-}]} - \left(\left[-0.51 \cdot 2 \cdot \left[\left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \right) - 0.3 \cdot I \right] \right] - \left[-0.51 \cdot 1 \cdot \left[\left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \right) - 0.3 \cdot I \right] \right] \right)$$

Así, fijando el valor de pH en 7 en la expresión anterior y utilizando el valor de fuerza iónica deseado en cada caso, se obtiene una expresión que relaciona las concentraciones necesarias de fosfato monopotásico y de fosfato disódico (a través de las expresiones $m_{HPO_4^{2-}}$ y $m_{H_2PO_4^-}$):

$$0.097 = -\log \frac{[m_{HPO_4^{2-}}]}{[m_{H_2PO_4^-}]} - \left(\left[-0.51 \cdot 2 \cdot \left[\left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \right) - 0.3 \cdot I \right] \right] - \left[-0.51 \cdot 1 \cdot \left[\left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \right) - 0.3 \cdot I \right] \right] \right) \text{ Ecuación 3.4}$$

Utilizando la expresión de la fuerza iónica (Ecuación 3.3) se obtiene otra relación entre las cantidades necesarias de Na_2HPO_4 y KH_2PO_4 :

$$I = \frac{1}{2} (2^2 \cdot m_{HPO_4^{2-}} + 2 \cdot 1^2 \cdot m_{Na^+} + 1^2 \cdot m_{K^+} + 1^2 \cdot m_{H_2PO_4^-})$$

$$I = m_{KH_2PO_4} + 3 \cdot m_{Na_2HPO_4} \text{ Ecuación 3.5}$$

La combinación de ambas expresiones (Ecuaciones 3.4 y 3.5) nos permite calcular las cantidades necesarias de fosfato monopotásico y de fosfato disódico para preparar un determinado volumen de tampón de pH 7 con una determinada fuerza iónica. De esta forma se realizaron los cálculos de las cantidades necesarias de ambas sales que se muestran en la Tabla 3.1, para preparar disoluciones de tampón fosfato pH 7 de diferentes valores de fuerza iónica.

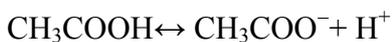
Tabla 3.1

Concentraciones necesarias de reactivos para preparar las disoluciones de tampón fosfato pH 7 con diferentes valores de fuerza iónica.

Fuerza iónica	Fosfato monopotásico (g/l)	Fosfato disódico (g/l)
	Pm= 136 g/mol	Pm= 358 g/mol
0'01	0'37	0'87
0'1	3'34	9'01
0'2	6'46	18'21
0'3	9'54	27'43
0'4	12'70	36'61
0'5	15'91	45'71
0'6	19'23	54'64
0'7	21'66	63'67
0'8	26'25	72'50
0'9	29'89	81'20
1'0	33'70	89'79
1'1	37'87	98'53
1'2	41'79	106'57
1'3	46'07	114'75
1'4	50'52	122'79
1'5	53'18	130'67

Disoluciones de tampón acetato pH 5'5

De igual forma se calcularon las cantidades necesarias de acetato sódico y ácido acético necesarias para preparar las disoluciones de tampón acetato pH 5'5 de diferentes valores de fuerza iónica. El valor del pK_a del ácido acético es 4'7.



$$K_a = \left(\frac{a_{\text{CH}_3\text{COO}^-} \cdot a_{\text{H}^+}}{a_{\text{CH}_3\text{COOH}}} \right)$$

$$\log K_a = \log(a_{\text{H}^+}) + \log\left(\frac{a_{\text{CH}_3\text{COO}^-}}{a_{\text{CH}_3\text{COOH}}}\right)$$

$$-\log K_a = -\log(a_{\text{H}^+}) - \log\left(\frac{a_{\text{CH}_3\text{COO}^-}}{a_{\text{CH}_3\text{COOH}}}\right)$$

Sustituyendo el valor de $pK_a = 4.7$ y las actividades por su expresión $a = c \cdot \gamma$ ($c =$ concentración y $\gamma =$ coeficiente de actividad).

$$4.7 = pH - \log \frac{[m_{CH_3COO^-}]}{[m_{CH_3COOH}]} - \log \frac{[\gamma_{CH_3COO^-}]}{[\gamma_{CH_3COOH}]}$$

$$4.7 = pH - \log \frac{[m_{CH_3COO^-}]}{[m_{CH_3COOH}]} - \left(\log[\gamma_{CH_3COO^-}] - \log[\gamma_{CH_3COOH}] \right)$$

Sustituyendo los logaritmos de los coeficientes de actividad por su expresión en la ecuación de Davies (Ecuación 3.2):

$$4.7 = pH - \log \frac{[m_{CH_3COO^-}]}{[m_{CH_3COOH}]} - \left(\left[-0.51 \cdot |Z_{CH_3COO^-}| \cdot \left[\left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \right) - 0.3 \cdot I \right] \right] - \left[-0.51 \cdot |Z_{CH_3COOH}| \cdot \left[\left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \right) - 0.3 \cdot I \right] \right] \right)$$

Sustituyendo los correspondientes valores de carga queda:

$$4.7 = pH - \log \frac{[m_{CH_3COO^-}]}{[m_{CH_3COOH}]} - \left(\left[-0.51 \cdot 1 \cdot \left[\left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \right) - 0.3 \cdot I \right] \right] - \left[-0.51 \cdot 0 \cdot \left[\left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \right) - 0.3 \cdot I \right] \right] \right)$$

Así, fijando el valor de pH en 5.5 en la expresión anterior y utilizando el valor de fuerza iónica deseado en cada caso, se obtiene una expresión que relaciona las concentraciones necesarias de ácido acético y acetato sódico (a través de las expresiones m_{CH_3COOH} y $m_{CH_3COO^-}$):

$$-0.8 = -\log \frac{[m_{CH_3COO^-}]}{[m_{CH_3COOH}]} - \left(\left[-0.51 \cdot 1 \cdot \left[\left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \right) - 0.3 \cdot I \right] \right] \right) \tag{Ecuación 3.6}$$

Utilizando la expresión de la fuerza iónica (Ecuación 3.3) se obtiene la otra relación necesaria entre las cantidades necesarias de CH_3COOH y CH_3COONa :

$$I = \frac{1}{2} (1^2 \cdot m_{CH_3COO^-} + 1^2 \cdot m_{H^+} + 1^2 \cdot m_{CH_3COO^-} + 1^2 \cdot m_{Na^+})$$

$$I = (m_{CH_3COOH} + m_{CH_3COONa}) \tag{Ecuación 3.7}$$

La combinación de ambas expresiones (Ecuaciones 3.6 y 3.7) nos permite calcular las cantidades necesarias de ácido acético y acetato sódico para preparar un determinado volumen de tampón de pH 5.5 con una determinada fuerza iónica.

Todos los tampones se prepararon añadiendo 0.01% de azida sódica para su correcta conservación.

Para las experiencias de estabilidad frente al pH, las disoluciones tampón se ajustaron a los diferentes valores de pH ensayados, utilizando para ello KOH para los valores de pH básicos y H₃PO₄ para los valores ácidos de pH.

3.2.2.-TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN.

En este apartado se describe el proceso utilizado para la extracción y purificación de ficocianinas (C-PC, APC y R-PC) procedentes de diferentes especies de microalgas. La metodología desarrollada se muestra en la Figura 3.1.

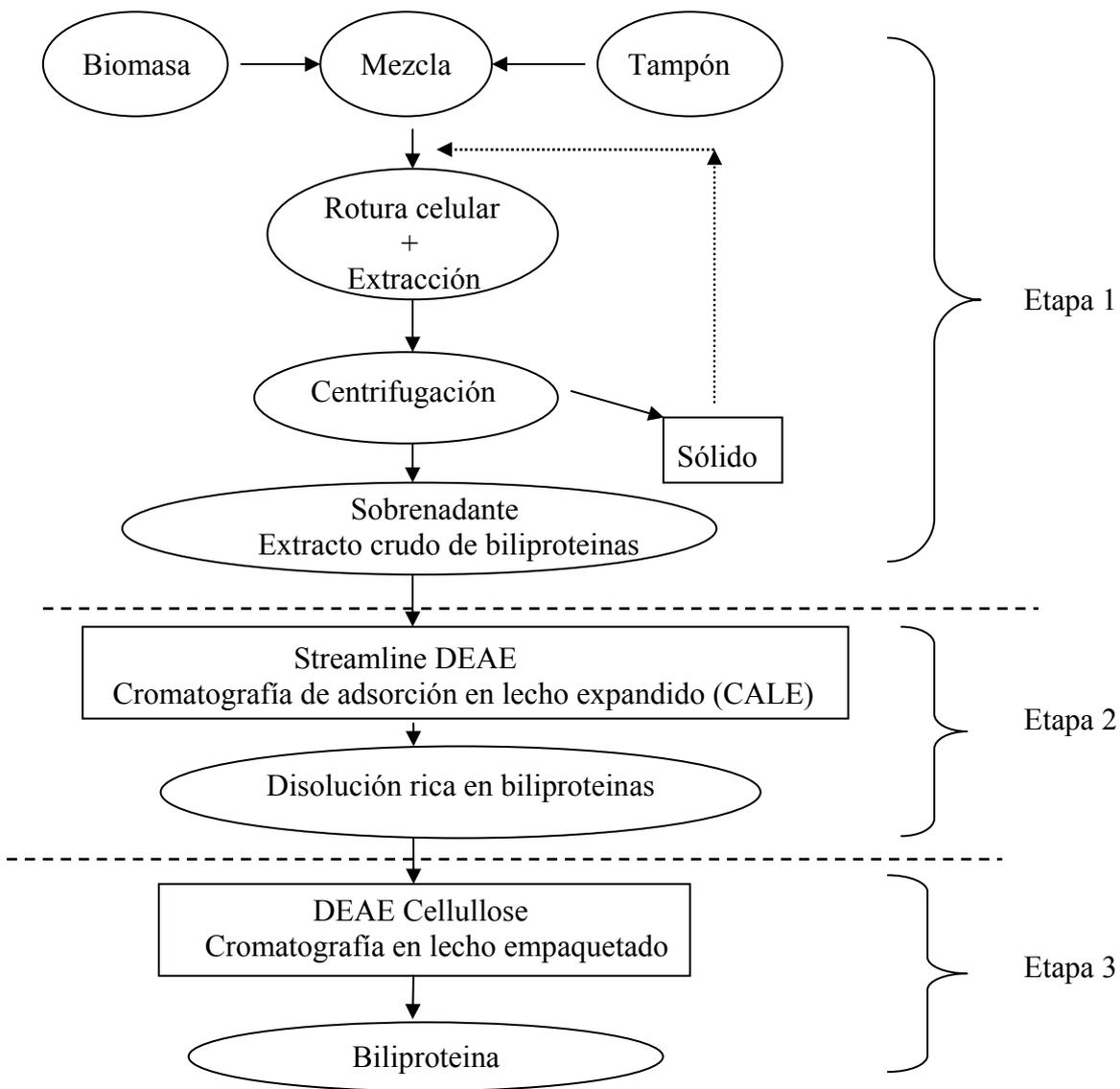


Figura 3.1

Esquema del proceso de extracción y purificación de biliproteínas.

3.2.2.1.-Evaluación del contenido de biliproteínas.

La metodología para la evaluación del contenido total de biliproteínas se realizó pesando 2 gramos de cada especie microalgal liofilizada (5g en el caso de *Spirulina platensis*) y añadiéndoles 40 ml de tampón (diferente para cada especie de microalga) en un tubo de centrífuga. Dicha mezcla se agitó durante 30 minutos con una varilla de vidrio acoplada a un motor agitador-homogenizador (en posición 1) produciéndose así, por choque osmótico, la rotura celular y la extracción del material citoplasmático de la célula. Una vez concluida la agitación, se centrifugó la mezcla a 12000 rpm durante 15 min, obteniéndose un sobrenadante azul y un sólido verdoso para el caso de las algas verde-azuladas y un sobrenadante granate y un sólido marrón oscuro para el caso del alga roja *Porphyridum cruentum*. Se retiró el sobrenadante y se cuantificó por medidas de absorbancia y sobre el resto sólido se añadieron 30 ml de tampón volviéndose a repetir el proceso de nuevo. Se repitió tantas veces como fue necesario para la completa extracción de las biliproteínas, siendo diferente el número de extracciones necesarias para cada especie de microalga. Los tampones utilizados fueron tampón acetato pH 5'5 1M para el alga roja y para las algas verde-azuladas se utilizó tampón acetato pH 5'5 1M y tampón fosfato pH 7 1M. La cuantificación de las biliproteínas se realizó calculando la concentración de biliproteínas en el sobrenadante (mg/ml) y multiplicando por el volumen del mismo. La concentración de biliproteínas se determinó midiendo la absorbancia del sobrenadante de cada extracción a las longitudes de onda características de la absorbancia de cada biliproteína y aplicando las ecuaciones siguientes (Bennett y Bogorad, 1973; Siegelman y Kycia, 1978; Bryant y col., 1979):

$$[\text{C-PC}] = \frac{A_{615} - A_{730} - 0'47(A_{652} - A_{730})}{5'34} \quad (\text{mg/ml}) \quad \text{Ecuación 3.8}$$

$$[\text{APC}] = \frac{A_{652} - A_{730} - 0'208(A_{615} - A_{730})}{5'09} \quad (\text{mg/ml}) \quad \text{Ecuación 3.9}$$

$$[\text{R-PC}] = \frac{A_{620} - 0'7A_{650}}{7'38} \quad (\text{mg/ml}) \quad \text{Ecuación 3.10}$$

$$[\text{BPE}] = \frac{A_{565} - 2'8 \cdot [\text{R-PC}] - 1'34 \cdot [\text{APC}]}{12'7} \quad (\text{mg/ml}) \quad \text{Ecuación 3.11}$$

3.2.2.2.-Tratamientos previos.

3.2.2.2.1.-Optimización del medio de extracción.

La optimización del medio de extracción de las biliproteínas se llevó a cabo realizando una extracción con cada uno de los siguientes medios: agua destilada, tampón acetato pH 5'5 1M y tampón fosfato pH 7 1M. Se estudió con cual de ellos se extraía mayor cantidad de biliproteínas. Las extracciones se llevaron a cabo mezclando 2 gramos de cada biomasa microalgal liofilizada (5g en el caso de *Spirulina platensis*) con 40 ml de tampón en un tubo de centrífuga. Dicha mezcla se agitó durante 30 minutos con una varilla de vidrio acoplada a un motor agitador-homogenizador (en posición 1). Una vez concluida la agitación, se centrifugó la mezcla a 12000 rpm durante 15 min, obteniéndose un sobrenadante azul y un sólido verdoso (para el caso de *Porphyridium cruentum* el sobrenadante es granate y el sólido marrón). Se retiró el sobrenadante y se cuantificó por medidas de absorbancia y sobre el resto sólido se añadieron otros 40 ml de tampón volviéndose a repetir el proceso de nuevo y así hasta llevar a cabo tres extracciones. En el caso de la extracción de las biliproteínas de *Synechocystis aquatilis* sólo se llevaron a cabo dos extracciones ya que con ello se extrae casi el total de las biliproteínas que contiene. En la tercera extracción se añadían sólo 30 ml de medio de extracción por cuestiones de operatividad.

La cuantificación de las biliproteínas se realizó calculando la concentración de biliproteínas en el sobrenadante (mg/ml) y multiplicando por el volumen del mismo. La concentración de biliproteínas se determinó midiendo la absorbancia del sobrenadante de cada extracción a las longitudes de onda características de la absorbancia de cada biliproteína y aplicando las Ecuaciones 3.8 a 3.11.

3.2.2.2.2.-Optimización de la fuerza iónica del medio.

Para optimizar la fuerza iónica del medio utilizado para la extracción de las biliproteínas se operó de igual forma que en los anteriores apartados, ensayando en esta ocasión con los siguientes tampones: fosfato pH 7 de fuerzas iónicas correspondientes a 1000mM, 500 mM, 100 mM y 50 mM para las cianobacterias y tampón pH 5'5 de fuerzas iónicas correspondientes a 1000mM, 500 mM, 100 mM y 50 mM para el alga roja *Porphyridium cruentum*.

3.2.2.2.3.-Optimización de la exposición a ultrasonidos.

Se realizaron experiencias para comprobar si la exposición a ultrasonidos (ondas sonoras con frecuencias mayores de 20000 Hz) mejoraba el rendimiento en la extracción de las biliproteínas. La metodología consistió en pesar 12 gramos de cada tipo de biomasa microalgal y mezclarlos con 240 ml de tampón fosfato pH 7 (50mM) para el caso de las algas verdeazuladas y tampón acetato pH 5'5 50mM para el alga roja. Esta mezcla se sometió a agitación-homogeneización durante 30 minutos y después de la agitación se dividió la mezcla en tubos, sometiéndolos a ultrasonidos en tandas de tres tubos, durante 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos respectivamente. Transcurrido dicho tiempo los tubos se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos y posteriormente se evaluó espectroscópicamente el sobrenadante para cuantificar la cantidad de biliproteínas por aplicación de las Ecuaciones 3.8 a 3.11.

3.2.2.2.4.-Extracción preparativa.

Una vez optimizadas las variables de trabajo para la extracción de las biliproteínas contenidas en la biomasa microalgal, para obtener los extractos de ficocianinas de manera preparativa para su posterior purificación, se operó de la siguiente forma: se mezcló una determinada cantidad de biomasa microalgal liofilizada con un volumen igual a 20 veces la cantidad de biomasa liofilizada (Imagen 3.2).



Imagen 3.2

Extracción de biliproteínas procedentes de *Spirulina platensis* (Etapa 1).

La mezcla se agitó durante 30 minutos y posteriormente se repartió en tubos para su centrifugación (a 12000 rpm durante 15 min) tras la cual se recuperó el sobrenadante rico en ficocianinas y el residuo volvió al proceso hasta completar tres extracciones en total.

3.2.2.3.-**Cromatografía de adsorción en lecho expandido.**

3.2.2.3.1.-Estimación de la capacidad de adsorción.

Antes de iniciar las experiencias en cromatografía de adsorción en lecho expandido, es necesario calcular la capacidad de adsorción proteica del relleno cromatográfico utilizado (Streamline DEAE) en las condiciones óptimas de pH y fuerza iónica para la retención de las biliproteínas de interés. Para ello, se realizaron experiencias en modo estático (isotermas de adsorción) y modo dinámico (curva de ruptura).

Isotermas de adsorción.

Para el cálculo de la capacidad estática de adsorción del relleno se ha utilizado el extracto crudo de ficocianinas procedente de cada especie microalgal, obtenido en los tratamientos previos y además C-PC pura, obtenida con anterioridad por nuestro grupo de investigación (Bermejo y col., 1997; 2006).

Se prepararon dos series de disoluciones conteniendo C-PC de diferentes concentraciones, en el intervalo (0-60 mg/l) en tampón fosfato pH 7 (50mM): una serie partiendo de C-PC pura y la otra utilizando extracto crudo de ficocianinas. Esta serie de disoluciones de extracto crudo se prepararon por triplicado, utilizando una serie por cada una de las especies microalgales ensayadas (*Anabaena marina*, *Spirulina platensis* y *Synechocystis aquatilis*).

En el caso de *Anabaena marina* y *Spirulina platensis* se colocaron en tubos apropiados 5 ml de estas disoluciones y se le añadió a cada tubo 1 ml de relleno Streamline DEAE equilibrado con tampón fosfato pH 7 (50mM). Para *Synechocystis aquatilis* se utilizaron matraces de 10 y 25 ml en los que se ponían 2 y 4 ml de relleno y 3 y 6 ml de disolución respectivamente. Se colocaron todos los tubos o matraces, convenientemente cerrados, en un baño termostático con agitación continua a 25°C y se dejaron transcurrir 24 horas para que se alcanzara el equilibrio. Transcurrido este tiempo, se analizó el contenido de los tubos midiendo espectrofotométricamente la concentración de C-PC en el sobrenadante y

determinando la cantidad de biliproteína en equilibrio enlazada por unidad de volumen (ml) de relleno cromatográfico mediante balance de masa (Figura 3.2).

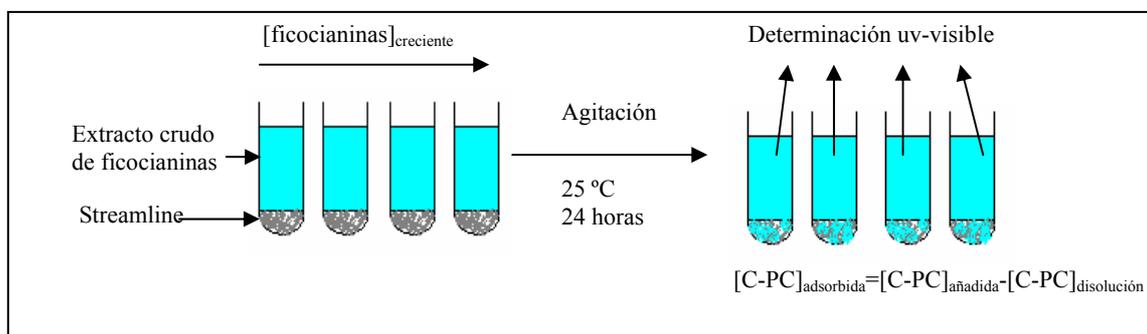


Figura 3.2

Esquema de la determinación de la capacidad estática de adsorción de biliproteínas sobre Streamline DEAE (isoterma de adsorción).

Curva de ruptura.

Las capacidades dinámicas se calcularon a partir del perfil cromatográfico de la curva de ruptura. Para la realización de la curva de ruptura, se preparó un extracto crudo de C-PC con una concentración igual a $0,03\ mg/ml$ para la alimentación de una columna de lecho expandido de $50 \cdot 1,5\ cm$. Se utilizó una altura inicial de lecho sedimentado de $15\ cm$ y un grado de expansión igual a dos. La experiencia se realizó aplicando de manera continua la disolución de proteína al interior de la columna con un caudal de alimentación de $187\ cm \cdot h^{-1}$. La fase móvil que abandona la columna se recoge en fracciones de $34\ ml$, las cuales se analizaron espectroscópicamente para determinar la concentración de C-PC (Imagen 3.3). La curva de ruptura se obtiene representando los valores de C/C_0 frente al volumen eluido de la columna, siendo C la concentración de C-PC eluida de la columna en cada instante y C_0 la concentración del extracto crudo de ficocianinas que alimenta la columna. La experiencia se da por concluida cuando C/C_0 es aproximadamente $\geq 0,4$.



Imagen 3.3

Sistema experimental para la determinación de la capacidad dinámica de adsorción mediante realización de la curva de ruptura. a) Columna CALE; b) Muestra: extracto crudo; c) Bomba peristáltica; d) Colector de fracciones.

3.2.2.3.2.-Cromatografía en columna de lecho expandido.

Se ha utilizado una columna de $50 \cdot 1,5$ cm para la optimización de las variables de operación de CALE y una vez optimizados todos los parámetros, se han utilizado columnas de $50 \cdot 2,5$, $50 \cdot 4$, $40 \cdot 6$, $40 \cdot 9$ y $130 \cdot 15$ cm (altura \cdot diámetro). En el interior de la columna se ha colocado relleno hasta alcanzar una altura de lecho sedimentado de 15 cm (H_0) (45 cm para el caso de la planta piloto). El relleno, convenientemente diluido con tampón fosfato pH 7 (50mM), fue adicionado lentamente en el interior de la columna, para posteriormente ser equilibrado con el mismo tampón hasta que los valores de pH y conductividad del eluido concuerdan con los de la fase móvil de alimentación. El trabajo en CALE consta de cinco etapas: equilibrado de la columna, aplicación de la muestra, lavado, elución y limpieza del sistema (Figura 3.3).

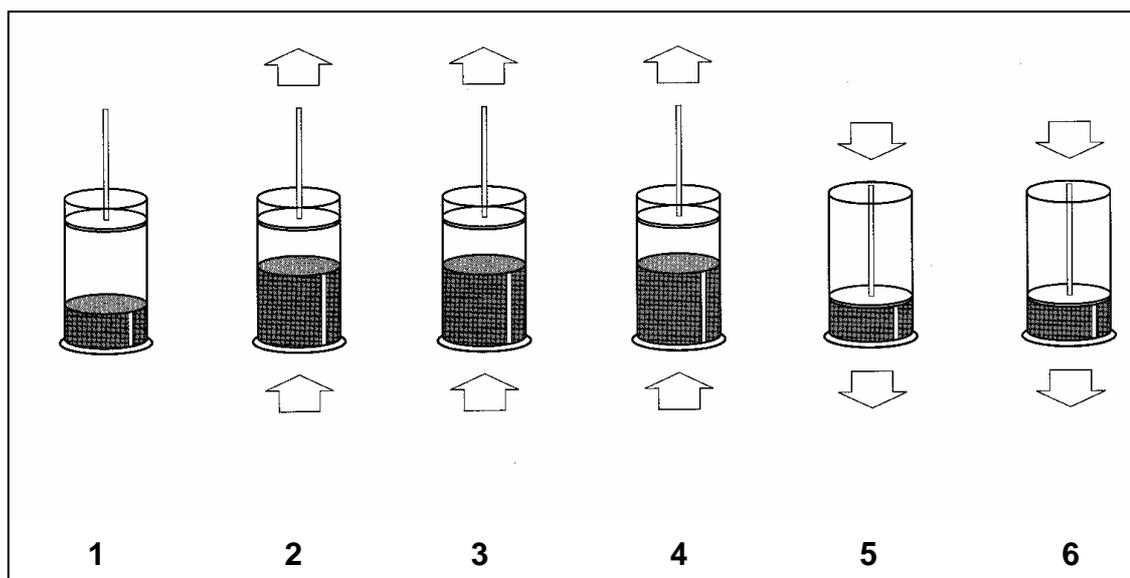


Figura 3.3

Etapas del proceso de CALE: (1) Adsorbente sedimentado; (2) Equilibrado de la columna; (3) Aplicación de la muestra; (4) Lavado; (5) Elución de la muestra; (6) Limpieza del sistema.

Desarrollo del proceso de CALE.

Una vez que se ha montado la columna con el volumen de relleno correspondiente, se procede al equilibrado de la misma bombeando fase móvil (tampón fosfato pH 7 (50mM)). El caudal de entrada ha de ser el que consiga que el lecho expandido alcance la altura deseada (H) y el equilibrado ha de continuar hasta que las propiedades del eluido de la columna sean iguales a las de la fase móvil que entra a la misma. A continuación, se inicia la fase de aplicación, en la que se bombea la muestra con un caudal que mantenga la altura del lecho expandido en el valor correspondiente. Posteriormente se realiza una etapa de lavado, en la cual se bombea nuevamente fase móvil (tampón fosfato pH 7 (50 mM)) con el objetivo de arrastrar los componentes de la muestra que no quedan adsorbidos en el relleno cromatográfico.

Tras la etapa de lavado, con la que termina el modo de trabajo en lecho expandido, se deja de bombear fase móvil permitiendo sedimentar el lecho. A continuación, una vez que el lecho ha retornado a su altura inicial (H_0), se procede a desarrollar la etapa de elución, en la cual se invierte el sentido del flujo y se comienza a pasar la fase móvil de elución (tampón fosfato pH 7 (500 mM)) en sentido descendente.

La muestra eluída constituye un extracto rico en ficocianinas cuya concentración se determina espectrofotométricamente midiendo las absorbancias en los máximos característicos. La experiencia de CALE termina con una etapa de limpieza del sistema, que consiste en hacer pasar por la columna sucesivamente disoluciones de NaOH/NaCl (0'5-1M), agua destilada, ácido acético (25%, v/v) y agua destilada. Para ello se hace pasar de cada una de ellas un volumen igual a tres veces el volumen de lecho sedimentado. De esta forma, la columna queda preparada para una nueva experiencia de CALE que se iniciaría con la etapa de equilibrado.

En la Figura 3.4 se muestra un diagrama esquemático del proceso de cromatografía de adsorción en lecho expandido.

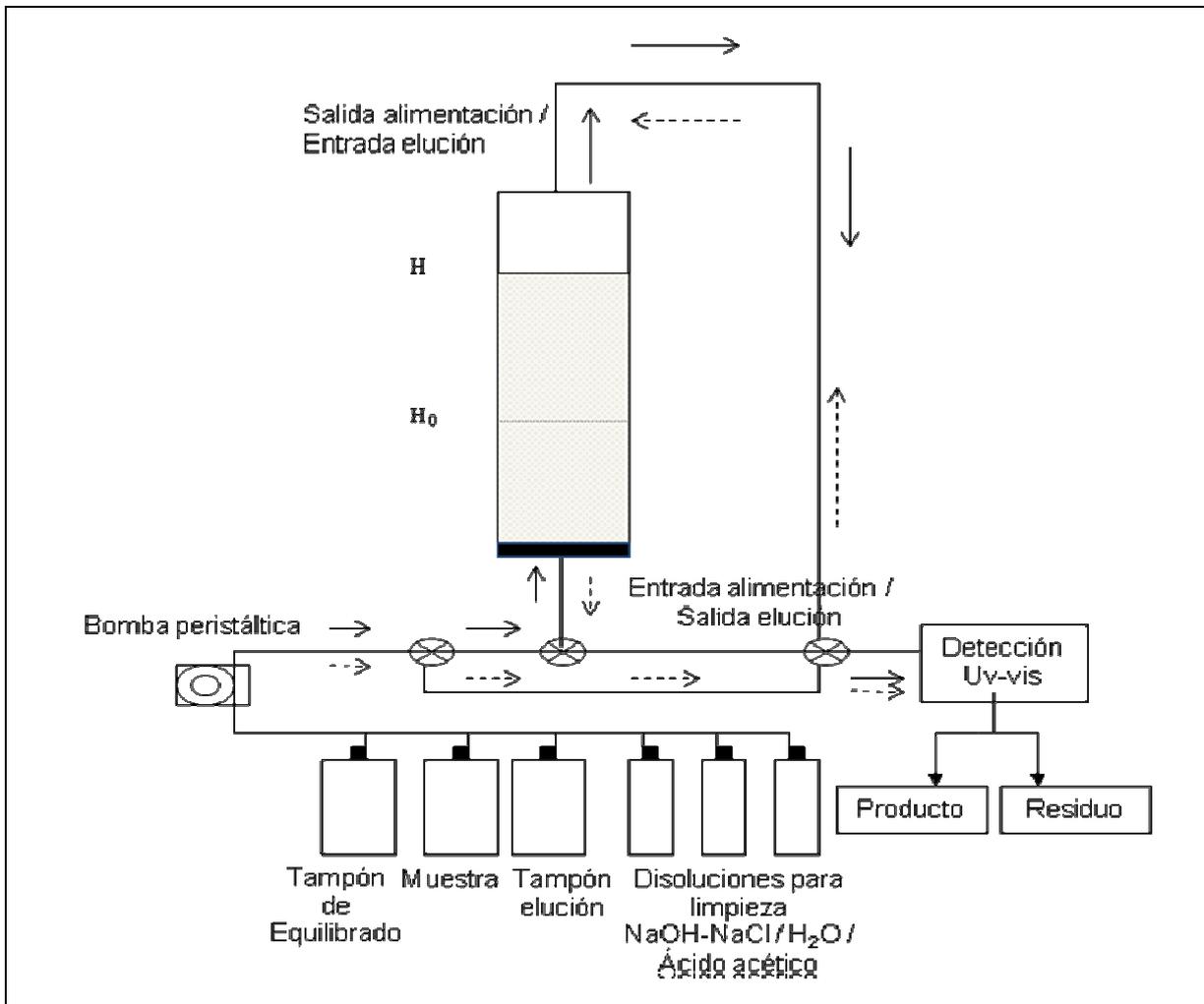


Figura 3.4

Diagrama esquemático del proceso de CALE

Trabajo en formato lecho expandido —————> Fases de equilibrado, aplicación y lavado
 Trabajo en formato lecho empaquetado - - - - -> Fases de elución y limpieza.

Optimización del grado de expansión (H/H_0).

Para la optimización del grado de expansión se trabajó en columna de $50 \cdot 1'5$ cm, con una altura inicial $H_0=15$ cm y por tanto un volumen de relleno de 26'5 ml. Se ha utilizado una capacidad de adsorción (X_m) igual a 0'9 mg C-PC/ml adsorbente para el extracto proveniente de *Anabaena marina*, 0'91 mg/ml para el de *Spirulina platensis* y de 4'9 mg C-PC/ml para el correspondiente a *Synechocystis aquatilis*, obtenidos a través de las correspondientes curvas de ruptura. Los volúmenes de muestra utilizados han sido de 72 ml, 90ml y 87 ml para *Anabaena marina*, *Spirulina platensis* y *Synechocystis aquatilis* respectivamente. Se realizaron experiencias con valores de H/H_0 comprendidos entre 1'8 y 3, que fueron alcanzados utilizando velocidades de flujo de fase móvil comprendidos entre 264 y 614 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$. Tras los diferentes experimentos, se evaluó el rendimiento de recuperación de ficocianinas para cada valor de grado de expansión.

Optimización de la viscosidad de la muestra.

Para la optimización del valor de viscosidad de la muestra, se trabajó igualmente en columna de $50 \cdot 1'5$ cm, con una altura inicial $H_0=15$ cm, volumen de relleno de 26'5 ml y carga proteica igual a la capacidad de adsorción dinámica correspondiente a cada uno de los extractos de las diferentes especies microalgales. Se realizaron experiencias con valores de viscosidad de la muestra comprendidos entre 1'025 y 1'157 mP, obtenidos mediante dilución con tampón fosfato pH 7 (50mM) del extracto crudo procedente de los tratamientos previos de [C-PC] igual a 0'33 mg/ml para el extracto procedente de *Anabaena marina*, 0'3 mg/ml para el correspondiente a *Spirulina platensis* y 1'49 mg/ml para el de *Synechocystis aquatilis*.

Las medidas de viscosidad se realizaron a 25°C usando viscosímetros Cannon-Fenske serie 75 calibrados con agua a esa misma temperatura, utilizando un baño termostático preparado a tal efecto (Imagen 3.4).

Una vez finalizadas las experiencias de CALE, las fracciones seleccionadas espectrofotométricamente, se reúnen y tratan convenientemente (Bermejo y col., 1997; 2006), constituyendo un extracto rico en ficocianinas que será la muestra de partida para la tercera y última etapa de purificación basada en cromatografía de tipo convencional o en lecho empaquetado.

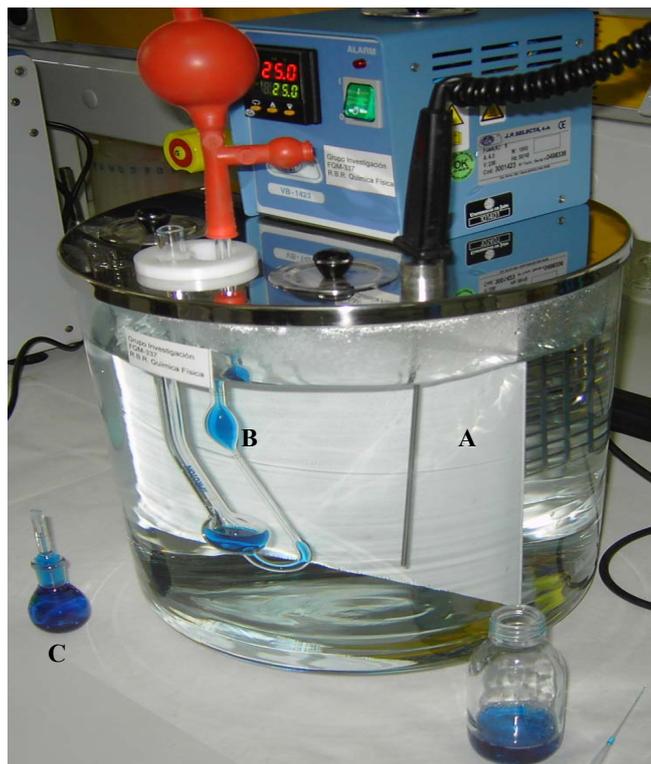


Imagen 3.4

Sistema experimental para determinación de viscosidades: a) Baño termostático; b) Viscosímetro Cannon-Fenske; c) Picnómetro para medida de densidades.

3.2.2.4.-Cromatografía de exclusión molecular.

Para realizar esta etapa cromatográfica se utilizó como fase estacionaria una matriz semirígida porosa constituida por Sephadex G-100, que tiene la capacidad de separar compuestos cuyo peso molecular esté comprendido entre 10000 y 75000 Da aproximadamente. La matriz se adquiere comercialmente en forma de polvo fino y se procedió a su hinchamiento en tampón fosfato pH 7 (100mM) (15-20 ml de tampón por gramo de polvo fino) durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, se sometió la suspensión a desgasificación frente a vacío y posteriormente se adicionó de forma continua en el interior de la columna cromatográfica (90 · 2'5 cm) evitando la formación de burbujas, hasta alcanzar la altura de relleno deseada. Se trabajó a diferentes alturas de relleno, desde 35 cm hasta 60 cm. Posteriormente la columna se equilibró con tampón fosfato pH 7 (50mM). Las muestras enriquecidas en ficocianinas procedentes de lecho expandido, se dializaron frente al mismo tampón y se sometieron a cromatografía en columna empaquetada convencional (Imagen 3.5).



Imagen 3.5

Sistema experimental para cromatografía convencional:

A) Exclusión molecular; B) Intercambio iónico.

Así, se aplicaron a la columna 4 ml de muestra procedente de CALE y con una concentración igual a 0'47 mg C-PC/ml. Se utilizaron velocidades de flujo entre 0'94 y 1'8 ml/min y se recogieron fracciones de 5 ml mediante el colector automático correspondiente, sometiéndolas todas ellas a análisis espectrofotométrico y electroforético.

3.2.2.5.-Cromatografía de intercambio iónico.

Para el desarrollo de este tipo de cromatografía se ha utilizado como fase estacionaria la dietilaminoetil celulosa (celulosa DE-52), que es un intercambiador de tipo aniónico. Los grupos dietilaminoetil, al pH al que presentan carga positiva, interaccionan débilmente con los grupos de las proteínas cargados negativamente. El DE-52 se prepara hidratándolo en tampón fosfato de alta concentración. La preparación de la columna de intercambio iónico DE-52 se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo. La matriz se suministra en forma de polvo aglomerado parcialmente, por lo que se procedió en primer lugar a su hinchamiento en tampón fosfato pH 7 (200mM) durante 72 h. Transcurrido este tiempo, se sometió la suspensión a desgasificación frente a vacío y posteriormente se adicionó de forma continua en el interior de la columna cromatográfica (20 · 2'5 cm), evitando la formación de burbujas,

hasta alcanzar una altura de 15 cm. Finalizado el empaquetamiento, se equilibró la columna haciendo pasar el volumen adecuado de tampón fosfato pH 7 (50mM) (Imagen 3.5).

Las disoluciones enriquecidas en ficocianinas procedentes de CALE, se aplicaron a la columna de intercambio iónico en diferentes experiencias, en las que se varió el volumen de muestra cargado en columna (2-6 ml de concentración en C-PC igual a 0'32 mg/ml). En cada experiencia se realizó un gradiente discontinuo de fuerza iónica a un pH constante e igual a 7, de tal forma que inicialmente se empezaba utilizando como fase móvil tampón fosfato 50mM, posteriormente se utilizaba fase móvil compuesta por tampón 290mM y a continuación se utiliza el mismo tampón pero 400mM (Figura 3.5). Las fracciones de color azul eluidas se recogieron y se analizaron espectroscópicamente y mediante electroforesis tipo SDS-PAGE.

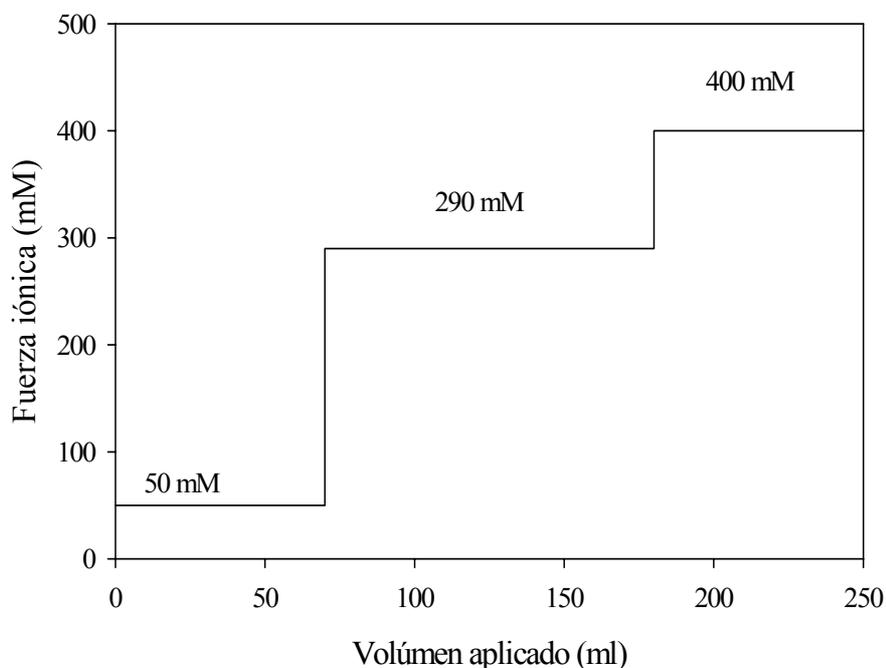


Figura 3.5

Gradiente discontinuo de fuerza iónica utilizado para la purificación de C-PC mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando tampón fosfato pH 7.

3.2.3.-TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS.

3.2.3.1.-Espectroscopía de absorción uv-visible.

Los espectros de absorción uv-visible se han obtenido utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer (Lambda 20). Se han realizado espectros UV-Visible a las fracciones recogidas en las experiencias cromatográficas, siendo necesaria la dilución de la muestra en algunas de las fracciones, debido a su excesiva concentración. Los barridos se hicieron en el rango de 250 a 800 nm a una velocidad de 120 nm/min. Los espectros correspondientes a las experiencias de cromatografía de adsorción en lecho expandido se realizaron utilizando como blanco tampón fosfato pH 7 (50mM) correspondiente a la fase de aplicación de la muestra y lavado y el mismo tampón 500 mM en los correspondientes a la fase de elución de la misma. Los espectros de las fracciones procedentes de cromatografía de exclusión molecular se registraron utilizando como blanco el tampón fosfato pH 7 (50mM). Respecto a los espectros de las fracciones correspondientes a cromatografía de intercambio iónico, se hicieron utilizando como blanco el tampón fosfato de pH 7 y fuerza iónica correspondiente (50mM, 290mM o 400mM). Para las fracciones correspondientes a HPLC, se utilizó como blanco la mezcla de agua-acetonitrilo de porcentaje correspondiente a su tiempo de elución. Para los espectros correspondientes a las ficocianinas solubilizadas en micelas, el blanco consistía en un medio con la misma composición pero sin la inclusión de las ficocianinas. Para los espectros correspondientes a las experiencias donde se utilizó NaClO₄ el blanco utilizado fue tampón fosfato pH 7 50mM al que se le añadió NaClO₄ (1M) y para las experiencias de estabilidad de las ficocianinas frente al pH y la fuerza iónica el blanco utilizado fue el tampón de pH y F.I. correspondiente a cada muestra.

Las cantidades de biliproteínas presentes en las diferentes disoluciones se han calculado mediante medidas de absorbancia, usando las expresiones 3.8 a 3.11 establecidas para corregir los posibles solapamientos espectrales (Benner y Bogorad, 1973; Siegelman y Kycia, 1978; Bryant y col., 1979).

3.2.3.2.-Espectroscopía de fluorescencia.

Fluorescencia de estado estacionario.

Los espectros de fluorescencia en estado estacionario se han obtenido utilizando un espectrofluorímetro Jasco FP-6500. Los registros se han realizado en condiciones de sensibilidad media y velocidad de barrido igual a 200 nm/min. En cada caso se eligieron las longitudes de onda de excitación, rendijas (excitación y emisión) y rango de emisión adecuados, aunque en general, para las muestras de C-PC se excitó a 560 nm recogiendo la emisión entre 580 y 700 nm y para el caso de APC y R-PC se excitó en 590nm y la emisión se recogió entre 620 y 700nm. Los espectros en general, se han registrado a temperatura constante e igual a 25°C. Para el estudio de la estabilidad de las ficocianinas frente a la temperatura, se varió la temperatura entre 25°C y 70°C obteniéndola mediante circulación de agua impulsada por un baño externo termostatzado de precisión (Imagen 3.6). Las células de cuarzo empleadas se describen en el apartado de material correspondiente.



Imagen 3.6

Espectrofluorímetro de estado estacionario y baño con recirculación externa para termostatzación del compartimento de muestra.

Polarización de fluorescencia.

Si se excita con luz polarizada un conjunto de moléculas fluorescentes que forman una disolución isotrópica, la emisión resultante también está polarizada. La magnitud de la polarización va a depender de aquellos factores que afectan a los movimientos de reorientación de la molécula (en la escala del nanosegundo), así como del ángulo que forman los momentos de transición del cromóforo absorbente y del cromóforo emisor.

Un haz de luz polarizada verticalmente (paralela al eje z) se hace incidir sobre una disolución isotrópica de moléculas y la emisión se analiza con un polarizador. Cuando éste se orienta paralelo a la dirección de polarización de excitación, la intensidad observada es I_{\parallel} , mientras que cuando se orienta perpendicular, la intensidad detectada es I_{\perp} . El grado de polarización de la emisión puede cuantificarse mediante dos parámetros:

a) Polarización de fluorescencia (**P**), definida como la fracción de luz linealmente polarizada.

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad \text{Ecuación 3.12}$$

b) Anisotropía de fluorescencia (**A**) definida como el exceso de intensidad que es paralelo al eje de polarización, dividido por la intensidad total:

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad \text{Ecuación 3.13}$$

Polarización y anisotropía se relacionan entre si según las expresiones:

$$P = \frac{3A}{2 + A} \quad \text{Ecuación 3.14}$$

$$A = \frac{2P}{3 - P} \quad \text{Ecuación 3.15}$$

Los valores extremos de anisotropía varían entre $-0'2 \leq A \leq 0'4$ y los de polarización entre $-0'33 \leq P \leq 0'5$. Hoy día el parámetro polarización ha sido totalmente desplazado por el de anisotropía ya que éste es un parámetro aditivo.

Los espectros de polarización son representaciones de la anisotropía (o de la polarización) de fluorescencia frente a la longitud de onda de excitación. Generalmente la polarización es independiente de la longitud de onda de emisión, ya que ésta se produce casi siempre desde el estado excitado de menor energía.

Para realizar las medidas de polarización, únicamente es necesario incorporar polarizadores en los canales de excitación y de emisión del espectrofluorímetro (Imagen 3.7). La geometría utilizada en nuestras medidas es la configuración en L, que utiliza un solo canal de emisión. Esta geometría permite fácilmente restar la contribución de la luz dispersa a la medida de la anisotropía, aunque de forma secuencial.



Imagen 3.7

Detalle de los polarizadores de excitación y de emisión que se utilizan para las medidas de polarización de fluorescencia.

Previo a las medidas de anisotropía es necesario calcular el factor G, el cual es un factor de corrección debido a que el conjunto del monocromador de emisión, fotomultiplicador y óptica asociada, no detecta con la misma eficiencia la luz polarizada vertical y horizontalmente, ya que los monocromadores polarizan parcialmente la luz incidente. El factor G es la relación de sensibilidades del sistema de detección (canal de emisión) para la luz polarizada vertical y horizontalmente y resulta función de la longitud de onda de detección. Se calcula mediante la siguiente expresión:

$$G = \frac{S_V}{S_H} = \frac{S_V}{S_H} \cdot \frac{I_{II}}{I_{\perp}} = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad \text{Ecuación 3.16}$$

donde los subíndices de I_{HV} e I_{HH} indican la orientación de los polarizadores de excitación y emisión respectivamente. Según lo anterior la anisotropía vendrá dada por:

$$A = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad \text{Ecuación 3.17}$$

La magnitud de la anisotropía va a depender de aquellos factores que afectan a los movimientos de reorientación de la molécula en la escala de tiempo del nanosegundo como son la temperatura y viscosidad del disolvente por un lado y el tamaño y forma de la molécula rotante por otro. La dependencia de la polarización de la luz emitida con el tamaño de la molécula rotante, permite el uso de las medidas de anisotropía de fluorescencia en estudios de interacciones macromoleculares y de diferentes grados de agregación en biopolímeros, ya que los grandes complejos moleculares rotarán lentamente y durante el tiempo de vida del estado excitado despolarizan la luz emitida en menor extensión que aquellos complejos más pequeños que gozan de mayor movilidad.

3.2.3.3.-Espectrocolorimetría.

Para realizar las medidas en el espacio del color, en primer lugar, fue necesario calibrar el instrumento. Puesto que las medidas se realizaron por transmitancia, se utilizó una placa negra, opaca, para calibrar el cero (respecto al parámetro L) y agua destilada en el interior de una cubeta transparente para calibrar el 100. A continuación, se puede proceder a la medida de los parámetros de color para las muestras deseadas. Para ello, se colocaron 12 ml

de muestra en una cubeta transparente de cuarzo con unas dimensiones de $4'2 \cdot 3'2 \cdot 1'0$ cm (altura · anchura · paso de luz). El equipo proporciona de forma inmediata los parámetros L^* , a^* , b^* , C^* y h^* correspondientes a la muestra, además de la diferencia de color de dicha muestra con respecto al estándar empleado (ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔC^* , Δh^* y ΔE^*_{ab}).

Se utilizaron distintos tipos de matrices con el objetivo de alcanzar el color de diferentes productos comerciales y observar la tinción de cada muestra a través de la adición de cantidades crecientes de extractos de biliproteínas obtenidos a partir de biomasa de las cianobacterias *Anabaena marina*, *Spirulina platensis* y *Synechocystis aquatilis*. Como estándar en cada caso se utilizó uno de los productos comerciales coloreados, siendo la matriz un producto con los mismos ingredientes que los comerciales coloreados pero sin la presencia de dichos colorantes.

Los productos comerciales analizados fueron: bebida isotónica Powerade y licores sin alcohol Dama de Baza y Tropic de Rives. Las matrices empleadas fueron: bebida isotónica, licor sin alcohol y helado.

En cuanto a la preparación de las muestras líquidas, se pipetearon $11'9$ ml de matriz y se fue añadiendo el extracto de biliproteínas. En el caso de las muestras semisólidas (helado), se pesaron 15 g de matriz y, de igual modo, se fue añadiendo el colorante natural bajo agitación continua hasta completa homogeneización.

3.2.3.4.-Espectrometría de masas.

Para la obtención de los espectros de masas de las ficocianinas, inicialmente fue necesario calibrar el instrumento utilizando apomioglobina. El flujo del electrospray utilizado fue de $20 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El potencial del capilar fue 3000 V y las temperaturas de la fuente y de desolvatación 80°C y 200°C respectivamente. El rango de masa/carga registrado comprendía desde 300 hasta 2000. La muestra se preparaba reconstituyendo la proteína liofilizada con un determinado volumen de disolución agua:acetonitrilo (50%) adicionada de ácido fórmico al 1%.

3.2.4.-ELECTROFORESIS.

3.2.4.1.-Principio del método.

Se ha utilizado la técnica de electroforesis SDS-PAGE para comprobar el grado de pureza en ficocianinas alcanzado en cada etapa del proceso de purificación y el peso molecular de las mismas.

Se denomina electroforesis al transporte de una partícula cargada (una proteína en nuestro caso) debida a la acción de un campo eléctrico. Si una partícula de carga q en un medio se somete a la acción de un campo eléctrico, E , alcanzará una velocidad estacionaria v , que vendrá dada por el balance entre la fuerza que sobre la misma origina el campo, $E \cdot q$, y el rozamiento viscoso, $f \cdot v$, donde f es el coeficiente de rozamiento. Se define entonces la movilidad m como la velocidad por unidad de campo eléctrico:

$$m = \frac{v}{E} = \frac{q}{f} \quad \text{Ecuación 3.18}$$

Esta movilidad resulta retardada por las interacciones con la matriz tridimensional constituida por un gel, que evita la aparición de corrientes de convección en el movimiento de las macromoléculas contribuyendo a que el tamaño de las mismas sea un factor determinante en la separación, conjuntamente con la carga. La variable experimental que se obtiene es una movilidad relativa, m' , que se define como el cociente entre la distancia recorrida en el gel por la proteína y la distancia, siempre mayor, recorrida por una sustancia de bajo peso molecular que se utiliza como referencia. Durante la preparación de la muestra las proteínas se tratan en caliente con SDS, dotando de carga negativa a los complejos resultantes. El tratamiento paralelo con un agente reductor como el 2- β -mercaptoetanol favorece la desnaturalización proteica en sus subunidades estructurales. La movilidad de los complejos resultantes queda así exclusivamente relacionada con su peso molecular.

Las electroforesis realizadas, se han basado en el método de Laemmli, utilizando la técnica de electroforesis discontinua, que consiste en dos geles contiguos pero distintos, abajo un gel separador y encima un gel apilador. Los dos geles y el tampón de desarrollo están preparados con diferentes porosidades, pH y fuerza iónica (Figura 3.6) (Laemmli, 1970).

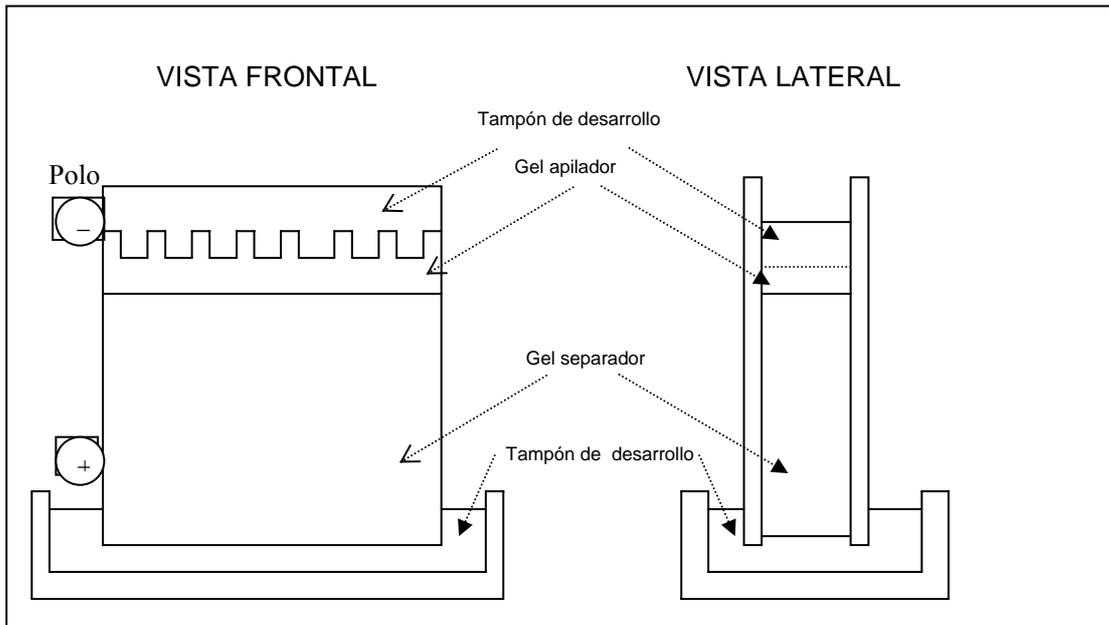


Figura 3.6

Vistas lateral y frontal de un montaje de electroforesis en lámina vertical. El paso de corriente eléctrica a través del gel desde el polo negativo (arriba) hacia el polo positivo (abajo) obliga a las proteínas a recorrerlo en este sentido, separándose unas de otras según su mayor o menor dificultad para penetrar por el entramado del gel separador.

La mayoría de las electroforesis se realizan en placas o en cámaras verticales formadas entre dos cristales. Este formato proporciona uniformidad y las diferentes muestras pueden ser comparadas en el mismo gel (Imagen 3.8).

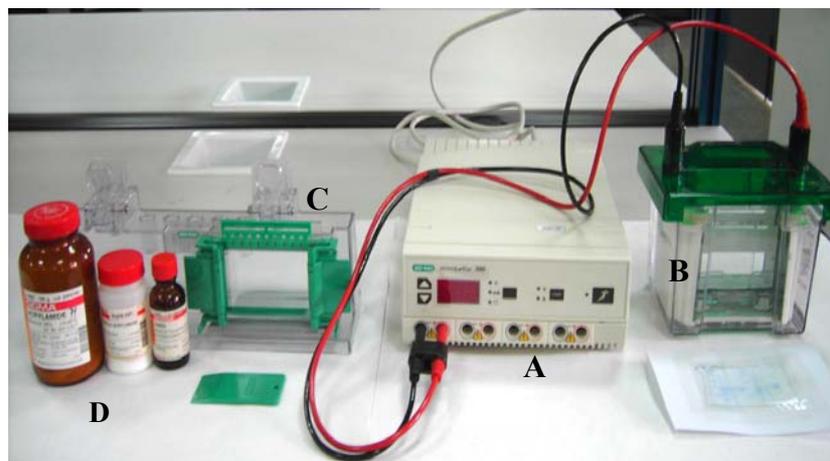


Imagen 3.8

Sistema experimental para el desarrollo de electroforesis SDS-PAGE: a) Fuente de alimentación; b) Cubeta de desarrollo de geles; c) Soporte para formación de geles; d) Reactivos.

3.2.4.2.-Composición y preparación de los geles de poliacrilamida.

Los geles de poliacrilamida están formados por la copolimerización del monómero acrilamida con el monómero N,N'-metilen-bis-acrilamida (bisacrilamida). El mecanismo de formación del gel es una vinil adición, polimerización catalizada por un sistema generador de radicales libres compuesto de un iniciador (persulfato amónico) y de un acelerador (TEMED). Este último causa la formación de radicales libres de persulfato que son los que catalizan la polimerización. El oxígeno interfiere en la polimerización por lo que es necesaria la desgasificación de las disoluciones de acrilamida para conseguir una formación de geles reproducibles (Deutscher, 1990).

Las propiedades del gel vienen dadas por el entramado tridimensional de fibras y poros que se forma al polimerizar acrilamida con bisacrilamida. Al aumentar la concentración de acrilamida el tamaño del poro efectivo disminuye.

El uso de reactivos de alta calidad es un requisito indispensable para geles reproducibles y de alta resolución. En la preparación de los geles utilizados en la electroforesis, se necesitan las siguientes disoluciones:

Disolución A: Acrilamida al 29'2% (p/v) y N,N'-metilen-bisacrilamida al 0'8%. Esta disolución se filtra y se guarda a 4°C en oscuridad durante no más de un mes.

Disolución B: Tampón Tris-HCl, pH 8'8 (1'5M). Se almacena a 4°C.

Disolución C: Tampón Tris-HCl pH 6'8 (0'5M). Se almacena a 4°C.

Disolución D: SDS al 10%.

Disolución E: Tampón de disolución de la muestra. Se guarda a temperatura ambiente y se compone de: Tris-HCl pH 6'8 (0'06M), 2% SDS, 4'5% 2-βmercaptoetanol, 10% de glicerol y 0'025% azul de bromofenol (0'05% p/v).

Disolución F: Tampón de desarrollo de pH= 8'3 (0'025 M Tris base, 0'192 M glicina, 0'1% SDS p/v). No hay que ajustar el pH, únicamente comprobar que tras la mezcla de los reactivos el pH se encuentra en el intervalo $8'3 \pm 0'2$. Para cada desarrollo se diluyen los 200 ml de disolución así preparada con 800 ml de agua destilada.

Disolución de persulfato amónico al 10%. Hay que prepararlo extemporáneamente.

TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina). Se usa sin diluir. Se guarda en frío y protegido de la luz.

Las disoluciones A, C y D se desgasifican antes de preparar los geles separador y apilador.

En la Tabla 3.2 figuran las cantidades de las disoluciones que se deben utilizar para preparar 10 ml del gel separador de distinto porcentaje de entrecruzamiento.

Tabla 3.2
Composición del gel separador según % entrecruzamiento.

% ACRILAMIDA (Entrecruzamiento)	8 %	10 %	12'5%	15 %
Disolución A (ml)	2'74	3'40	4'12	5'10
Disolución B (ml)	2'50	2'50	2'50	2'50
Disolución D (ml)	0'10	0'10	0'10	0'10
H ₂ O (ml)	4'66	4'00	3'28	2'30
S ₂ O ₈ (NH ₄) ₂ (ml)	0'05	0'05	0'05	0'05
TEMED (ml)	0'001	0'001	0'001	0'001

La técnica empleada ha sido la de electroforesis en lámina, en la que el gel se prepara entre dos placas de vidrio paralelas y separadas por espaciadores de 1 mm de espesor. Esto supone algunas ventajas con respecto a los geles formados en tubos, ya que al desarrollarse todas las muestras en el mismo gel, la comparación entre ellas es más fácil y precisa, además para un mismo número de muestras se consumen menos reactivos. El TEMED que inicia la reacción de polimerización, se añade justo antes de introducir la disolución de acrilamida entre las placas en posición vertical. Las placas se llenan hasta una altura conveniente de gel separador, a continuación se añade un poco de agua por encima para evitar la formación de un menisco en el frente del gel, el final de la polimerización se observa por la aparición de una interfase entre el gel separador y el agua que se añade tras éste.

A continuación se prepara el gel apilador, siempre con un grado de entrecruzamiento igual al 4%. Para unos 5 ml de gel son necesarias las siguientes cantidades:

Disolución A: 0'65 ml

Disolución C: 1'25 ml

Disolución D: 0'05 ml

Agua Destilada: 3'05 ml

Persulfato Amónico (10%): 0'025 ml

TEMED: 0'01 ml

Antes de adicionar el gel apilador, se retira el agua situada sobre el gel separador mediante la utilización de papel de filtro. Se añade persulfato amónico y TEMED al resto de los reactivos y la disolución resultante se agrega sobre el gel separador. A continuación se coloca un peine para formar las calles donde luego se depositarán las muestras de proteínas.

3.2.4.3.-Preparación de la muestra y desarrollo de la electroforesis.

La muestra se diluye como mínimo con un volumen igual de disolución E, aunque se pueden usar mayores diluciones. La elección de la dilución se hace de forma que se aplique al gel no más de 50µl, pero que éstos contengan al menos unos 30µg de proteína. Esto viene motivado porque la tinción con Coomassie Brilliant Blue, que se emplea para teñir los geles, tiene un límite de detección del orden de 1µg. Las muestras diluidas se ponen en contacto con agua caliente a 95°C durante cuatro minutos.

Una vez preparadas las muestras, se introducen en las calles del gel apilador mediante una microjeringa. Mientras la muestra atraviesa el gel apilador se aplica un determinado voltaje entre el polo positivo (abajo) y el negativo (arriba) y cuando las proteínas han pasado al gel separador se aumenta el voltaje.

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñen durante aproximadamente 30 min, con una disolución de Coomassie Brilliant Blue al 0'1% (p/v), metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 7% (v/v). El Coomassie Brilliant Blue se fija en las proteínas coloreándolas de azul. Además el colorante penetra en el entramado del gel por lo que las bandas de proteína permanecen todavía indistinguibles. Para desteñir el gel se utiliza una disolución de metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 7% (v/v), renovándola varias veces hasta la completa desaparición del color azul en la matriz, con la excepción de las bandas de proteína.

Seguidamente el gel seca con una disolución de metanol al 40% y glicerol al 10%. Para la conservación de los geles secos, se toma un vidrio y por su cara lisa se humedece, se

coloca papel celofán también mojado y se sitúa encima de éste el gel con las proteínas. Sobre la otra superficie del gel se pone otro trozo de papel celofán igualmente humedecido. Se pinza tirante procurando eliminar las burbujas de aire y se deja secar, quedando plastificado el gel por ambas caras.

Acompañando a las muestras proteicas que queremos estudiar y para observar el avance en la purificación, se introducen unos patrones de pesos moleculares bien conocidos. El desarrollo de la electroforesis conduce a la obtención de diversas bandas en el gel que corresponden a estos patrones y a las muestras proteicas problema. En la muestra de patrones de peso molecular suelen ir macromoléculas que poseen un rango amplio de pesos moleculares dentro del cual deben encontrarse los de las proteínas problema. Los patrones empleados contienen una mezcla de las siguientes macromoléculas: α -lactoalbúmina (14400 Da), tripsina (20100 Da), anhidrasa carbónica (30000 Da), ovoalbúmina (43000 Da), albúmina (67000 Da) y fosforilasa (94000 Da), lo que permite estimar el peso molecular de las distintas bandas que aparecen en las calles donde se han aplicado las disoluciones de biliproteínas procedentes de las distintas etapas de purificación.

3.2.5.-SOLUBILIZACIÓN DE PROTEINAS EN MEDIOS HIDROCARBONADOS.

En esta sección se describe el procedimiento seguido para la solubilización de las distintas ficocianinas purificadas, en microemulsiones de tipo micelar constituidas por el sistema AOT/agua/isooctano.

En todas las experiencias realizadas la razón entre moléculas de proteína y n° de micelas, “s”, ha sido $\leq 0,1$. Por aplicación de la estadística de Poisson, esto implica una probabilidad de al menos el 90% de micelas sin proteína y un 9% de micelas que contienen una sólo molécula de proteína, siendo prácticamente nula la probabilidad de que existan micelas con más de una molécula (Tabla 3.3). De esta forma los resultados derivados de estas experiencias no deben estar afectados por las posibles interacciones entre moléculas de proteína que compartan el interior acuoso del sistema micelar. Además, también se consigue un tamaño uniforme de micela.

Tabla 3.3

Probabilidad de encontrar una o más moléculas de proteína en función de “s” (Turro y col., 1980).

S	P(n=0)	P(n=1)	P(n>1)
0'1	0'90	0'09	0'00
0'5	0'61	0'30	0'06
1'0	0'37	0'37	0'23
2'0	0'13	0'27	0'49

Una vez prefijado el valor de $s \leq 0'1$, se ha procedido a variar la razón molar agua/surfactante, w_0 , para formar microemulsiones micelares con diferente tamaño del núcleo acuoso. Para ello, se han utilizado los datos de Luisi y Wolf (1982) que figuran en la Tabla 3.4 y que fueron obtenidos para sistemas formados por AOT en n-octano e isooctano. Los mencionados valores, se han representado como número de moléculas de tensioactivo por micela (n_b) frente a w_0 en la Figura 3.7 y por interpolación, se ha obtenido un conjunto más extenso de valores de w_0 , con sus correspondientes números de agregación (n_b) y números de moléculas de agua en el núcleo acuoso, j_c ($j_c = n_b \cdot w_0$).

Luisi y Wolf (1982) desarrollaron un modelo por el cual, conociendo las dimensiones de la proteína y la de las micelas no ocupadas (micelas que en su interior sólo tienen agua), se pueden predecir diversos parámetros estructurales y geométricos de micelas reversas de AOT (Tabla 3.4).

Tabla 3.4

Parámetros estructurales para micelas reversas conteniendo proteínas (Luisi y Wolf, 1982).

Sistema	W_0	n^b	j^c	$r_0(\text{Å})^d$
RNAasa Isooctano/AOT (0'05M)	5'7	91	521	19'5
RNAasa Isooctano/AOT (0'05M)	11'1	193	2128	26'6
RNAasa Isooctano/AOT (0'05M)	22'3	395	8823	40'6
Lisozima n-octano/AOT (0'05M)	22'5	364	8195	39'9
Lisozima n-octano/AOT (0'05M)	27'4	636	17452	50'6
LADH Isooctano/AOT (0'05M)	46'4	2022	93844	89'6

n^b =número de agregación del tensioactivo.

j^c =número de moléculas de agua en el núcleo acuoso, el cual contiene unicamente una molécula de proteína.

r_0 =radio del núcleo polar de la micela conteniendo proteína. Para obtener el radio total habrá que adicionar 12 Å que es el tamaño de una molécula de AOT.

Se han utilizado las expresiones siguientes para el cálculo de las cantidades de agua (A), de tensioactivo (B) y de disolución madre de proteína (C), que deben mezclarse para conseguir un volumen total de sistema V_T de un determinado w_0 :

$$A = \frac{n^b \cdot [\text{micelas}] \cdot \omega_0 \cdot 18 \cdot V_T}{1000} \quad \text{Ecuación 3.19}$$

$$B = \frac{n^b \cdot [\text{micelas}] \cdot V_T}{[\text{AOT}]} \quad \text{Ecuación 3.20}$$

$$C = \frac{[\text{Proteína}] \cdot V_T}{[\text{Proteína}]} \quad \text{Ecuación 3.21}$$

donde A viene expresado en μl de agua, B en μl de una disolución madre de AOT en el disolvente hidrocarbonado y C son los μl de una determinada disolución de biliproteína madre en el tampón adecuado.

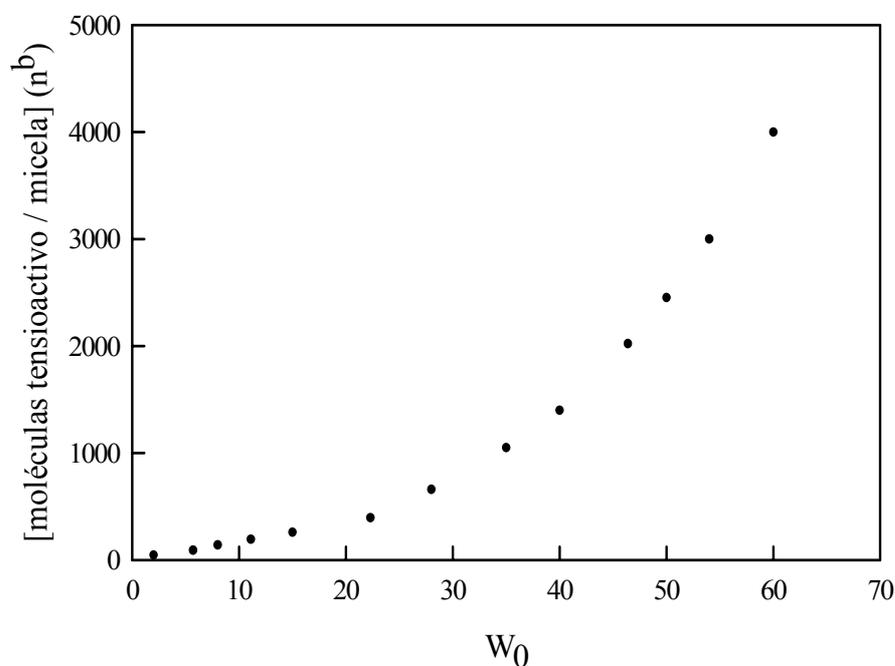


Figura 3.7

Curva obtenida para relacionar el nº de moléculas de tensioactivo por micela (n_b) en función de w_0 .

En las Tablas 3.5 y 3.6 se muestran las cantidades necesarias de cada uno de los componentes y los valores de los parámetros característicos de las microemulsiones micelares formadas de APC y R-PC.

La técnica empleada para la incorporación de las biliproteínas a las micelas fue la de inyección, por su rapidez y simplicidad. Para ello, se preparó una disolución madre de biliproteína de elevada concentración en tampón fosfato de pH y fuerza iónica apropiados para cada valor de w_0 . Tras esta adición se agita la disolución y se espera la estabilización del sistema. Todas las medidas espectroscópicas se realizaron a una temperatura de 25°C.

Tabla 3.5

Parámetros estructurales y cantidades necesarias de los diversos componentes para la formación de microemulsiones micelares. $[APC]_{\text{madre}} = 3'66 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Micelas}] = 10^{-4} \text{ M}$.

W_0	n^b	j_c	V_T	A	B μl	C μl	Tampón	[Proteína] M	S
				$\mu\text{l H}_2\text{O}$ TOTAL	AOT 0'7 M	[APC] $3'66 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	añadido μl		
8'0	140	1120	5000	10	100	10	0	$7'32 \cdot 10^{-8}$	0,007
15'0	260	3900	5000	35	186	10	25	$7'32 \cdot 10^{-8}$	0,007
22'3	395	8823	1500	24	84'6	10	14	$2'44 \cdot 10^{-7}$	0,0024
28'0	660	18480	1500	50	141	10	40	$2'44 \cdot 10^{-7}$	0,0024
35'0	1050	36750	1500	99	225	10	89	$2'44 \cdot 10^{-7}$	0,0024
40'0	1400	56000	1500	151	300	10	141	$2'44 \cdot 10^{-7}$	0,0024
46,4	2022	93844	1500	253	433	10	243	$2'44 \cdot 10^{-7}$	0,0024

Tabla 3.6

Parámetros estructurales y cantidades necesarias de los diversos componentes para la formación de microemulsiones micelares. $[\text{R-PC}]_{\text{madre}} = 2'4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Micelas}] = 10^{-4} \text{ M}$.

W_0	n^b	j_c	V_T	A	B μl	C μl	Tampón	[Proteína] M	S
				$\mu\text{l H}_2\text{O}$ TOTAL	AOT 0'7 M	[R-PC] $2'4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	añadido μl		
8'0	140	1120	5000	10	100	10	0	$4'7 \cdot 10^{-8}$	0'0005
15'0	260	3900	5000	35	186	35	0	$1'7 \cdot 10^{-7}$	0'002
22'3	395	8823	1500	24	84'6	24	0	$3'8 \cdot 10^{-8}$	0'003
28'0	660	18480	1500	50	141	24	27	$3'8 \cdot 10^{-8}$	0'003
35'0	1050	36750	1500	99	225	24	76	$3'8 \cdot 10^{-8}$	0'003
40'0	1400	56000	1500	151	300	24	127	$3'8 \cdot 10^{-8}$	0'003
46'4	2022	93844	1500	253	433	24	229	$3'8 \cdot 10^{-8}$	0'003
50'0	2452	122600	1500	331	527	24	307	$3'8 \cdot 10^{-8}$	0'003

3.2.6.-CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

Para corroborar la pureza de las biliproteínas purificadas y obtener preparativamente las subunidades de las mismas, se ha utilizado cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa.

Las experiencias cromatográficas se han llevado a cabo utilizando diferentes gradientes de polaridad en columnas de tipo analítico y una vez optimizadas las variables de trabajo, se ha usado una columna semipreparativa para obtener las subunidades para su posterior almacenamiento y utilización.

Los gradientes de polaridad ensayados han sido de tipo binario habiendo utilizado acetonitrilo (calidad HPLC, adicionado de 0'085%TFA) y agua (calidad milliQ adicionada de TFA al 0'1%). El gradiente de polaridad utilizado en las experiencias preparativas fue: 40% (acetonitrilo:agua) (0-5min), y del 40 al 100% (acetonitrilo:agua) en 35 min retornando al 40% en 10 minutos (Bermejo y col., 1997).

Aunque se han ensayado diferentes tipos de columnas de fase reversa (C_4 , C_8 y C_{18}), los mejores resultados se han obtenido utilizando en escala analítica la C_4 y C_8 y en escala semipreparativa la C_4 .

En el método cromatográfico se han seleccionado como parámetros de trabajo: velocidad de flujo de 1ml/min para columnas analíticas y de 5 ml/min para la columna preparativa; longitudes de onda de monitorización en el diodo array para el seguimiento del proceso de 615, 280 y 226 nm (características de las ficocianinas, proteínas totales y enlace peptídico respectivamente).

Preparación de las muestras:

Se parte de las biliproteínas liofilizadas para resuspenderlas en tampón fosfato 50mM (pH 7). A la disolución así obtenida se le realiza un espectro de absorción UV-visible entre 250 y 700 nm y aplicando las Ecuaciones 3.8 a 3.11, se calcula la concentración de ficocianinas. Así, en las columnas analíticas se ha inyectado un volumen que corresponde a 50 μ g de ficocianinas y al que se le ha adicionado TFA hasta alcanzar una concentración del 0'1% en el mismo. Las disoluciones así preparadas se centrifugaron a 6000 rpm durante 1 minuto como paso previo a la inyección en el sistema cromatográfico. En todas las experiencias, la estabilización del sistema previo a la inyección y el seguimiento durante el transcurso de la separación cromatográfica, se ha realizado monitorizando en continuo la presión del sistema y las absorbancias a varias longitudes de onda.

4.

RESULTADOS

Y

DISCUSIÓN

4.1.-EVALUACION DEL CONTENIDO EN BILIPROTEINAS.

Es importante resaltar que el proceso de purificación propuesto para obtener las diferentes biliproteínas ha sido optimizado en orden a producir un elevado rendimiento de recuperación proteico. Debido a esto, es fundamental como dato de partida, conocer la cantidad inicial de biliproteínas en cada especie microalgal ensayada. Así, se evaluó el contenido en biliproteínas de las cuatro especies de microalgas siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.2.1.

Anabaena marina.

La Tabla 4.1 muestra los resultados de la cuantificación de las biliproteínas contenidas en la biomasa de *Anabaena marina*. Se presentan las concentraciones, masas y porcentaje total que constituyen las biliproteínas extraídas en cada etapa respecto del total de la biomasa utilizada.

Tabla 4.1

Extracción de las biliproteínas contenidas en *Anabaena marina*. Biomasa utilizada = 2g.

Nº extracción	[C-PC] (mg/ml)	[APC] (mg/ml)	Vol,ml	mg C-PC	mg APC	mg biliproteínas	%Biliproteínas
1	0'44	0'04	25	11'09	2'81	13'90	0'70
2	0'32	0'02	29	9'35	1'35	10'70	0'54
3	0'19	0'01	27	5'16	0'77	5'92	0'30
4	0'10	0'02	27	2'74	0'78	3'52	0'18
5	0'09	0'04	28	2'52	1'12	3'63	0'18
6	0'05	0'02	28	1'33	0'50	1'84	0'09
7	0'03	0'01	26	0'82	0'36	1'18	0'06
8	0'05	0'03	25	1'13	0'75	1'88	0'09
9	0'02	0'01	30	0'64	0'36	1'00	0'05
10	0'02	0'01	27	0'41	0'24	0'65	0'03
11	0'01	0'01	25	0'29	0'19	0'47	0'02
12	0'01	0'01	25	0'25	0'18	0'43	0'02
TOTAL						45'1	2'26

El contenido total de biliproteínas en la microalga *Anabaena marina* es de 45'1 mg, que suponen un 2'26% del peso total del alga.

Spirulina platensis.

Análogamente la Tabla 4.2 muestra los resultados de la cuantificación total de las biliproteínas contenidas en la biomasa de la microalga *Spirulina platensis*.

Tabla 4.2

Extracción de las biliproteínas contenidas en *Spirulina platensis*. Biomasa utilizada=5 g.

Nº extracción	[C-PC] (mg/ml)	[APC] (mg/ml)	Vol,ml	mg C-PC	mg APC	mg biliproteínas	%Biliproteínas
1	1'28	0'15	33	42'16	4'95	47'12	0'94
2	0'88	0'11	32	28'06	3'35	31'42	0'63
3	0'71	0'09	30	21'39	2'79	24'18	0'48
4	0'53	0'08	29	15'44	2'33	17'78	0'35
5	0'41	0'10	31	12'75	3'08	15'83	0'32
6	0'32	0'06	29	9'24	1'68	10'93	0'22
7	0'22	0'06	30	6'48	1'66	8'14	0'16
8	0'16	0'05	28	4'52	1'40	5'92	0'12
9	0'10	0'03	30	3'02	0'92	3'94	0'08
10	0'06	0'02	27	1'74	0'58	2'32	0'05
TOTAL						167'6	3'35

De acuerdo con los resultados obtenidos, el contenido total de biliproteínas en la microalga *Spirulina platensis* es de 167'6 mg, que suponen un 3'35% del peso total del alga.

Synechocystis aquatilis.

La Tabla 4.3 muestra los resultados de la completa extracción de las biliproteínas contenidas en la biomasa de *Synechocystis aquatilis*.

Tabla 4.3

Extracción de las biliproteínas contenidas en *Synechocystis aquatilis*. Biomasa utilizada= 2g.

Nº extracción	[C-PC] (mg/ml)	[APC] (mg/ml)	Vol,ml	mg C-PC	mg APC	mg biliproteínas	%Biliproteínas
1	1'19	0'68	35	41'78	23'95	65'73	3'29
2	0'19	0'12	36	6'81	4'18	10'99	0'55
3	0'09	0'06	38	3'50	2'43	5'93	0'30
4	0'05	0'05	40	2'15	1'87	4'02	0'20
TOTAL						86'7	4'33

El contenido total de biliproteínas en la microalga *Synechocystis aquatilis* es de 86'7 mg, que suponen un 4'33 % del peso total del alga.

Porphyridium cruentum.

La Tabla 4.4 muestra los resultados de la completa extracción de las biliproteínas contenidas en la biomasa de *Porphyridium cruentum*.

Tabla 4.4

Extracción de las biliproteínas contenidas en *Porphyridium cruentum*. Biomasa utilizada= 2g.

Nº extracción	[BPE] (mg/ml)	[APC] (mg/ml)	[R-PC] (mg/ml)	Vol,ml	mg BPE	mg APC	mg R-PC	mg biliproteínas	%Biliproteínas
1	1'24	0'06	0'21	35	43'30	2'17	7'47	52'90	2'65
2	0'10	0'01	0'02	40	4'00	0'47	0'94	5'46	0'27
3	0'05	0'01	0'01	39	1'90	0'35	0'46	2'72	0'14
4	0'04	0'01	0'01	39	1'40	0'24	0'32	1'94	0'10
TOTAL								63'0	3'1

El contenido total de biliproteínas en el microalga *Porphyridium cruentum* es de 63 mg, que suponen un 3'1 % del peso total del alga.

De las cuatro especies ensayadas, *Anabaena marina* y *Spirulina platensis* precisaron de un número elevado de procesos de extracción (12 y 10) para llegar a la recuperación del total de biliproteínas que las constituyen, mientras que para *Synechocystis aquatilis* y *Porphyridium cruentum*, sólo fueron necesarias cuatro extracciones para completar dicha recuperación.

Las algas verdeazuladas ensayadas poseen únicamente C-PC y APC como biliproteínas constitutivas, mientras que el alga roja *Porphyridium cruentum* posee BPE, APC y R-PC. A la vista de los valores encontrados para las diferentes especies de microalgas, los resultados obtenidos (Tabla 4.5) están en concordancia con los encontrados por otros autores. En este sentido Tel-Or y col., (1980) presentaron datos de contenido total en biliproteínas para la especie *Spirulina platensis* que van desde el 1'5 al 3%. En nuestro caso y a excepción de *Synechocystis aquatilis*, los valores encontrados son ligeramente superiores a los datos referidos para *Spirulina platensis*. En este sentido, es importante resaltar que los diferentes cultivos de las especies utilizadas, han sido optimizados en cuanto a las variables de crecimiento, buscando maximizar el contenido en biliproteínas (Cerón y col., 2008), por lo que es lógico encontrar valores superiores a los que tendrían cultivos no enfocados a la maximización de proteínas fotosintéticas.

Tabla 4.5

Porcentaje de biliproteínas en las diferentes especies microalgales.

Microalga	%Total Biliproteínas
<i>Anabaena marina</i>	2'3
<i>Spirulina platensis</i>	3'4
<i>Synechocystis aquatilis</i>	4'3
<i>Porphyridium cruentum</i>	3'1

4.2.-PURIFICACIÓN DE BILIPROTEINAS.

4.2.1.-TRATAMIENTOS PREVIOS.

Como paso inicial en el proceso de purificación de biliproteínas (Figura 3.1), es necesario liberar el material intracelular del que forman parte éstas (ficobilisomas), mediante la ruptura de la pared citoplasmática. Así, se ha estudiado la influencia de este proceso en el rendimiento de recuperación proteico utilizando variables como pH, tipo de tampón, fuerza iónica y exposición a ultrasonidos.

4.2.1.1.-Optimización de la fase de extracción.

Diferentes autores muestran en la bibliografía diversos procesos para la extracción de biliproteínas en la etapa de tratamientos previos, utilizándose unos u otros, en función de la microalga de que se dispone como materia prima. Así, se han venido utilizando procesos como: choque osmótico usando diferentes medios; tratamientos con compuestos químicos como Tritón X-100, rivanol, lisozima; tratamientos mecánicos de ruptura celular; congelación-descongelación e incluso extracción con acetona (Gombos y col., 1984; Saxena, 1988; Duerring y col., 1991; Tchernov y col., 1999; Campanella y col., 2000; Bermejo y col., 2002a, 2003a). Como el objetivo que persigue la presente Memoria es el desarrollo de una metodología escalable y económicamente viable, para poder proponerla como alternativa de producción en la media y gran escala, se ha optado por ensayar únicamente los tratamientos previos usando choque osmótico, por tratarse de la metodología más adecuada para este fin. Así, se han realizado experiencias en las que se ensayaron diferentes medios de extracción para la optimización de los tratamientos previos: tampón fosfato pH 7 (1M), tampón acetato pH 5'5

(1M) y agua destilada. El proceso consistió en mezclar la biomasa en forma de polvo liofilizado con un volumen del medio extractante correspondiente, tal y como se describe en el correspondiente apartado de la metodología (3.2.2.2.1).

Anabaena marina.

La Tabla 4.6 muestra las cantidades de biliproteínas extraídas de la microalga *Anabaena marina* (C-PC y APC) determinadas espectroscópicamente, presentes en cada uno de los sobrenadantes generados en esta etapa.

Tabla 4.6

Cantidades de biliproteínas obtenidas en los sobrenadantes generados en los tratamientos previos para la purificación de ficocianinas procedentes de *Anabaena marina*.

Biomasa utilizada= 2g.

	1ª EXTRACCIÓN		2ª EXTRACCIÓN		3ª EXTRACCIÓN		Total Biliproteinas mg	%
	C-PC, mg	APC, mg	C-PC,mg	APC, mg	C-PC, mg	APC, mg		
Tampón Fosfato pH 7 1M	13'83	3'56	9'54	2'30	3'83	1'20	34'26	1'7
Tampón Acetato pH 5'5 1M	3'75	0'50	3'34	0'43	2'10	0'36	10'48	0'5
Agua Destilada	12'95	1'60	2'76	0'55	0'19	0'17	18'22	0'9

%; porcentaje de biliproteínas extraídas respecto del total de biomasa utilizada.

De todos los procesos ensayados, el que mejores resultados produjo fue la utilización de choque osmótico con tampón fosfato pH 7 (1M), como se aprecia en la Tabla 4.6. Como inicialmente se pesaron 2 g de biomasa liofilizada de microalga, los 34'26 mg de ficocianinas suponen un 1'7 % del peso inicial de microalga. A título comparativo, este porcentaje es superior al obtenido cuando se empleó para el choque osmótico agua destilada o tampón acetato pH 5'5 (1M), donde la cantidad de ficocianinas extraídas representaba el 0'9 y 0'5 % respectivamente.

Es importante resaltar que algunos autores indican la conveniencia de realizar la extracción utilizando alta fuerza iónica, pues así se liberan los ficobilisomas intactos, lo que facilita el buen rendimiento en la recuperación de biliproteínas (Glazer, 1976; Padgett y Krogmann, 1987). Así, el choque osmótico utilizando tampón fosfato pH 7 (1M) provoca la ruptura de las paredes celulares y la consiguiente salida del material citoplasmático, en donde se encuentran los ficobilisomas que son las estructuras supramoleculares encargadas de la captación de la radiación solar y donde se encuentran localizadas las biliproteínas. La posterior centrifugación tiene por objeto la eliminación, en el residuo que se genera tras ella, de los componentes estructurales más pesados, como son en su mayor parte los restos de las paredes celulares, orgánulos citoplasmáticos de gran tamaño y material celular que pudiera haber permanecido intacto. La Imagen 4.1 muestra el detalle de las mezclas biomasa-tampón antes y después de la centrifugación.



Imagen 4.1

Detalle del proceso de extracción de ficocianinas procedente de *Anabaena marina*.

A) Antes de centrifugar. B) Después de centrifugar.

Spirulina platensis.

La Tabla 4.7 muestra las cantidades de biliproteínas extraídas de la microalga *Spirulina platensis* (C-PC y APC), determinadas espectroscópicamente, presentes en cada uno de los sobrenadantes generados en esta etapa.

Tabla 4.7

Cantidades de biliproteínas obtenidas en los sobrenadantes generados en los tratamientos previos para la purificación de ficocianinas procedentes de *Spirulina platensis*. Biomasa utilizada= 5g.

	1ª EXTRACCIÓN		2ª EXTRACCIÓN		3ª EXTRACCIÓN		Total Biliproteínas mg	%
	C-PC, mg	APC, mg	C-PC, mg	APC, mg	C-PC, mg	APC, mg		
Tampón Fosfato pH 7 1M	39'08	4'36	46'32	5'16	15'32	3'27	113'51	2'27
Tampón Acetato pH 5'5 1M	13'46	1'38	3'95	0'28	13'47	0'55	33'08	0'66
Agua Destilada	40'57	4'27	35'68	3'30	56'48	6'42	146'72	2'93

De todos los procesos ensayados, el que mejores resultados produjo fue la utilización de choque osmótico con agua destilada, como se aprecia en la Tabla 4.7. Como inicialmente se pesaron 5 g de biomasa liofilizada de microalga, los 146'7 mg de ficocianinas suponen un 2'9 % del peso inicial de microalga. A título comparativo, este porcentaje es superior al obtenido cuando se empleó para el choque osmótico tampón acetato pH 5'5 (1M) y tampón fosfato pH 7 (1M), donde la cantidad de ficocianinas extraídas representaba el 0'66% y 2'27% respectivamente.

Synechocystis aquatilis.

La Tabla 4.8 muestra las cantidades de las biliproteínas extraídas de la microalga *Synechocystis aquatilis* (C-PC y APC) determinadas espectroscópicamente y presentes en cada uno de los sobrenadantes generados en esta etapa.

Tabla 4.8

Cantidades de biliproteínas obtenidas en los sobrenadantes generados en los tratamientos previos para la purificación de ficocianinas procedentes de *Synechocystis aquatilis*.

Biomasa utilizada= 2g.

	1ª EXTRACCIÓN		2ª EXTRACCIÓN		Total	
	C-PC, mg	APC, mg	C-PC, mg	APC, mg	Biliproteínas mg	%
Tampón Fosfato pH 7 1M	26'7	15'82	6'83	4'26	53'61	2'68
Tampón Acetato pH 5'5 1M	14'16	6'99	5'27	2'36	28'78	1'44
Agua Destilada	55'42	21'04	5'21	2'64	84'31	4'22

En este caso, de todos los procesos ensayados, el que mejores resultados produjo fue la utilización de choque osmótico con agua destilada, como se aprecia en la Tabla 4.8. Como inicialmente se pesaron 2 g de biomasa liofilizada de microalga, los 84'3 mg de ficocianinas suponen un 4'2 % del peso inicial de microalga. Este porcentaje es superior al obtenido cuando se empleó para el choque osmótico tampón acetato pH 5'5 (1M) y tampón fosfato pH 7 (1M), donde la cantidad de ficocianinas extraídas representaba el 1'44% y 2'68% respectivamente.

Porphyridium cruentum.

La Tabla 4.9 muestra las cantidades de las biliproteínas extraídas de *Porphyridium cruentum* (BPE, R-PC y APC) determinadas espectroscópicamente y presentes en cada uno de los sobrenadantes generados en esta etapa.

Para este alga roja, el proceso que mejores resultados produjo fue la utilización de choque osmótico con agua destilada, como se aprecia en la Tabla 4.9. Así, como inicialmente se pesaron 2 g de biomasa liofilizada de microalga, los 77'4 mg de ficocianinas suponen un 3'87 % del peso inicial de microalga. Este valor es superior al obtenido cuando se empleó para el choque osmótico tampón acetato o fosfato.

Tabla 4.9

Cantidades de biliproteínas obtenidas en los sobrenadantes generados en los tratamientos previos para la purificación de ficocianinas procedentes de *Porphyridium cruentum*.

Biomasa utilizada= 2g.

	1ª EXTRACCIÓN			2ª EXTRACCIÓN			3ª EXTRACCIÓN			Total	%
	BPE mg	APC mg	R-PC mg	BPE mg	APC mg	R-PC mg	BPE mg	APC mg	R-PC mg	Biliproteinas mg	
Tampón Fosfato pH 7 1M	45'79	4'30	7'96	6'21	1'85	1'73	2'56	0'74	0'69	71'82	3'59
Tampón Acetato pH 5'5 1M	34'57	1'95	5'99	3'39	0'38	0'74	1'82	0'26	0'44	49'53	2'48
Agua Destilada	51'60	3'21	10'14	4'95	0'76	1'43	3'67	0'67	0'97	77'40	3'87

Si comparamos los resultados obtenidos con las cuatro especies microalgales, la extracción es óptima utilizando agua destilada, excepto para el caso de *Anabaena marina*. No obstante y debido a las siguientes etapas a seguir en el proceso de purificación, es necesario tamponar el medio de extracción. Así, resultados previos, obtenidos por nuestro grupo de investigación (Bermejo y col., 2006), muestran que la siguiente etapa para la recuperación de ficocianinas procedentes de *Spirulina platensis* (CALE), requiere que el extracto a aplicar en la columna vaya en medio tampón fosfato pH 7, que es la fase móvil óptima para la adsorción de las proteínas en el relleno cromatográfico Streamline DEAE. Para el caso del extracto proveniente de *Porphyridium cruentum*, está demostrado que la fase móvil óptima para CALE es tampón acetato pH 5'5 (Bermejo y col., 2003a). Por lo anteriormente comentado, se propone como medio de extracción a utilizar en los tratamientos previos de algas verdeazuladas (*Anabaena marina*, *Spirulina platensis* y *Synechocystis aquatilis*) el uso de tampón fosfato pH 7 1M, ya que genera el valor de recuperación máximo en el caso de *Anabaena marina* y valores muy próximos a los máximos para *Spirulina platensis* y *Synechocystis aquatilis*. En este sentido y conociendo los requerimientos de CALE, para el caso de la extracción de biliproteínas de *Porphyridium cruentum*, se propone como fase de extracción más adecuada el tampón acetato pH 5'5 (1M).

4.2.1.2.-Optimización de la fuerza iónica del medio de extracción.

En el apartado anterior se ha conseguido conocer qué medio de extracción es el más adecuado para el objetivo que se persigue en esta Memoria, debiendo a continuación ensayar cuál es la fuerza iónica (F.I) idónea para el proceso. Así, para la optimización de la fuerza iónica del medio de extracción, se realizaron experiencias en las que se utilizó como medio de extracción tampón fosfato pH 7 para las algas verdeazuladas y tampón acetato pH 5'5 para el caso del alga roja *Porphyridium cruentum*, con diferentes valores de fuerza iónica. La metodología utilizada se describe en el apartado 3.2.2.2.2 y se ensayaron medios de extracción con valores de F.I iguales a: 1000 mM, 500 mM, 100 mM y 50 mM.

Anabaena marina.

La Tabla 4.10 muestra las cantidades de biliproteínas extraídas (C-PC y APC) determinadas espectroscópicamente, presentes en cada uno de los sobrenadantes generados en esta etapa.

Tabla 4.10

Cantidades de biliproteínas extraídas en los sobrenadantes generados en los tratamientos previos para la purificación de ficocianinas procedentes de *Anabaena marina*, como función de la fuerza iónica del tampón utilizado. Biomasa utilizada= 2 g.

	1ª EXTRACCIÓN		2ª EXTRACCIÓN		3ª EXTRACCIÓN		Total	
	C-PC, mg	APC, mg	C-PC, mg	APC, mg	C-PC, mg	APC, mg	Biliproteínas mg	%
Tampón								
Fosfato	13'83	3'56	9'54	2'30	3'83	1'20	34'26	1'7
pH 7 1000mM								
Tampón								
Fosfato	18'33	4'44	11'32	2'76	3'29	1'34	41'49	2'0
pH 7 500mM								
Tampón								
Fosfato	21'54	5'84	8'81	2'83	1'56	1'10	41'67	2'0
pH 7 100mM								
Tampón								
Fosfato	19'83	5'56	7'36	2'87	0'97	0'69	37'28	1'9
pH 7 50mM								

%. porcentaje de biliproteínas extraídas respecto del total de biomasa utilizada.

De todos los procesos ensayados, los mejores resultados se obtuvieron utilizando tampón fosfato pH 7, de concentraciones 500 y 100mM, con resultados similares. Como inicialmente se pesaron 2 g de biomasa liofilizada de microalga, los aproximadamente 41 mg de ficocianinas extraídas con estas disoluciones suponen un 2% del peso inicial de microalga. A título comparativo, este porcentaje es superior al obtenido cuando se empleó para el choque osmótico tampón fosfato pH 7 (1M), donde la cantidad de ficocianinas extraídas representaba el 1'7 % del peso inicial de biomasa.

Spirulina platensis.

La Tabla 4.11 muestra las cantidades de biliproteínas extraídas (C-PC y APC) determinadas espectroscópicamente, presentes en cada uno de los sobrenadantes generados en esta etapa.

Tabla 4.11

Cantidades de biliproteínas obtenidas en los sobrenadantes generados en los tratamientos previos para la purificación de ficocianinas procedentes de *Spirulina platensis*, como función de la fuerza iónica del tampón utilizado. Biomasa utilizada= 5g.

	1ª EXTRACCIÓN		2ª EXTRACCIÓN		3ª EXTRACCIÓN		Total Biliproteínas mg	%
	C-PC, mg	APC, mg	C-PC, mg	APC, mg	C-PC, mg	APC, mg		
Tampón Fosfato pH 7 1000mM	39'08	4'36	46'32	5'16	15'32	3'27	113'51	2'27
Tampón Fosfato pH 7 500mM	62'80	7'26	26'77	3'35	13'30	2'31	115'80	2'32
Tampón Fosfato pH 7 100mM	43'41	5'12	11'78	1'52	36'65	4'91	103'38	2'07
Tampón Fosfato pH 7 50mM	49'04	5'80	20'58	2'84	37'36	5'17	120'80	2'42

En este caso, los mejores resultados se obtuvieron utilizando tampón fosfato pH 7, de concentración 50mM. Como inicialmente se pesaron 5 g de biomasa liofilizada de microalga,

los aproximadamente 120 mg de ficocianinas extraídos con esta disolución suponen un 2'42 % del peso inicial de microalga.

Synechocystis aquatilis.

La Tabla 4.12 muestra las cantidades de biliproteínas extraídas (C-PC y APC) determinadas espectroscópicamente, presentes en cada uno de los sobrenadantes generados en esta etapa.

Tabla 4.12

Cantidades de biliproteínas obtenidas en los sobrenadantes generados en los tratamientos previos para la purificación de ficocianinas procedentes de *Synechocystis aquatilis*, como función de la fuerza iónica del tampón utilizado. Biomasa utilizada= 2g.

	1ª EXTRACCIÓN		2ª EXTRACCIÓN		Total Biliproteínas mg	%
	C-PC, mg	APC, mg	C-PC, mg	APC, mg		
Tampón Fosfato pH 7 1000mM	26'7	15'82	6'83	4'26	53'61	2'68
Tampón Fosfato pH 7 500mM	44'28	26'23	7'54	4'50	82'55	4'13
Tampón Fosfato pH 7 100mM	48'61	28'44	5'12	3'25	85'41	4'27
Tampón Fosfato pH 7 50mM	45'56	26'13	7'54	4'69	83'91	4'20

Los mejores resultados se obtuvieron utilizando tampón fosfato pH 7, de concentraciones 50 y 100mM, con resultados similares. Como inicialmente se pesaron 2 g de biomasa liofilizada de microalga, los aproximadamente 85 mg de ficocianinas extraídos con estas disoluciones suponen un 4'2 % del peso inicial de microalga. A título comparativo, este porcentaje es casi el doble que el obtenido cuando se empleó para el choque osmótico tampón fosfato pH 7 (1M), donde la cantidad de ficocianinas extraídas representaba el 2'68% del peso inicial de biomasa.

***Porphyridium cruentum*.**

La Tabla 4.13 muestra las cantidades de biliproteínas extraídas (BPE, R-PC y APC) determinadas espectroscópicamente, presentes en cada uno de los sobrenadantes generados en esta etapa.

Tabla 4.13

Cantidades de biliproteínas obtenidas en los sobrenadantes generados en los tratamientos previos para la purificación de ficocianinas procedentes de *Porphyridium cruentum*, como función de la fuerza iónica del tampón utilizado. Biomasa utilizada= 2g.

	1ª EXTRACCIÓN			2ª EXTRACCIÓN			3ª EXTRACCIÓN			Total	
	BPE mg	APC mg	R-PC mg	BPE mg	APC mg	R-PC mg	BPE mg	APC mg	R-PC mg	Biliproteinas mg	%
Tampón											
Acetato pH 5'5 1000mM	38'28	3'38	6'95	2'74	0'23	0'56	2'89	0'23	0'62	55'88	2'79
Tampón											
Acetato pH 5'5 500mM	42'01	6'32	8'58	4'40	1'59	1'26	1'93	0'16	0'52	66'78	3'34
Tampón											
Acetato pH 5'5 100mM	49'72	13'36	11'71	5'51	1'03	1'44	2'58	0'18	0'63	86'16	4'31
Tampón											
Acetato pH 5'5 50mM	51'28	6'94	10'33	4'58	1'10	1'26	2'47	0'20	0'58	78'74	3'94

Para esta especie microalgal, los mejores resultados se obtuvieron utilizando tampón acetato pH 5'5 de concentración 100mM. Como inicialmente se pesaron 2 g de biomasa liofilizada de microalga, los aproximadamente 86 mg de biliproteínas extraídos con estas disoluciones suponen un 4'31 % del peso inicial de microalga. A título comparativo, este porcentaje es superior al obtenido cuando se empleó para el choque osmótico tampón acetato pH 5'5 (1M), donde la cantidad de biliproteínas extraídas representaba el 2'79% del peso inicial de biomasa.

En términos generales, los resultados obtenidos con las cuatro especies microalgales ensayadas, denotan que no existe una gran influencia de la fuerza iónica en el rendimiento obtenido en la etapa de extracción previa. Únicamente en la especie *Synechocystis aquatilis*, hubo diferencia en cuanto a que se obtuvo un valor sensiblemente inferior con tampón 1000 mM (2'68%) frente al valor medio de 4'2% obtenido con los otros valores ensayados.

Resultados previos, obtenidos por nuestro grupo de investigación (Bermejo y col., 2006), muestran que la etapa de CALE para la recuperación de ficocianinas procedentes de *Spirulina platensis*, requiere que el extracto a aplicar en la columna vaya en medio tampón fosfato pH 7 (50mM), que es la fase móvil óptima para la adsorción de las proteínas en el relleno cromatográfico. Debido a ésto, se propone como medio de extracción a utilizar en los tratamientos previos de las algas verdeazuladas, el uso de tampón fosfato pH 7 (50mM), que además según las experiencias realizadas genera un valor de recuperación máximo para *Spirulina platensis* (2'42%) y *Synechocystis aquatilis* (4'2%) y muy próximo al máximo para *Anabaena marina* (1'9%). La utilización de tampón fosfato pH 7 (50mM) como medio de extracción evita el tener que diluir el extracto obtenido, pudiendo aplicarse directamente a la columna en CALE, evitando la posterior dilución, necesaria si se hubiera usado otro medio más concentrado. Así, disminuye el volumen de muestra y por tanto el tiempo de operación en la fase de aplicación en CALE.

Para el caso de la extracción de las biliproteínas de *Porphyridium cruentum*, el extracto a aplicar a la etapa de CALE debe ir en medio tampón acetato pH 5'5 50mM (Bermejo y col., 2003a). Por tanto y dado que el valor de recuperación con este medio (3'94%) es muy similar al máximo obtenido con 100 mM (4'31%), se propone el tampón acetato pH 5'5 (50mM) como óptimo para la recuperación de biliproteínas de *Porphyridium cruentum*.

4.2.1.3.-**Optimización de la exposición a ultrasonidos.**

En un gran número de trabajos de investigación donde se describe la purificación de biliproteínas mediante metodologías convencionales, se recurre a la aplicación de ultrasonidos con objeto de mejorar el rendimiento de recuperación proteico en la etapa de tratamientos previos. En este sentido, la utilización de ultrasonidos es una etapa adicional y difícilmente escalable, por lo que desde el punto de vista de la purificación de grandes cantidades de biliproteínas utilizando CALE, no es muy atractiva, a menos que su uso incrementara

significativamente el rendimiento de recuperación de ficocianinas. Para comprobar este punto, se han realizado experiencias de extracción de biliproteínas con exposición a ultrasonidos a fin de concluir si es conveniente su utilización para conseguir los objetivos planteados en esta Memoria.

Anabaena marina.

Para conocer la influencia del uso de ultrasonidos en disoluciones tamponadas con valores de pH y fuerza iónica previamente determinados, se ha estudiado la influencia de su aplicación variando el tiempo de exposición. Siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.2.2.3, se han realizado experiencias en las que diferentes porciones de una mezcla previamente homogeneizada de biomasa y tampón fosfato pH 7 (50mM), han sido sometidas a ultrasonidos a diferentes tiempos. Como ejemplo de alga verdeazulada, se ha utilizado *Anabaena marina* y la Tabla 4.14 muestra los resultados obtenidos en función del tiempo de exposición.

Tabla 4.14

Concentraciones de biliproteínas extraídas en los sobrenadantes generados en los tratamientos previos para la purificación de ficocianinas procedentes de *Anabaena marina* con tampón fosfato pH7 50mM.

TIEMPO	[biliproteínas] *
min	mg/ml
0	0'88
5	0'87
10	0'79
15	0'47
20	0'59
25	0'61
30	0'54

*El valor de [biliproteínas] corresponde al valor medio de tres determinaciones.

La concentración inicial de biliproteínas (0'88 mg/ml) correspondiente al extracto antes de someterlo a ultrasonidos corresponde con un 1'9% de porcentaje total de biliproteínas en la biomasa y tras la exposición a ultrasonidos se produce un descenso en la concentración de ficocianinas presente en el extracto obtenido en los tratamientos previos, a medida que aumenta el tiempo de exposición a ultrasonidos. Este efecto podría justificarse por la degradación

proteica que este tipo de ondas sonoras puede llegar a producir en las macromoléculas biológicas de interés.

Estos resultados muestran que los tratamientos previos óptimos para la microalga *Anabaena marina* y para las demás algas verdeazuladas, serán aquellos llevados a cabo en presencia de tampón fosfato pH 7 (50mM) y sin necesidad de aplicar ultrasonidos.

Porphyridium cruentum.

Análogamente y por ser una especie microalgal diferente a las cianobacterias, se ha estudiado la influencia de la aplicación de ultrasonidos para el caso de *Porphyridium cruentum*. La Tabla 4.15 muestra los resultados obtenidos en función del tiempo de exposición de los extractos obtenidos en tampón acetato 5'5 (50mM).

Tabla 4.15

Concentraciones de biliproteínas extraídas en los sobrenadantes generados en los tratamientos previos para la purificación de ficocianinas procedentes de *Porphyridium cruentum* con tampón acetato pH 5'5 50mM.

TIEMPO	[biliproteínas] *
min	mg/ml
0	0'96
5	0'96
10	0'96
15	0'98
20	0'95
25	1'1
30	1'15

*El valor de [biliproteínas] corresponde al valor medio de tres determinaciones.

En este caso la concentración de biliproteínas no desciende con la aplicación de ultrasonidos pero tampoco aumenta de forma significativa. El ligero aumento de 0'96 a 1'5 mg/ml no justifica la utilización de los mismos y por tanto se propone como mejor medio de extracción en los tratamientos previos de *Porphyridium cruentum*, el tampón acetato pH 5'5 50mM.

4.2.1.4.-Disoluciones enriquecidas en biliproteínas, previas a la cromatografía.

Los tratamientos previos de la biomasa microalgal en las condiciones descritas anteriormente, generan extractos crudos de biliproteínas de diferente naturaleza y que serán los utilizados en la siguiente etapa del proceso de purificación.

La Figura 4.1 muestra los espectros de absorción uv-visible de los extractos ricos en ficocianinas procedentes de las diferentes cianobacterias ensayadas (*Anabaena marina*, *Spirulina platensis*, *Synechocystis aquatilis*). En ellos puede apreciarse un perfil espectral similar con máximos alrededor de 615, 340 y 260 nm y hombros a 650 y 400 nm, característicos de mezcla de ficocianinas (C-PC y APC) y otros tipos de proteínas. Se suele utilizar como criterio espectroscópico que indica la abundancia relativa de una proteína frente al total, el cociente entre el máximo característico del visible de dicha proteína y la absorbancia a 280nm característica del triptófano. Así, las ficocianinas tienen absorción máxima en torno a 615 nm y las relaciones A_{615}/A_{280} son 0'6 para el caso de *Anabaena marina*, 0'19 para *Spirulina platensis* y 0'62 para la microalga *Synechocystis aquatilis*. En este sentido, el extracto correspondiente a *Spirulina platensis* es el que refleja una menor relación de absorbancias (visible/uv) lo que parece indicar que contiene mayor cantidad de proteínas diferentes a las propias ficocianinas de interés en esta Memoria.

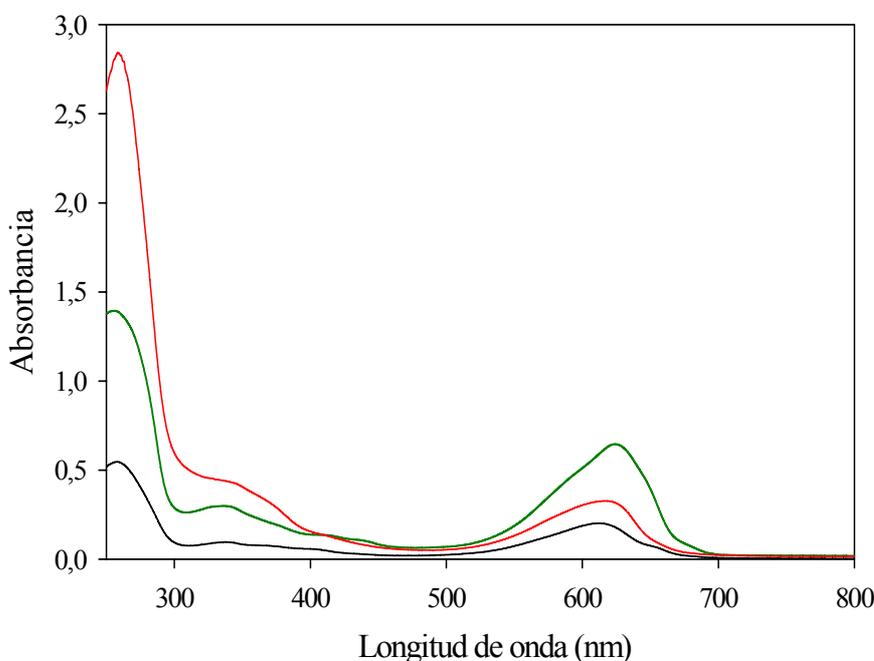


Figura 4.1

Espectro de absorción uv-visible del extracto crudo de ficocianinas procedentes de *Anabaena marina* (—), *Spirulina platensis* (—) y *Synechocystis aquatilis* (—).

La Figura 4.2 muestra el espectro de absorción uv-visible del extracto crudo de ficoeritrina procedente de los tratamientos previos de la microalga roja *Porphyridium cruentum*. En este caso el espectro presenta máximos a 620, 545 y 260 nm y hombros a 565 y 400 nm correspondientes a la mezcla de B-ficoeritrina, R-PC y otras proteínas. En este extracto la abundancia relativa de ficoeritrinas la obtendríamos utilizando el cociente A_{545}/A_{280} que genera un valor igual a 0,7.

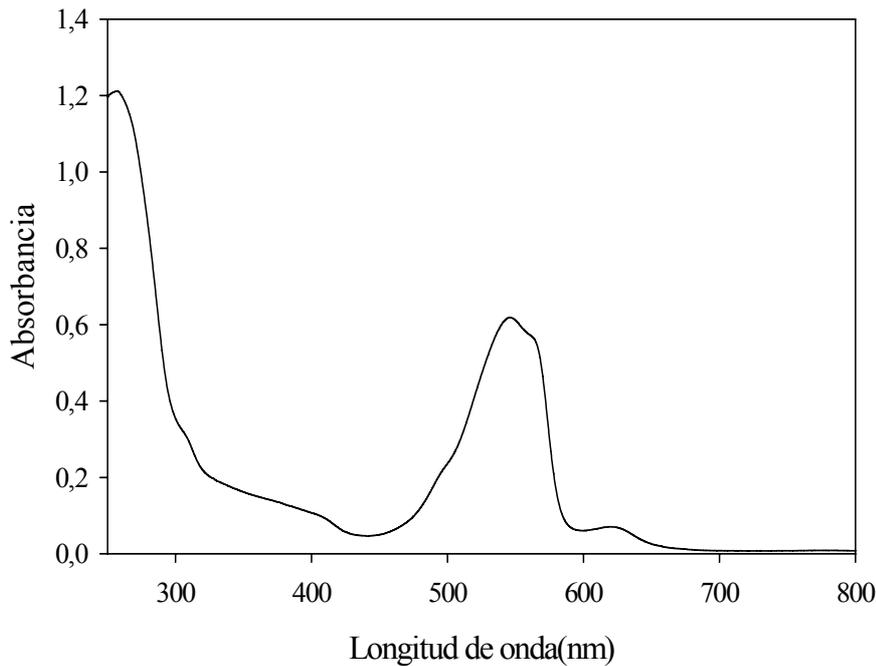


Figura 4.2
Espectro de absorción uv-visible del extracto crudo de ficoeritrina
procedente de *Porphyridium cruentum*.

Estas cuatro disoluciones obtenidas con los tratamientos previos de la biomasa de cada especie microalgal, constituyen los extractos proteicos de partida para la siguiente etapa en el proceso de purificación que es la cromatografía CALE.

4.2.2.-CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN EN LECHO EXPANDIDO.

En el proceso de purificación planteado en la presente Memoria, la etapa siguiente a los tratamientos previos, ha sido la utilización de una nueva metodología basada en cromatografía de adsorción en lecho expandido (CALE), que suma a sus ventajosas características (aumento de rendimiento, economía de proceso y tiempo de operación) la posibilidad de estudiar el escalado del proceso y obtener cantidades considerables de las proteínas de interés.

4.2.2.1.-Cálculo de la capacidad de adsorción del relleno.

Antes de iniciar el proceso cromatográfico en sí, es necesario conocer la capacidad de adsorción del relleno utilizado en esta Memoria, en función de parámetros tales como el pH y la fuerza iónica de la fase móvil a utilizar. Por ello y siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.2.3.1 se han realizado distintas experiencias para estimar la cantidad de biliproteínas que pueden adsorberse por unidad de volumen de relleno utilizado en esta etapa cromatográfica (Streamline DEAE). Esta estimación se puede llevar a cabo de dos formas: mediante las isotermas de adsorción (capacidad estática) o realizando las correspondientes curvas de ruptura (capacidad dinámica). Las dos metodologías conllevan a la obtención de resultados complementarios que pueden dar idea, con bastante precisión, de cómo es el proceso de adsorción de las proteínas de interés sobre el relleno utilizado, en presencia de otras moléculas y dependiendo de cada uno de los extractos ensayados.

4.2.2.1.1.-Capacidad estática (isotermas de adsorción).

Se han utilizado dos tipos de muestras para calcular la capacidad de adsorción, por un lado el extracto crudo de biliproteína procedente de los tratamientos previos de las diferentes algas y por otro biliproteína pura de la que disponía nuestro grupo purificada previamente mediante otras metodologías (Bermejo y col., 1997).

Como biliproteína pura de referencia se ha utilizado C-PC y la Figura 4.3 muestra la concentración de C-PC adsorbida por volumen de relleno cromatográfico frente a la concentración de biliproteína en equilibrio en el tampón, para cada una de las muestras ensayadas. Se han utilizado diferentes modelos de isotermas de adsorción, habiéndose comprobado que los datos obtenidos se ajustan bastante bien al modelo de isoterma de Langmuir (Ecuación 4.1), donde “x” es la cantidad de proteína adsorbida por unidad de volumen de adsorbente, “x_m” es la capacidad máxima de adsorción, “c” es la concentración de equilibrio y “k” es un parámetro constante característico del proceso de adsorción.

$$\frac{x}{x_m} = \frac{k \cdot c}{1 + k \cdot c}$$

Ecuación 4.1

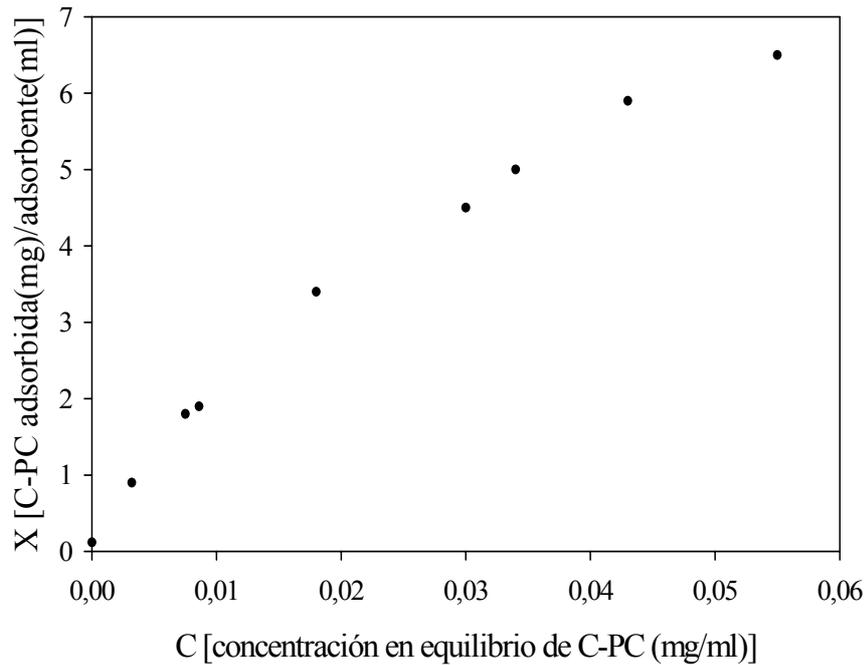


Figura 4.3

Isoterma de adsorción sobre Streamline DEAE, utilizando C-PC pura.

Manipulando matemáticamente la ecuación de la isoterma de Langmuir, puede linealizarse (Ecuación 4.2) y obtenerse de forma sencilla los parámetros característicos (X_m y k).

$$\frac{c}{x} = \frac{1}{k \cdot x_m} + \frac{1}{x_m} c$$

Ecuación 4.2

La Figura 4.4 muestra la linealización correspondiente y en ella puede observarse que existe una concordancia bastante buena con el modelo de Langmuir propuesto para el proceso de adsorción entre la C-PC y la matriz cromatográfica Streamline DEAE.

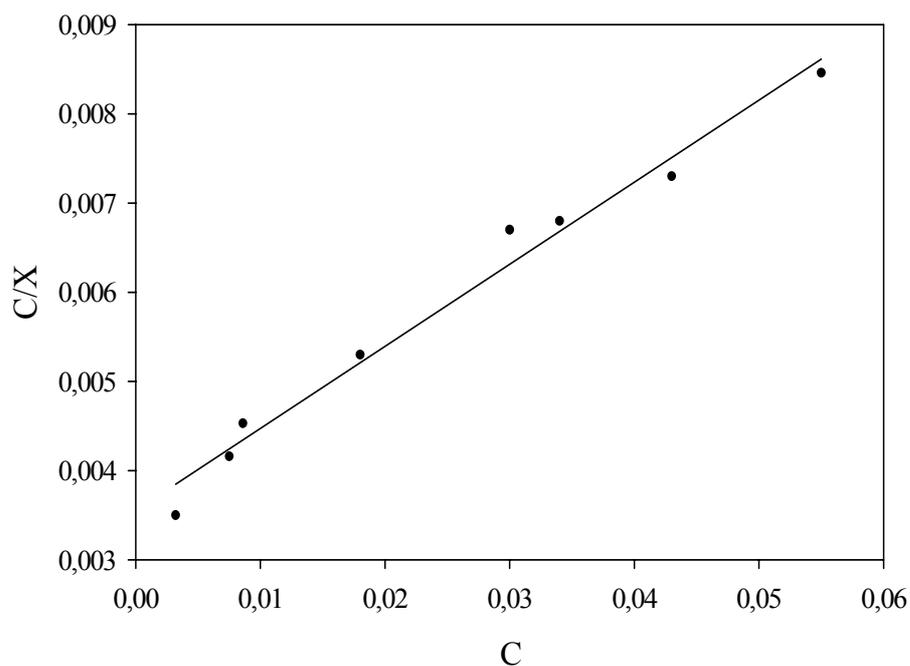


Figura 4.4

Isoterma de Langmuir linealizada para la adsorción de C-PC pura sobre Streamline DEAE.

A partir de las isoterma linealizada se pueden obtener los correspondientes parámetros de ajuste siendo la capacidad máxima de adsorción en equilibrio (X_m) de 10^9 g/l para las muestras de C-PC pura (Tabla 4.16).

Una vez analizados los datos de adsorción obtenidos utilizando C-PC pura, se ha procedido al análisis de la capacidad máxima de adsorción en C-PC por parte del relleno, usando los diferentes extractos de ficocianinas procedentes de los tratamientos previos de cada especie microalgal. Así, la Figura 4.5 muestra la concentración de C-PC adsorbida por volumen de relleno cromatográfico, frente a la concentración de biliproteína en equilibrio en el tampón, para cada una de las muestras ensayadas correspondientes al extracto crudo de ficocianinas de *Anabaena marina*. Los datos obtenidos se ajustan muy bien al modelo de isoterma de Langmuir y la Figura 4.6 muestra la linealización correspondiente, de la que pueden deducirse los parámetros de adsorción (Tabla 4.16), siendo la capacidad máxima de adsorción en el equilibrio igual a 1^7 g/l. La Imagen 4.2 muestra en detalle la secuencia de disoluciones utilizadas para la determinación de la isoterma de adsorción.



Imagen 4.2

Detalle de las disoluciones mezcla de extracto crudo de ficocianinas procedente de *Anabaena marina* y Streamline DEAE, para la obtención de la isoterma de adsorción.

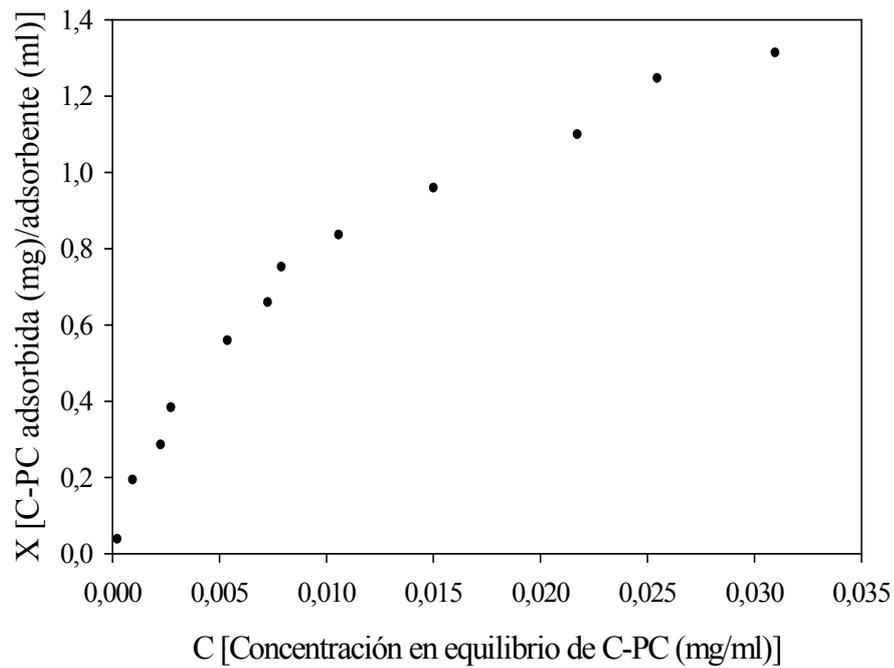


Figura 4.5

Isoterma de adsorción sobre Streamline DEAE, utilizando el extracto crudo de ficocianinas procedente de los tratamientos previos de *Anabaena marina*.

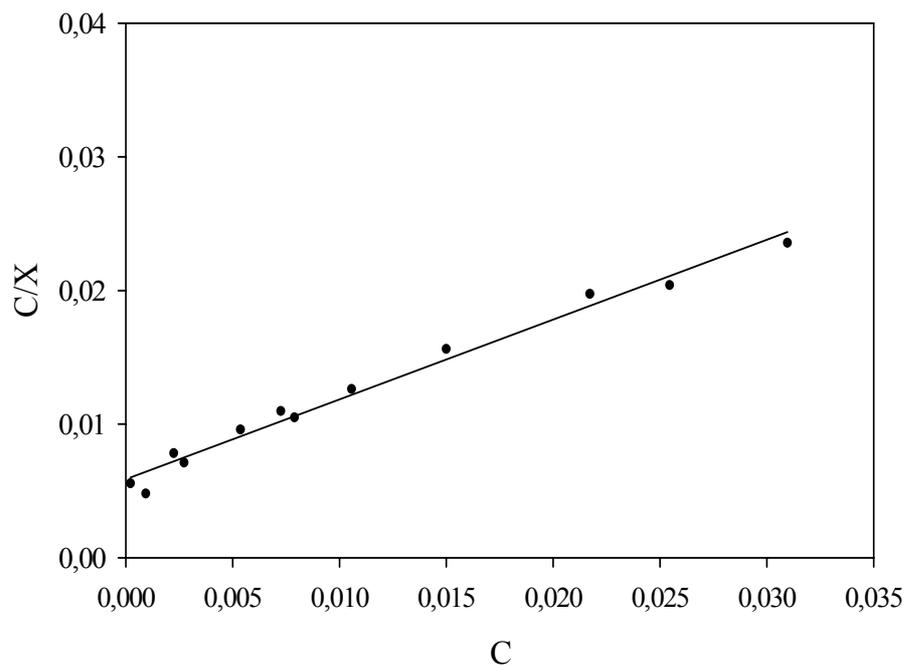


Figura 4.6

Isoterma de Langmuir linealizada para la adsorción del extracto crudo de ficocianinas de *Anabaena marina* sobre Streamline DEAE.

Para el caso de *Spirulina platensis*, la Figura 4.7 muestra la concentración de C-PC adsorbida por volumen de relleno cromatográfico frente a la concentración de biliproteína en equilibrio en el tampón, para cada una de las muestras ensayadas correspondientes al extracto crudo de ficocianinas de *Spirulina platensis*. Los datos obtenidos se ajustan bien al modelo de isoterma de Langmuir y la linealización de los mismos (Figura 4.8) permite obtener los parámetros de ajuste que se muestran en la Tabla 4.16. Así la capacidad de adsorción máxima (X_m) es de 1'6 g/l.

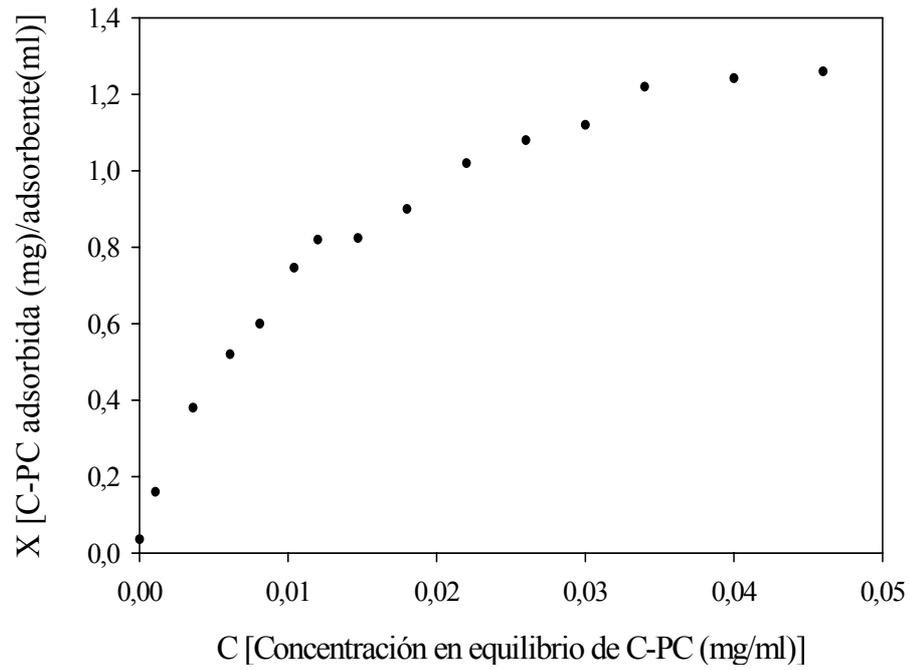


Figura 4.7

Isoterma de adsorción sobre Streamline DEAE, utilizando el extracto crudo de ficocianinas procedente de los tratamientos previos de *Spirulina platensis*.

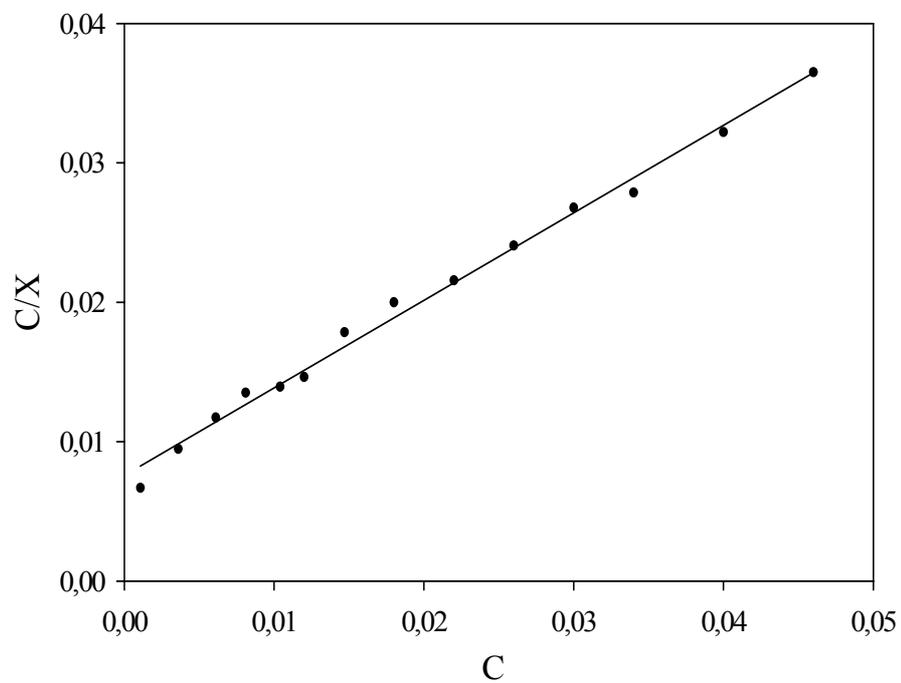


Figura 4.8

Isoterma de Langmuir linealizada para la adsorción del extracto crudo de ficocianinas de *Spirulina platensis* sobre Streamline DEAE.

Por último, utilizando la microalga *Synechocystis aquatilis* se obtienen resultados similares que se muestran en las Figuras 4.9 y 4.10.

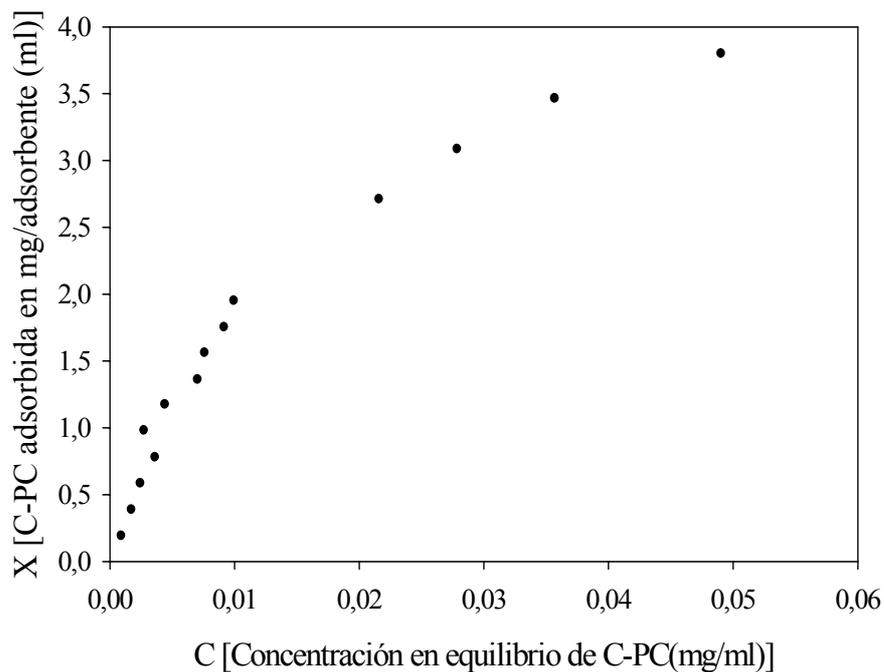


Figura 4.9

Isoterma de adsorción sobre Streamline DEAE, utilizando el extracto crudo de ficocianinas procedente de los tratamientos previos de *Synechocystis aquatilis*.

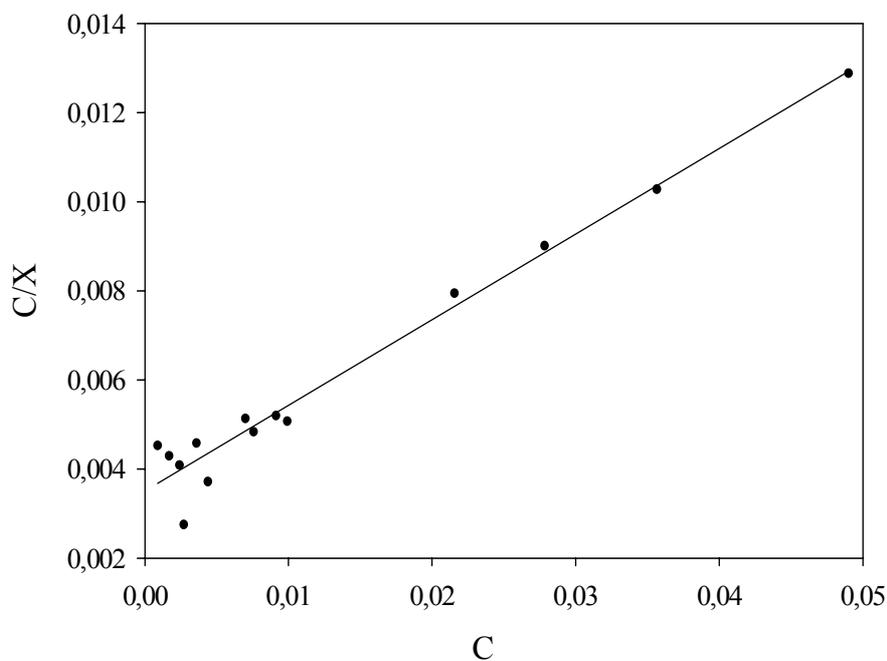


Figura 4.10

Representación gráfica de la isoterma de Langmuir linealizada para la adsorción del extracto crudo de ficocianinas de *Synechocystis aquatilis* sobre Streamline DEAE.

A partir de la isoterma linealizada se pueden obtener los correspondientes parámetros de la isoterma (Tabla 4.16) y del análisis de los mismos la capacidad máxima de adsorción en equilibrio (x_m) obtenida ha sido de 5'2 g/l para el extracto crudo de ficocianinas de *Synechocystis aquatilis*.

Tabla 4.16

Parámetros de ajuste y capacidad máxima de adsorción según Isotherma de Langmuir para la adsorción de C-PC pura y procedente de los diferentes extractos de ficocianinas ensayados.

MUESTRA	a	b	r^2	K (l/g)	X_m (g/l)
C-PC Pura	0'0036	0'091	0'980	25'7	10'9
Extracto <i>Anabaena marina</i> .	0'0058	0'597	0'983	100	1'7
Extracto <i>Spirulina platensis</i> .	0'0076	0'628	0'993	82'5	1'6
Extracto <i>Synechocystis aquatilis</i> .	0'0035	0'190	0'968	54'8	5'2

En resumen, la capacidad máxima de adsorción del relleno Streamline DEAE obtenida para los extractos procedentes de las diferentes algas es de 1'7 g/l para el extracto procedente de *Anabaena marina*, 1'6 g/l para el extracto de *Spirulina platensis* y 5'2 g/l para el de *Synechocystis aquatilis*. La comparación de los resultados con los 10'9 g/l de capacidad máxima de adsorción de C-PC pura sobre el relleno, denota que la capacidad de adsorber ficocianinas por parte del relleno, disminuye considerablemente en presencia de otras proteínas contaminantes que acompañen a las mismas, como es el caso de las disoluciones que constituyen el extracto crudo de ficocianinas proveniente de los tratamientos previos de las diferentes algas. Los resultados obtenidos son similares para el caso de las microalgas *Anabaena marina* y *Spirulina platensis*, lo que indica que son extractos con una composición similar en cuanto a componentes que interactúan con el relleno cromatográfico, siendo el extracto de *Synechocystis aquatilis* algo diferente a los otros dos, pues genera una capacidad de adsorción (X_m) tres veces superior.

Es importante resaltar, que el buen cumplimiento del modelo de adsorción de Langmuir es consistente, debido a que éste suele ajustar bien los datos de sistemas donde hay quimisorción (intercambio iónico en este caso) y superficie homogénea (como la que presenta el Streamline utilizado).

4.2.2.1.2.-Capacidad dinámica (curvas de ruptura).

La realización de las isothermas de adsorción nos permite aproximarnos al conocimiento de los efectos que la hidrodinámica y la transferencia de masa pueden tener sobre el proceso de adsorción trabajando en columna. Así, una vez estimada la capacidad de adsorción en modo estático, que nos da un valor aproximado de la cantidad de proteína que puede adsorber el relleno cromatográfico a utilizar, es necesaria la realización de la curva de ruptura, que determina la capacidad dinámica de adsorción del sistema y que proporciona un valor más cercano al comportamiento real de trabajo en columna que el obtenido mediante las isothermas de adsorción. Estas experiencias se realizan en idénticas condiciones a como se trabaja en columna de CALE y por tanto generan datos de comportamiento de adsorción dinámicos que pueden diferir de los obtenidos de forma estática. En conjunto, los valores obtenidos para la capacidad dinámica y la capacidad estática, permitirán utilizar un valor de capacidad de adsorción que se encuentre muy cerca del óptimo.

Anabaena marina.

Como se describe en el apartado 3.2.2.3.1, para la realización experimental de la curva de ruptura correspondiente al extracto procedente de *Anabaena marina*, se utilizó una columna de 50 · 1'5 cm y la Figura 4.11 muestra la evolución del perfil cromatográfico.

Uno de los criterios más extendidos entre los autores que trabajan en CALE, es determinar la capacidad dinámica del sistema cromatográfico cuando la concentración de la disolución que eluye de la columna (C) alcanza el 10% del valor de la concentración inicial de la muestra (C₀) con que se alimenta a la misma (Karau y col., 1997; Straetkvern y col., 1999; Güzeltunc y Ulgen, 2001; Shepard y col., 2001). De esta forma se puede aplicar la Ecuación 4.3 (Tan y col., 2006) para el cálculo de la capacidad.

$$X_m = \frac{C_0 V_0}{V_s}$$

Ecuación 4.3

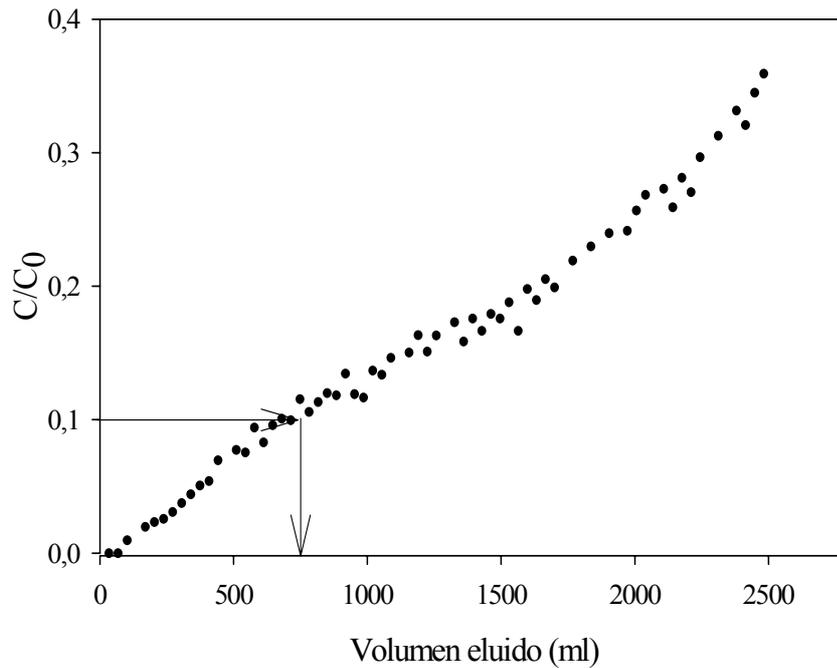


Figura 4.11

Curva de ruptura obtenida por aplicación del extracto crudo de *Anabaena marina* procedente de los tratamientos previos sobre columna de CALE. $C_0=0'031 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

En la Ecuación 4.3, “ C_0 ” es la concentración inicial de la muestra (0'031 mg C-PC/ml), “ V_0 ” es el volumen eluido cuando C/C_0 es igual a 0'1 (784ml) y “ V_s ” es el volumen de lecho sedimentado (27 ml). En estas condiciones la capacidad dinámica estimada ha sido igual a 0'90 mg C-PC/ml adsorbente, valor inferior al estático estimado en 1'7 mg C-PC/ml adsorbente.

Spirulina platensis.

Analogamente se ha procedido a evaluar la capacidad dinámica de adsorción del relleno cromatográfico frente al extracto procedente de *Spirulina platensis* y la Figura 4.12 muestra la evolución del perfil cromatográfico de la curva de ruptura para esta especie.

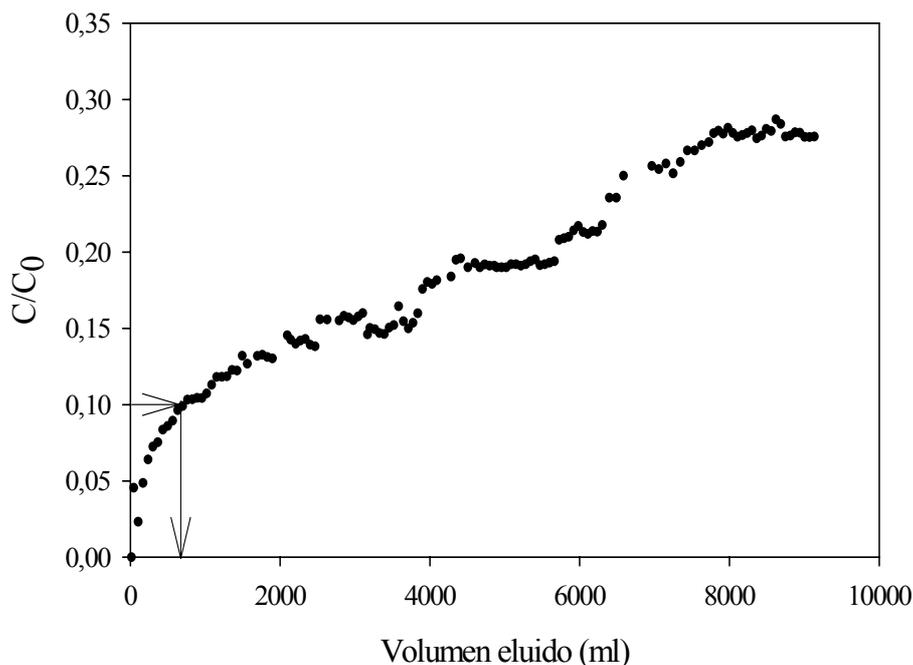


Figura 4.12

Curva de ruptura obtenida por aplicación del extracto crudo de *Spirulina platensis* procedente de los tratamientos previos sobre columna de CALE. $C_0 = 0,030 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Por tanto y siguiendo el criterio de determinar la capacidad dinámica del sistema cromatográfico cuando la concentración de la disolución que eluye de la columna (C) alcanza el 10% del valor de la concentración inicial de la muestra (C_0) con que se alimenta a la misma y aplicando la Ecuación 4.3 podemos determinar X_m . Los valores utilizados fueron: $C_0 = 0,030 \text{ mg C-PC/ml}$, $V_0 = 819 \text{ ml}$ y $V_s = 27 \text{ ml}$, la capacidad dinámica estimada es $0,91 \text{ mg C-PC/ml}$ adsorbente. Al igual que ocurría con *Anabaena marina*, el valor dinámico es inferior al estático estimado en $1,6 \text{ mg C-PC/ml}$ adsorbente.

Synechocystis aquatilis.

Para el caso de la tercera especie microalgal ensayada, *Synechocystis aquatilis*, la Figura 4.13 muestra la evolución del perfil cromatográfico de la curva de ruptura. En este caso los valores para determinar X_m son: $C_0 = 0,033 \text{ mg C-PC/ml}$, $V_0 = 4000 \text{ ml}$ y $V_s = 27 \text{ ml}$, la capacidad dinámica estimada es $4,9 \text{ mg C-PC/ml}$ adsorbente. Al igual que en los dos casos anteriores, el valor dinámico es ligeramente inferior al estático estimado en $5,2 \text{ mg C-PC/ml}$ adsorbente. La Imagen 4.3 muestra el sistema experimental para el desarrollo de la curva de ruptura.

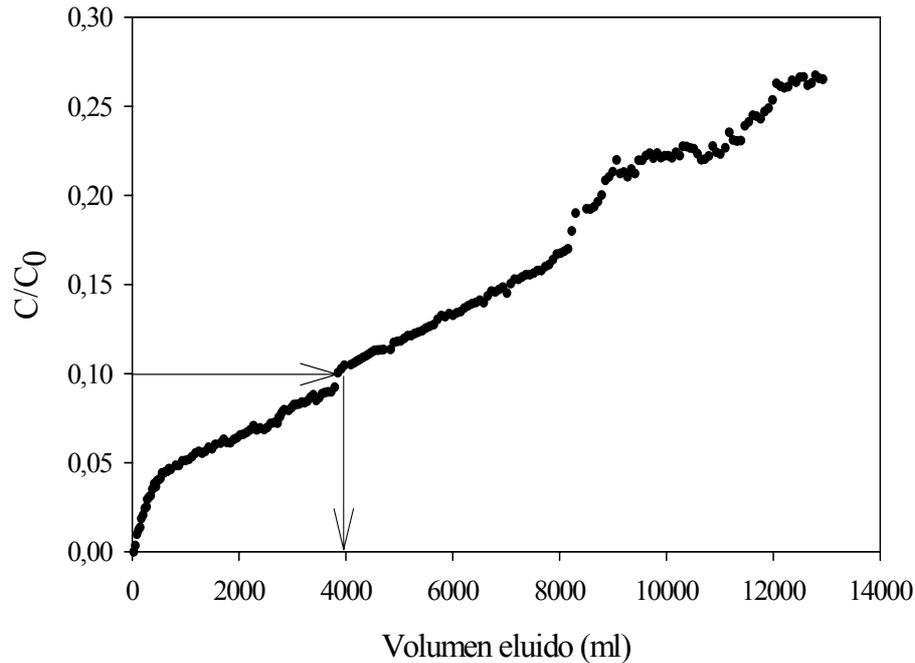


Figura 4.13

Curva de ruptura obtenida por aplicación del extracto crudo de *Synechocystis aquatilis* procedente de los tratamientos previos sobre columna de CALE. $C_0 = 0,033 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

La Tabla 4.17 muestra las capacidades de adsorción determinadas en modo estático y dinámico para los diferentes extractos enriquecidos de ficocianinas. Los valores de capacidad de adsorción de C-PC sobre el relleno Streamline DEAE tanto estática como dinámica, son similares para los extractos procedentes de *Anabaena marina* y *Spirulina platensis*, siendo bastante superiores para el extracto correspondiente a *Synechocystis aquatilis*. Estos resultados indican que la composición global de los dos primeros extractos es muy similar entre sí y bastante diferente a la del extracto procedente de *Synechocystis aquatilis*, lo que produce las diferencias existentes al evaluar el comportamiento de adsorción frente a la matriz cromatográfica empleada. Por otro lado, los valores dinámicos son inferiores a los calculados en modo estático, lo que puede ser atribuido a que en columna y en modo dinámico, no se alcanza totalmente el equilibrio en el proceso de adsorción, lo cual sí ocurre en modo estático al esperar 24 horas para que se produzca dicho proceso.

Tabla 4.17

Capacidades de adsorción determinadas en modo estático y dinámico para los diferentes extractos enriquecidos de ficocianinas. Columna $50 \cdot 1'5$ cm.

MUESTRA	X_m (estático)	X_m (dinámico)
Extracto <i>Anabaena marina</i>	1'7	0'90
Extracto <i>Spirulina platensis</i>	1'6	0'91
Extracto <i>Synechocystis aquatilis</i>	5'2	4'90



Imagen 4.3

Cálculo de la capacidad dinámica de adsorción en CALE utilizando el extracto de ficocianinas procedente de *Synechocystis aquatilis* (Columna $50 \cdot 1'5$ cm).

4.2.2.2.-**Optimización de variables de trabajo.**

Resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación previamente (Bermejo y col., 2006), han conducido a conocer los valores de pH y fuerza iónica idóneos para la adsorción y elución de las ficocianinas de interés sobre el relleno Streamline DEAE. Así, se ha determinado que la mayor parte de moléculas contaminantes que acompañan a las ficocianinas en el extracto crudo procedente de los tratamientos previos, eluyen sin enlazarse al relleno cuando se utiliza como fase móvil tampón fosfato pH 7 (50mM).

En la etapa de aplicación de la muestra, las moléculas que permanecen en el seno del lecho expandido y que no son adsorbidas por el relleno cromatográfico, se eliminan lavando convenientemente el lecho en formato expandido, utilizando en términos generales, un volumen de tampón de equilibrado igual a tres veces el volumen de muestra cargado en la columna. Es importante resaltar que la velocidad de flujo de fase móvil durante la etapa de aplicación de la muestra, se debe variar ligeramente para conseguir mantener un grado de expansión constante, debido a la variación de la viscosidad producida al cambiar de la fase móvil de equilibrado al bombeo de la muestra propiamente dicha. Tras la etapa de aplicación de la muestra y lavado del sistema para eliminar las moléculas no enlazadas, se procede a iniciar la etapa de elución de las ficocianinas utilizando para ello fase móvil compuesta por tampón fosfato pH 7 (500mM). Se ha ensayado el proceso de elución tanto en formato expandido como en formato empaquetado, tratando de obtener el formato óptimo de trabajo en cuanto a grado de concentración de la muestra eluida. Así, para la elución en modo expandido se precisó pasar cuatro veces más volumen de fase móvil para recuperar la misma cantidad de biliproteínas que trabajando en modo empaquetado. Debido a esto, la muestra procedente de la elución es cuatro veces más concentrada cuando se trabaja en modo empaquetado. Es importante resaltar que, en las fracciones eluidas no se detecta material particulado, no siendo por tanto necesario el centrifugarlas para poder obtener los correspondientes espectros de absorción uv-visible (Imagen 4.4).

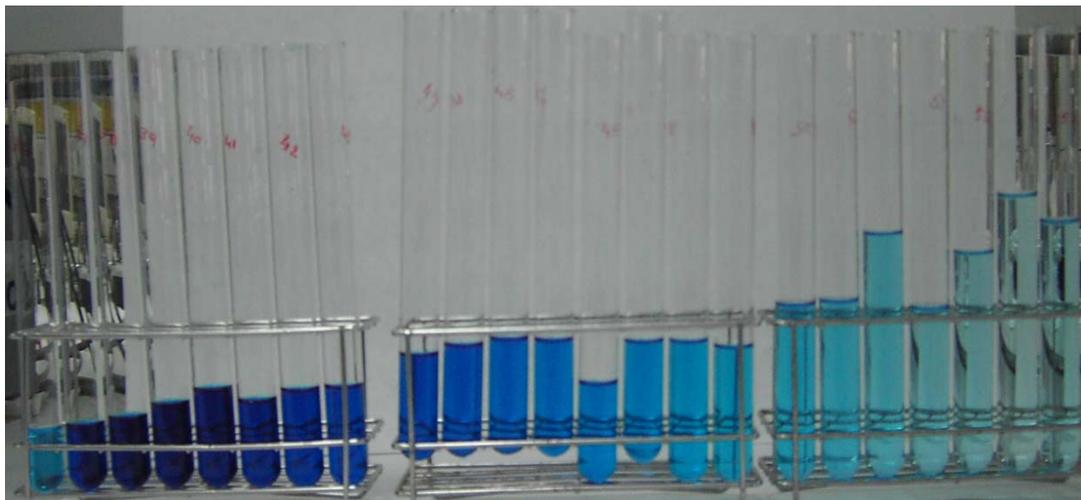


Imagen 4.4

Fracciones obtenidas tras la etapa de elución de ficocianinas en CALE para el caso de la microalga *Synechocystis aquatilis*.

4.2.2.2.1.-Comportamiento hidrodinámico del sistema.

La transformación de un lecho cromatográfico sedimentado en un lecho expandido con la estabilidad requerida, se consigue bombeando de forma adecuada la fase móvil en formato ascendente a través del lecho cromatográfico. Así, se comienza con una velocidad de flujo baja y se va incrementando paulatinamente hasta alcanzar el valor deseado de grado de expansión (H/H_0). En la presente Memoria, todas las experiencias de optimización de las variables de trabajo en CALE, se han realizado utilizando una columna de diámetro interno igual a 1'5 cm para minimizar el gasto de muestra y consumo de reactivos, ahorrando tiempo y economía de proceso. En ella, para alcanzar el grado de expansión correspondiente, es necesario un determinado caudal volumétrico de fase móvil. En la Tabla 4.18 se muestra el caudal volumétrico y velocidad lineal de flujo, necesarias para alcanzar cada valor de H/H_0 ensayado.

La Figura 4.14 muestra que el comportamiento hidrodinámico se ajusta bastante bien a la linealidad para el rango de velocidades empleado, lo cual es fundamental para un buen desarrollo en CALE.

Tabla 4.18

Comportamiento hidrodinámico de la columna Streamline DEAE (50 · 1'5 cm)
para cada uno de los valores de grado de expansión ensayados.

H/ H ₀	Caudal (ml/min)	Velocidad (cm/h)
1'6	6'1	208
1'8	7'8	264
2'0	9'6	326
2'2	10'1	344
2'4	12'3	418
2'6	14'5	492
2'8	16'1	548
3'0	18'0	614

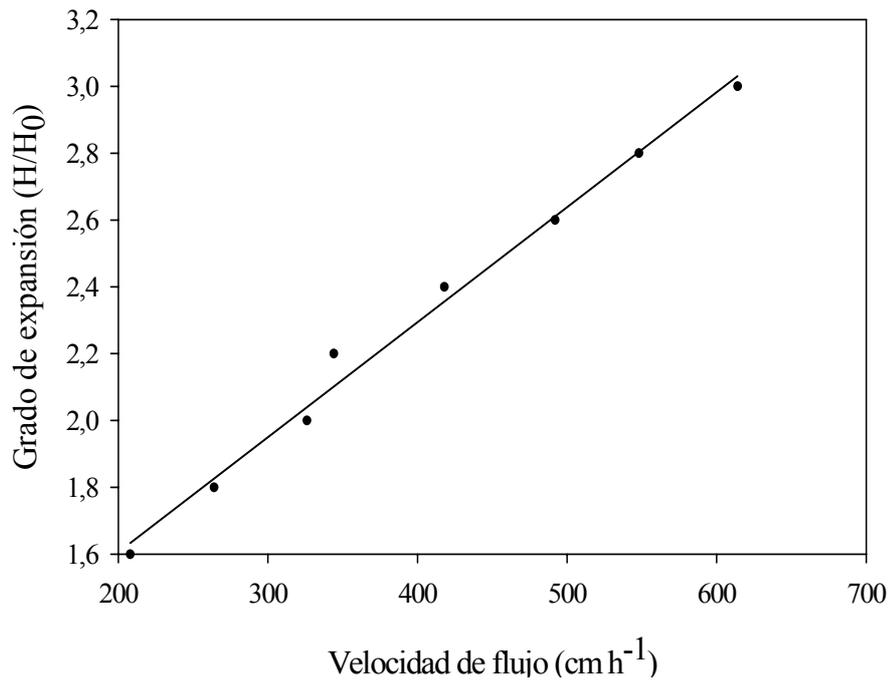


Figura 4.14

Expansión relativa de la columna de adsorción en lecho expandido en función del caudal bombeado de fase móvil. Los parámetros de regresión obtenidos son ($y=a+bx$): $a=0'917$, $b=0'0034$, $r^2=0'990$.

4.2.2.2.2.-Influencia del grado de expansión.

El grado de expansión del lecho (H/H_0) es una variable de trabajo en CALE que suele estar comprendida entre 2 y 3 (Chase, 1994). El valor óptimo a utilizar va a ser función directa del tipo de materia prima de la que proceda el extracto que se va a cargar en la columna. Así, se han realizado experiencias para la optimización del grado de expansión, buscando encontrar el mejor valor del mismo respecto del porcentaje de recuperación proteica.

Los resultados obtenidos en la optimización del grado de expansión del lecho para los diferentes extractos de ficocianinas procedentes de las distintas algas ensayadas se muestran en la Tabla 4.19 y en la Figura 4.15.

Tabla 4.19
Influencia del grado de expansión en el porcentaje de recuperación de C-PC tras cromatografía de adsorción de lecho expandido.

Grado de expansión (H/H_0)	<i>Anabaena marina</i>	<i>Spirulina platensis</i>	<i>Synechocystis aquatilis</i>
	Recuperación C-PC (%)	Recuperación C-PC (%)	Recuperación C-PC (%)
1'8	86'4	61'0	78'8
2'0	87'0	70'5	84'6
2'2	86'8	69'4	79'2
2'4	83'5	67'5	75'1
2'6	79'6	64'6	69'2
2'8	78'5	64'0	67'1

Los resultados obtenidos denotan que el mayor porcentaje de recuperación se obtiene con un grado de expansión igual a 2, disminuyendo el % de recuperación cuando los valores de H/H_0 se hacen mayores o menores a este valor. De esta forma, se puede cifrar en 2 el valor óptimo del grado de expansión para los tres casos de biomasa microalgal ensayados.

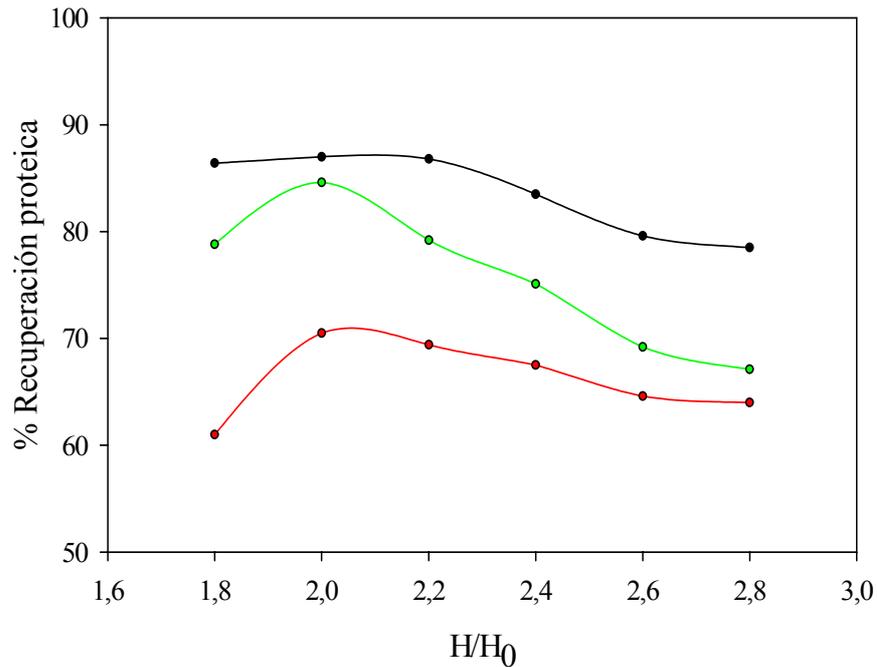


Figura 4.15

Influencia del grado de expansión en el porcentaje de recuperación de C-PC tras CALE para los extractos provenientes de *Anabaena marina* (—), *Spirulina platensis* (—) y *Synechocystis aquatilis* (—).

Es importante indicar que las condiciones óptimas para la operación en lecho expandido son aquellas que combinan una disminución en el tiempo de proceso y a la vez producen un aumento de rendimiento, lo que genera una mejora en la productividad del sistema (Chase, 1994; Ghose y Chase, 2000 a y b). En este sentido, velocidades de flujo inferiores a las que producen el grado de expansión óptimo, generan resistencias elevadas a la transferencia de masa y por tanto bajos valores de rendimiento en la recuperación del producto. Por el contrario, los valores de velocidad de flujo superiores al óptimo, aunque producen una disminución importante de la resistencia a la transferencia de masa, hacen que la distancia entre las partículas del relleno aumente, produciendo una menor adsorción de la proteína de interés en la matriz que constituye el material adsorbente. El valor del grado de expansión encontrado como óptimo es muy similar a los determinados previamente por nuestro grupo de investigación trabajando en CALE con extractos de biliproteínas procedentes de *Porphyridium cruentum* (Bermejo y col., 2003a; 2007). Además, otros autores (Artolozaga y col., 1998; Hu y col., 2000; Roy y Gupta, 2000) trabajando con materias primas muy diferentes, también proponen este valor como parámetro de trabajo, lo que soporta la idea de que un valor de grado de expansión

igual a dos produce, en términos generales, buenos resultados independientemente de la naturaleza del extracto utilizado.

4.2.2.2.3.-Influencia de la viscosidad.

Otra de las variables que tiene especial importancia en el desarrollo del proceso de CALE es la viscosidad de la muestra. Usualmente, la aplicación de extractos crudos que no han sido convenientemente diluidos a los sistemas de lecho expandido, causan flujo distorsionado y distribución desigual y no homogénea de la muestra debido a su alta viscosidad (Chase, 1994). Debido a esto, se ha estudiado la influencia de la viscosidad de la muestra en el comportamiento del sistema y en el rendimiento de recuperación proteico. Para ello, se han realizado diferentes experiencias de CALE en columna de $50 \cdot 1'5$ cm, manteniendo constantes los parámetros ya optimizados (altura de relleno $H_0=15$ cm, grado de expansión $H/H_0=2$ y la capacidad dinámica de adsorción correspondiente) y variando la viscosidad de la muestra.

Anabaena marina.

Los resultados obtenidos en las experiencias de optimización de la viscosidad de la muestra para EBA con extracto de C-PC procedente de *Anabaena marina* (para las cuales se han utilizado las condiciones de trabajo ya optimizadas que suponen una carga de proteína $X_m=0'90$ mg C-PC/ml y un grado de expansión igual a dos) se muestran en la Tabla 4.20.

Tabla 4.20

Influencia de la viscosidad de la muestra de C-PC de *Anabaena marina*
en el porcentaje de recuperación. $[C-PC]_{\text{extracto}}=0'33$ mg/ml.

VISCOSIDAD (mP)	Volumen muestra (ml)	Recuperación C-PC (%)	Tiempo aplicación (min)
1'109(extracto)	70'5	87'0	11
1'056	141	87'0	25
1'036	211	88'0	37
1'025	271	91'0	41

(*) Viscosidad del tampón fosfato pH 7 (50mM) = 1'024 mP.

A la vista de los resultados, el rendimiento de recuperación de C-PC es máximo para el menor valor de viscosidad, que corresponde a 1'025 mP con un rendimiento de recuperación de 91%. En términos generales, el aumento de viscosidad en el medio produce una disminución

del coeficiente de difusión de las moléculas y esto reduce la efectividad del proceso de adsorción de las ficocianinas de interés sobre la superficie del relleno cromatográfico utilizado. Parece lógico pensar, que a medida que la viscosidad de la muestra se parece más a la del tampón de aplicación, el proceso mejora en rendimiento debido a que la entrada de la muestra en la columna no se diferencia prácticamente de la entrada del tampón en la fase de equilibrio. Sin embargo, se opta por elegir el valor 1'109 mP (viscosidad del extracto de ficocianinas procedente de los tratamientos previos) como viscosidad de trabajo ya que a pesar de presentar un rendimiento de recuperación inferior, no lo es significativamente, mientras que la reducción en el tiempo de operación (debido a que los volúmenes de trabajo son menores), sí supone un factor a tener en cuenta, sobre todo cuando se realice el escalado del proceso con vistas a obtener la mayor cantidad de proteínas posible. Así, el elevar el rendimiento de recuperación cuatro puntos porcentuales requiere prácticamente triplicar el tiempo de operación.

Spirulina platensis.

Analogamente, los resultados obtenidos en las experiencias de optimización de la viscosidad de la muestra para EBA con extracto de C-PC procedente de *Spirulina platensis* (para las cuales se han utilizado las condiciones de trabajo ya optimizadas que suponen una capacidad dinámica de adsorción $X_m = 0'91$ mg C-PC/ml y un grado de expansión igual a dos) se muestran en la Tabla 4.21.

Tabla 4.21

Influencia de la viscosidad de la muestra de C-PC de *Spirulina platensis*
en el porcentaje de recuperación. $[C-PC]_{\text{extracto}} = 0'30$ mg/ml.

VISCOSIDAD (mP)	Volumen muestra (ml)	Recuperación C-PC (%)	Tiempo aplicación (min)
1'084(extracto)	80	75'0	13
1'052	160	74'8	25
1'038	240	75'2	36
1'030	320	76'2	49

(*) Viscosidad del tampón fosfato pH 7 (50mM) = 1'024 mP.

De forma similar a lo que ocurría con *Anabaena marina*, el rendimiento de recuperación de C-PC es máximo para el menor valor de viscosidad, que corresponde a 1'030 mP con un rendimiento de recuperación de 76'2%. Así, a medida que la viscosidad de la muestra se parece

más a la del tampón de aplicación, el proceso mejora en rendimiento debido a que la entrada de la muestra en la columna no se diferencia prácticamente de la entrada del tampón en la fase de equilibrado. No obstante, se opta por elegir el valor 1'084 mP (viscosidad del extracto de ficocianinas procedente de los tratamientos previos) como viscosidad de trabajo, ya que a pesar de presentar un rendimiento de recuperación inferior, no lo es significativamente, mientras que la reducción en el tiempo de operación (debido a que los volúmenes de trabajo son menores) sí supone un factor a tener en cuenta, sobre todo cuando se realice el escalado del proceso con vistas a obtener la mayor cantidad de proteínas posible.

Synechocystis aquatilis.

Con el extracto de C-PC procedente de *Synechocystis aquatilis* y con las condiciones de trabajo previamente optimizadas ($X_m = 4.9$ mg C-PC/ml y $H/H_0 = 2$) se han obtenido los resultados que se muestran en la Tabla 4.22.

Tabla 4.22

Influencia de la viscosidad de la muestra de C-PC de *Synechocystis aquatilis* en el porcentaje de recuperación. $[C-PC]_{\text{extracto}} = 1.49$ mg/ml.

VISCOSIDAD (mP)	Volumen muestra (ml)	Recuperación C-PC (%)	Tiempo aplicación (min)
1'157(extracto)	58	83'0	10
1'053	116	84'6	20
1'048	145	88'9	23
1'025	174	91'0	28

(*) Viscosidad del tampón fosfato pH 7 (50mM) = 1'024 mP.

A la vista de los resultados, el rendimiento de recuperación de C-PC es máximo para el menor valor de viscosidad, que corresponde a 1'025 mP con un rendimiento de recuperación de 91%. A diferencia con las dos especies de microalgas anteriores (*Anabaena marina* y *Spirulina platensis*), en este caso sí hay una diferencia importante entre el rendimiento obtenido con el extracto ($\mu = 1.157$ mP) y el obtenido con la muestra de menor viscosidad. Además no hay un incremento tan importante en el tiempo de aplicación y en todo caso, ahora sí estaría justificado, por la importante diferencia de rendimientos, la utilización de la dilución correspondiente para llegar a una viscosidad de 1'025 mP.

La Figura 4.16 muestra la evolución del % de recuperación proteico obtenido en función de la viscosidad para las tres especies microalgales ensayadas.

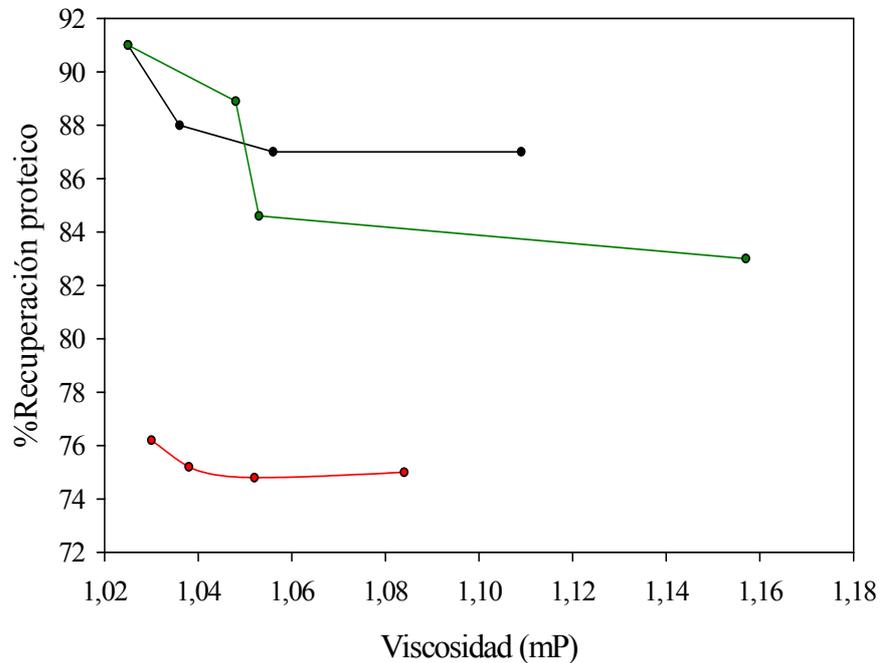


Figura 4.16

Influencia de la viscosidad de la muestra en el porcentaje de recuperación de C-PC en CALE para los extractos provenientes de *Anabaena marina* (—), *Spirulina platensis* (—) y *Synechocystis aquatilis* (—) en el rendimiento de recuperación proteico.

Se puede decir por tanto, que exceptuando el extracto de *Synechocystis aquatilis*, donde parece claro la ventaja de la dilución para disminuir la viscosidad y aumentar el rendimiento de recuperación proteico, los dos restantes pueden ser aplicados de forma directa al sistema cromatográfico con el ahorro que éste supone en términos de economía de proceso. Es importante resaltar que en ningún caso la aplicación de los extractos generó efecto “channelling” o formación de canales preferentes, lo que sin duda de haberse producido hubiera provocado un descenso importante en los rendimientos.

4.2.2.3.-Escalado del proceso.

La utilización de la metodología CALE tiene la ventaja de ser potencialmente una tecnología susceptible de ser escalada, con el objetivo de utilizarla para la obtención de cantidades apreciables de las proteínas de interés, con el fin de poder ser utilizadas en aplicaciones tales como la de colorantes naturales en los sectores de alimentación y bebidas. Así, el proceso de CALE puede ser fácilmente escalado mediante el incremento del diámetro de la columna de trabajo y manteniendo constantes parámetros de proceso tales como: altura de lecho sedimentado, grado de expansión, velocidad de flujo, carga proteica (capacidad de adsorción) y viscosidad de la muestra (Chase, 1994). Como estos parámetros han sido optimizados anteriormente, se ha procedido a estudiar la influencia en el proceso de CALE del aumento en el diámetro de la columna como única variable de escalado, utilizando la metodología que se describe en el apartado 3.2.2.3.2.

4.2.2.3.1.-Columna de 1'5 cm.

Inicialmente, una vez optimizados los principales parámetros de proceso (capacidad de adsorción del relleno, el grado de expansión y la viscosidad de la muestra), se ha procedido al desarrollo de una experiencia óptima en la pequeña escala de producción usando una columna de 50 · 1'5 cm. Los parámetros de trabajo han sido: altura del relleno $H_0=15$ cm, grado de expansión $H/H_0= 2$, carga proteica y viscosidad (los óptimos correspondientes a cada extracto microalgal), fase móvil de equilibrado y lavado tampón fosfato pH 7 (50 mM) y fase de elución tampón fosfato pH 7 (500mM). En todos los experimentos el comportamiento del lecho expandido estuvo cercano a la idealidad, observándose un ascenso homogéneo de la muestra a través del lecho de la columna sin formación de canales preferentes y con ausencia de movimientos convectivos y de traslación de las partículas que conforman el relleno cromatográfico (Imagen 4.5).



Imagen 4.5

Detalle de la aplicación de la muestra (extracto crudo de ficocianinas) procedente de *Anabaena marina* a la columna de CALE. El avance de la muestra a través del lecho cromatográfico es homogéneo y sin formación de canales preferentes.

Anabaena marina.

La viscosidad y la capacidad de adsorción utilizadas para el extracto de C-PC proveniente de *Anabaena marina* han sido 1'109 mP y 0'90 mg C-PC/ml adsorbente respectivamente. Los tiempos de operación empleados para esta columna se muestran en Tabla 4.29.

Para seguir la evolución del proceso de CALE se ha procedido a monitorizar todas las subetapas que lo componen, midiendo espectrofotométricamente las fracciones recogidas a la salida de la columna. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.23 y 4.24 del Anexo 1 de esta Memoria. En algunas de las fracciones correspondientes a la etapa de elución, fue necesaria la dilución para poder medir correctamente el espectro de absorción correspondiente.

Por ello, la absorbancia corregida (A_{615co}) que se utiliza para representar los perfiles cromatográficos que describen estas experiencias, es el resultado de multiplicar la absorbancia medida en el espectro por el factor de dilución (FD) empleado.

La Figura 4.17 muestra el perfil cromatográfico de la experiencia de CALE para el extracto de C-PC procedente de *Anabaena marina*, donde se puede seguir el valor de la absorbancia a 615 nm (característica de C-PC) en función del volumen eluído en cada momento, como variable de monitorización empleada para el seguimiento del proceso completo de CALE.

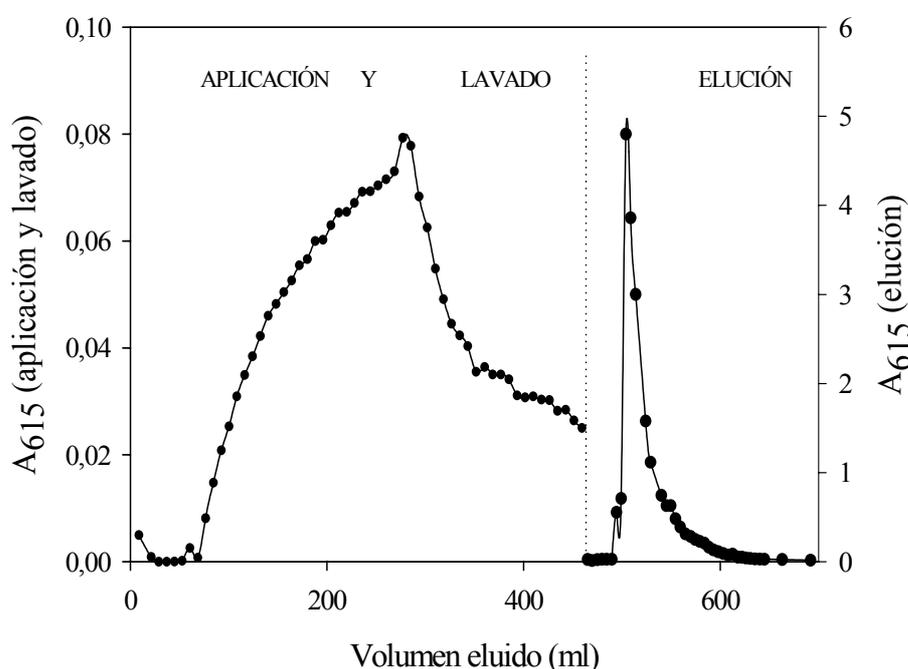


Figura 4.17

Perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de $50 \cdot 1'5$ cm.

Microalga *Anabaena marina*. Volumen extracto aplicado= 234 ml. $[C-PC]_{\text{extracto}} = 0'1$ mg/ml.

Vflujo (aplicación y lavado)= 227 cm h^{-1} . Vflujo (elución)= 257 cm h^{-1} .

La cantidad de C-PC recuperada durante la etapa de lecho expandido para el extracto proveniente de *Anabaena marina*, expresada como porcentaje de la cantidad total en el eluido por cantidad de biliproteína cargada en la matriz cromatográfica mediante aplicación de la muestra es igual a 86'1% (Ver Tablas 4.23 y 4.24 del Anexo 1), lo que indica que la pérdida de biliproteínas producidas durante el proceso de lecho expandido (etapas de aplicación y lavado)

ha sido bastante baja, debido a la optimización previa de los parámetros de operación más importantes en CALE.

El análisis del espectro de absorción uv-visible de la disolución procedente de la recopilación de las fracciones procedentes de la etapa de elución, denota que se trata de un extracto rico en ficocianinas donde predomina mayoritariamente C-PC (Figura 4.18). El espectro muestra una considerable y significativa pérdida de absorción en la banda de la región del ultravioleta cercano si lo comparamos con el espectro correspondiente al extracto crudo de ficocianinas procedente de los tratamientos previos. Además, la relación espectroscópica ($A_{615}/A_{280}=2$) es característica de una disolución enriquecida en C-PC y resulta cinco veces mayor que la misma relación correspondiente al extracto crudo procedente de los tratamientos previos ($A_{615}/A_{280} = 0'4$).

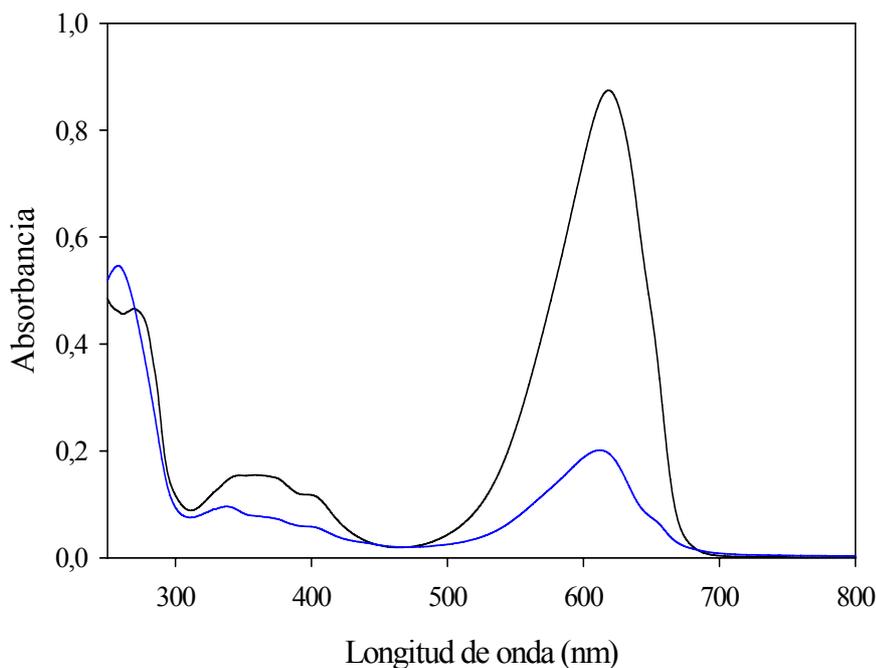


Figura 4.18

Espectros de absorción uv-visible de la disolución rica en ficocianinas procedente de CALE (—) y del extracto crudo procedente de los tratamientos previos (—). Microalga *Anabaena marina*.

***Spirulina platensis*.**

En el caso de la microalga *Spirulina platensis*, la viscosidad y la capacidad de adsorción utilizadas para el extracto de C-PC han sido de 1'084 mP y 0'91 mg C-PC/ml adsorbente respectivamente. Los tiempos de operación empleados para esta columna se muestran en Tabla 4.29.

Análogamente, la evolución del proceso de CALE se ha monitorizado espectrofotométricamente y los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.25 y 4.26 (Anexo 1). La Figura 4.19 muestra el perfil cromatográfico de la experiencia de CALE para el extracto de C-PC procedente de *Spirulina platensis*, donde se puede seguir el valor de la absorbancia a 615 nm característica de C-PC en función del volumen eluido en cada momento como variable de monitorización del proceso completo de CALE.

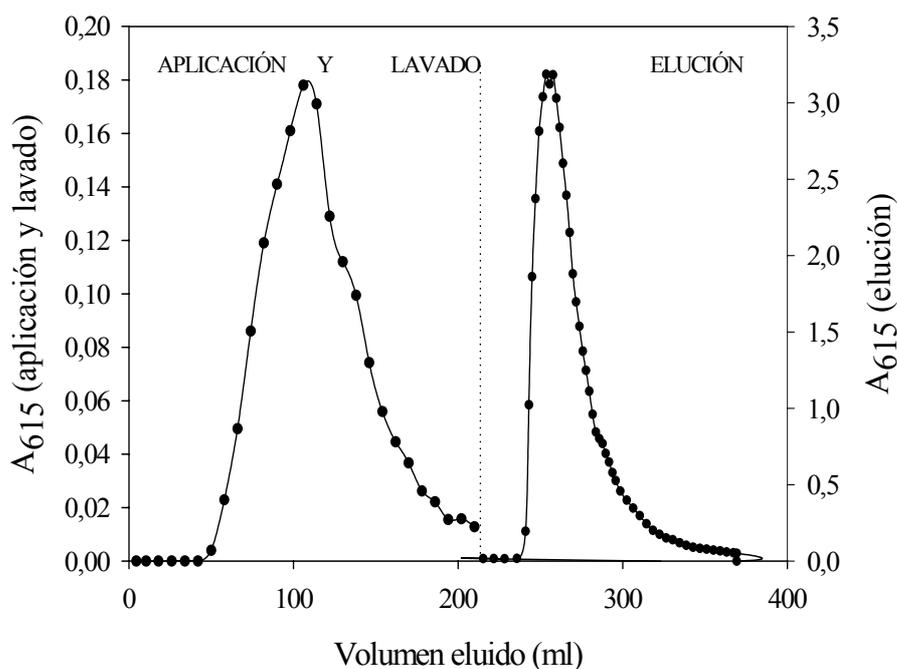


Figura 4.19

Perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de $50 \cdot 1'5$ cm.

Microalga *Spirulina platensis*. Volumen extracto aplicado= 80 ml. $[C-PC]_{\text{extracto}} = 0'3$ mg/ml.

Vflujo(aplicación y lavado)= 230 cm h^{-1} . Vflujo (elución)= 209 cm h^{-1} .

En esta experiencia la cantidad de C-PC recuperada durante la etapa de lecho expandido para el extracto proveniente de *Spirulina platensis*, expresada como porcentaje de la cantidad

total en el eluido por cantidad de biliproteína cargada en la matriz cromatográfica mediante aplicación de la muestra es igual al 75'5% (ver Tablas 4.25 y 4.26 del Anexo 1), lo que indica que la pérdida de biliproteínas producidas durante el proceso de lecho expandido (etapas de aplicación y lavado) ha sido baja, al igual que ocurría con *Anabaena marina*.

El análisis del espectro de absorción uv-visible de la disolución procedente de la recopilación de las fracciones procedentes de la etapa de elución, denota que se trata de un extracto rico en ficocianinas donde predomina mayoritariamente C-PC (Figura 4.20) El espectro muestra una considerable y significativa pérdida de absorción en la banda de la región del ultravioleta cercana si lo comparamos con el espectro correspondiente al extracto crudo de ficocianinas procedente de los tratamientos previos. La relación espectroscópica A_{615}/A_{280} resulta casi cinco veces mayor ($A_{615}/A_{280}= 0'87$) que la misma relación correspondiente al extracto crudo procedente de los tratamientos previos ($A_{615}/A_{280}= 0'19$).

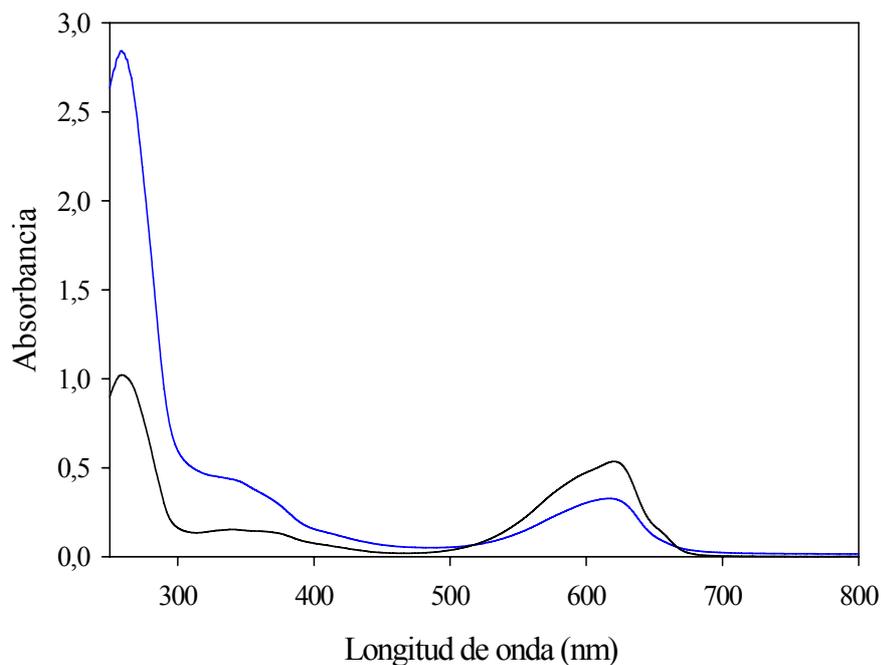


Figura 4.20

Espectros de absorción uv-visible de la disolución rica en ficocianinas procedente de CALE (—) y del extracto crudo procedente de los tratamientos previos (—). Microalga *Spirulina platensis*.

***Synechocystis aquatilis*.**

La viscosidad y capacidad de adsorción utilizadas para el extracto de C-PC proveniente de *Synechocystis aquatilis* han sido 1'025 mP y 4'9 mg C-PC/ml adsorbente respectivamente. Los tiempos de operación empleados para esta columna se muestran en Tabla 4.29.

Análogamente a lo realizado con las demás microalgas, se ha procedido a monitorizar todas las subetapas midiendo espectrofotométricamente las fracciones recogidas a la salida de la columna y los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.27 y 4.28 (Anexo 1).

La Figura 4.21 muestra el perfil cromatográfico de la experiencia de CALE para el extracto de C-PC procedente de *Synechocystis aquatilis*, donde se puede seguir el valor de la absorbancia a 615 nm característica de C-PC en función del volumen eluido en cada momento como variable de monitorización del proceso completo de CALE.

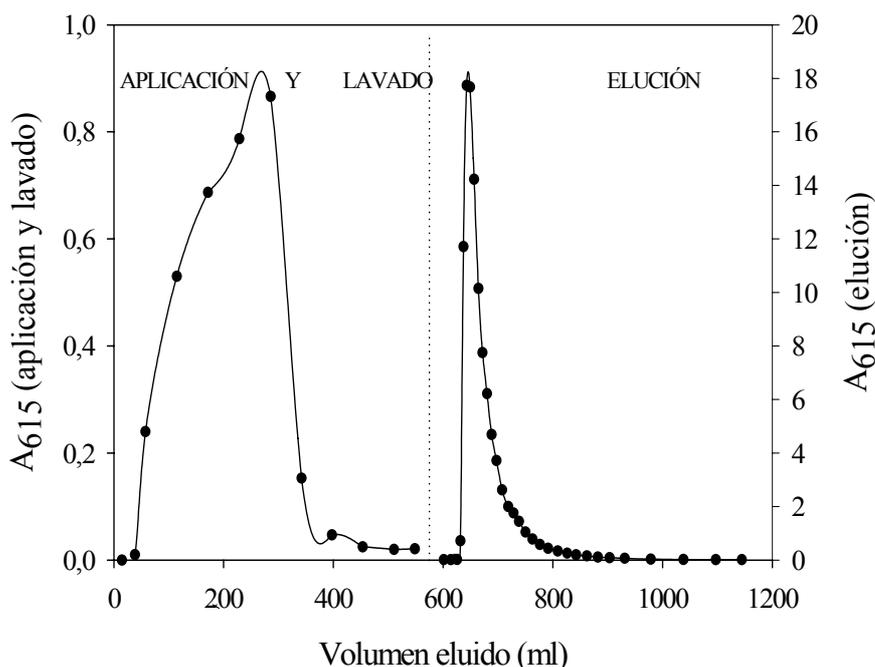


Figura 4.21

Perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de 50 · 1'5 cm.

Microalga *Synechocystis aquatilis*. Volumen extracto aplicado= 261 ml.

$[C-PC]_{\text{extracto}} = 0'50 \text{ mg/ml}$. $V_{\text{flujo}}(\text{aplicación y lavado}) = 253 \text{ cm h}^{-1}$. $V_{\text{flujo}}(\text{elución}) = 203 \text{ cm h}^{-1}$.

La cantidad de C-PC recuperada durante la etapa de lecho expandido para el extracto proveniente de *Synechocystis aquatilis*, expresada como porcentaje de la cantidad total en el eluido por cantidad de biliproteína cargada en la matriz cromatográfica mediante aplicación de la muestra es igual al 90'8 % (ver Tablas 4.27 y 4.28 del Anexo 1).

El análisis del espectro de absorción uv-visible de la disolución procedente de la recopilación de las fracciones recogidas en la etapa de elución, denota que se trata de un extracto rico en ficocianinas donde predomina mayoritariamente C-PC (Figura 4.22). El espectro muestra una considerable y significativa pérdida de absorción en la banda de la región del ultravioleta cercana si lo comparamos con el espectro correspondiente al extracto crudo de ficocianinas procedente de los tratamientos previos. Además la relación espectroscópica A_{615}/A_{280} , que es característica de una disolución enriquecida en C-PC resulta cuatro veces mayor ($A_{615}/A_{280} = 2'6$) que la misma relación correspondiente al extracto crudo procedente de los tratamientos previos ($A_{615}/A_{280} = 0'6$).

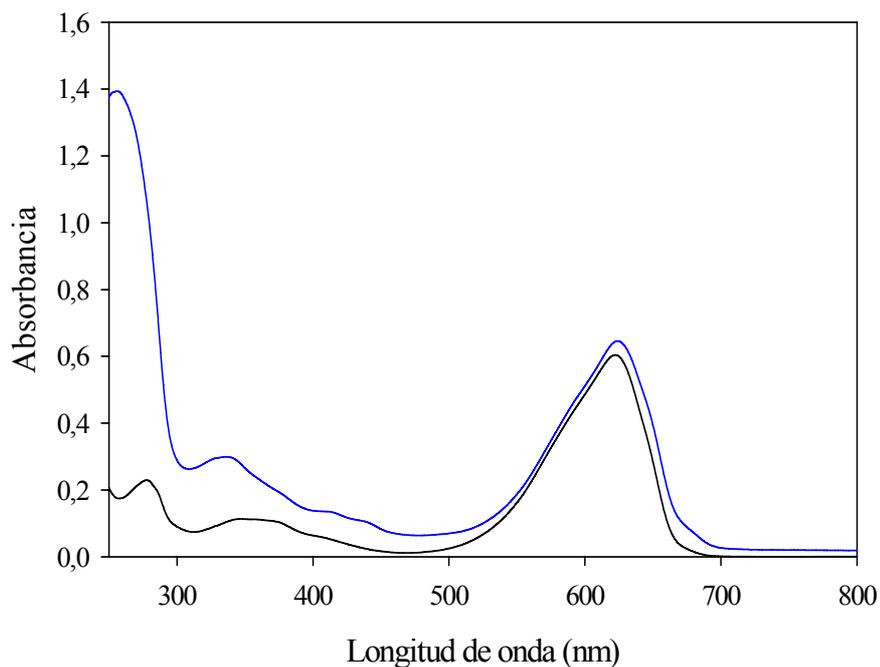


Figura 4.22

Espectros de absorción uv-visible de la disolución rica en ficocianinas procedente de CALE (—) y del extracto crudo procedente de los tratamientos previos (—). Microalga *Synechocystis aquatilis*.

Para los tres casos de microalgas ensayadas, se puede observar en el perfil cromatográfico, que las fracciones correspondientes a la fase de elución constituyen un pico estrecho y bien definido, que implica un elevado factor de concentración de la muestra conseguido en formato lecho empaquetado. Es de reseñar, que los parámetros obtenidos trabajando en esta columna, como por ejemplo el factor de concentración (expresado como volumen de lecho expandido/volumen de muestra eluida), son similares a los reportados previamente por otros autores con muestras de origen celular diferentes (Chang y col., 1993; Güzeltunc y Ulgen, 2001) y a los obtenidos por nuestro grupo de investigación trabajando con otras microalgas como fuente de biliproteínas (Bermejo y col., 2003a; 2007).

Respecto al aumento notable que se produce en la relación A_{615}/A_{280} tras el paso de la muestra por la columna cromatográfica, éste indica que la etapa de CALE produce un avance notable en la purificación de C-PC por eliminación de buena parte de las moléculas que la acompañaban en el extracto: clorofilas, carotenos y otras proteínas de diferente procedencia.

Por tanto, con este proceso se consigue un alto rendimiento de recuperación de las ficocianinas, con un elevado grado de pureza en las mismas, pudiendo sustituir a etapas de baja resolución que se han venido utilizando con anterioridad y que normalmente producen como resultado una pérdida mucho mayor de ficocianinas y consecuentemente rendimientos inferiores, además de necesitar tiempos superiores (Boussiba y Richmond, 1979; Gombos y col., 1984; Glazer, 1988a; Jung y Dailey, 1989; Duerring y col., 1991; Hilditch y col., 1991; Bermejo y col., 1997; Moreno y col., 1997; Tchernov y col., 1999; Campanella y col., 2000).

La Tabla 4.29 muestra los tiempos de operación empleados en cada una de las etapas del proceso de CALE para la columna de $50 \cdot 1'5$ cm.

Los resultados de la Tabla no son comparables totalmente, ya que los volúmenes de muestra aplicados para cada microalga variaron, así como las cantidades de ficocianinas cargadas, que dependen de la capacidad máxima de adsorción. Así, fueron similares para el caso de *Anabaena marina* y *Spirulina platensis* (0'90 y 0'91 mg/ml) y sin embargo muy diferentes para el caso de *Synechocystis aquatilis* (4'9 mg/ml).

Tabla 4.29
 Tiempos de operación en las etapas de CALE en columna de 50 · 1'5 cm
 para los diferentes extractos de C-PC.

SUBETAPA	Extracto de <i>Anabaena</i>	Extracto de <i>Spirulina</i>	Extracto de <i>Synechocystis</i>
	<i>marina</i> .	<i>platensis</i> .	<i>aquatilis</i> .
	TIEMPO (min)	TIEMPO (min)	TIEMPO (min)
Equilibrado	30	30	30
Aplicación	35	12	35
Lavado	38	24	38
Elución	30	30	93
Limpieza	45	45	45
TOTAL	178	141	241

4.2.2.3.2.-Columna de 2'5 cm.

Siguiendo con el protocolo del proceso de escalado, se ha procedido a ir utilizando columnas con diámetro interno creciente. Así, se ha desarrollado una experiencia óptima en columna de 50 · 2'5 cm, utilizando como parámetros de trabajo: altura del relleno $H_0=15$ cm, grado de expansión $H/H_0=2$, carga proteica y viscosidad correspondiente, fase móvil de equilibrado y lavado tampón fosfato pH 7 (50 mM) y fase de elución tampón fosfato pH 7 (500mM). Al igual que sucedió con la columna de 50 · 1'5 cm, en todos los experimentos el comportamiento del lecho expandido estuvo cercano a la idealidad.

Anabaena marina.

La viscosidad y capacidad de adsorción utilizadas para el extracto de C-PC proveniente de *Anabaena marina* son 1'109 mP y 0'9 mg C-PC/ml adsorbente respectivamente. Los tiempos de operación empleados para esta columna se muestran en Tabla 4.36. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.30 y 4.31 (Anexo 2).

La Figura 4.23 muestra el perfil cromatográfico de la experiencia de CALE para el extracto de C-PC procedente de *Anabaena marina*, donde se puede seguir el valor de la absorbancia a 615 nm característica de C-PC en función del volumen eluido en cada momento como variable de monitorización del proceso completo de CALE.

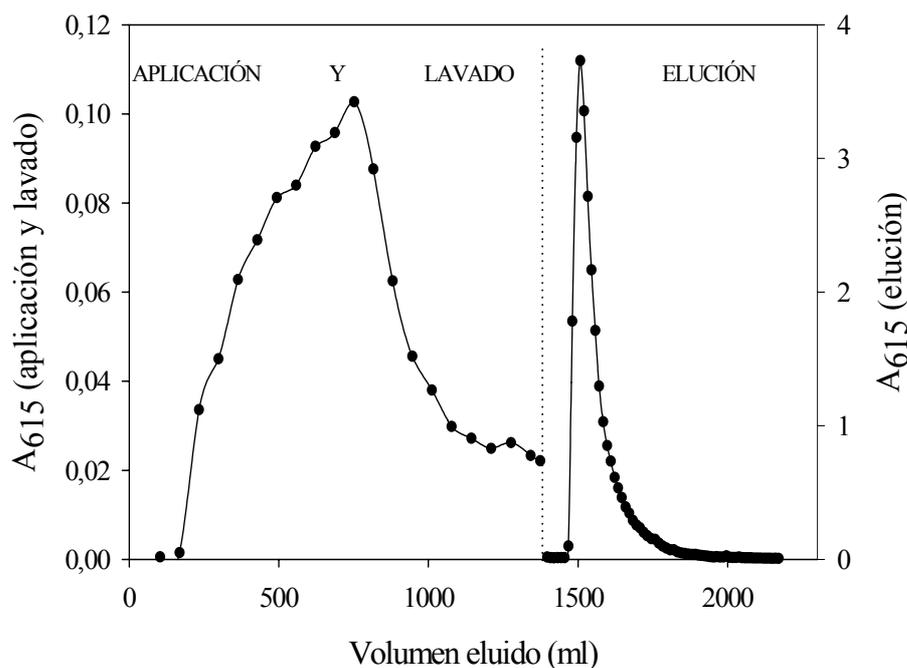


Figura 4.23

Perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de $50 \cdot 2'5$ cm.

Microalga *Anabaena marina*. Volumen extracto aplicado= 645 ml. $[C-PC]_{\text{extracto}} = 0'1$ mg/ml.

$V_{\text{flujo}}(\text{aplicación y lavado}) = 192$ cm h^{-1} . $V_{\text{flujo}}(\text{elución}) = 245$ cm h^{-1} .

La cantidad de C-PC recuperada durante la etapa de lecho expandido en columna de $2'5$ cm de diámetro para el extracto proveniente de *Anabaena marina*, expresada como porcentaje de la cantidad total en el eluido por cantidad de biliproteína cargada en la matriz cromatográfica mediante aplicación de la muestra es igual al 82'8 % (ver Tablas 4.30 y 4.31 del Anexo 2). La Imagen 4.6 muestra el colector automático de fracciones, con los tubos donde se recogen las ficocianinas adsorbidas sobre el relleno Streamline en la fase de aplicación y desorbidas convenientemente en la fase de elución.

Spirulina platensis.

Para el caso de la microalga *Spirulina platensis*, la viscosidad y capacidad de adsorción utilizadas para el extracto de C-PC han sido 1'084 mP y 0'91 mg C-PC/ml adsorbente respectivamente. Los tiempos de operación empleados para esta columna se muestran en Tabla 4.36. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.32 y 4.33 (Anexo 2).

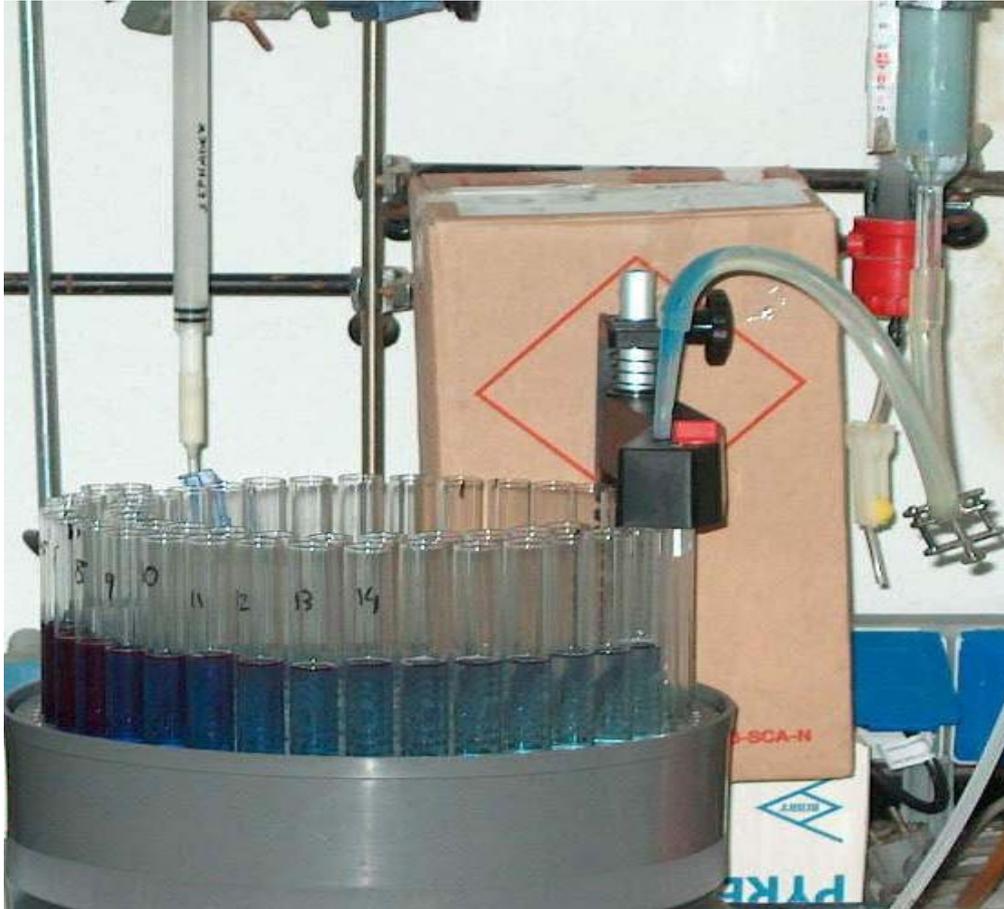


Imagen 4.6

Detalle de las fracciones recogidas durante la etapa de elución en CALE para la microalga *Anabaena marina*.

La Figura 4.24 muestra el perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de 2'5 cm de diámetro para el extracto de C-PC procedente de *Spirulina platensis*, donde se puede seguir el valor de la absorbancia a 615 nm característica de C-PC en función del volumen eluido en cada momento como variable de monitorización del proceso completo de CALE.

La cantidad de C-PC recuperada durante la etapa de lecho expandido para el extracto proveniente de *Spirulina platensis*, expresada como porcentaje de la cantidad total en el eluido por cantidad de biliproteína cargada en la matriz cromatográfica mediante aplicación de la muestra es igual al 74'2% (ver Tablas 4.32 y 4.33 del Anexo 2).

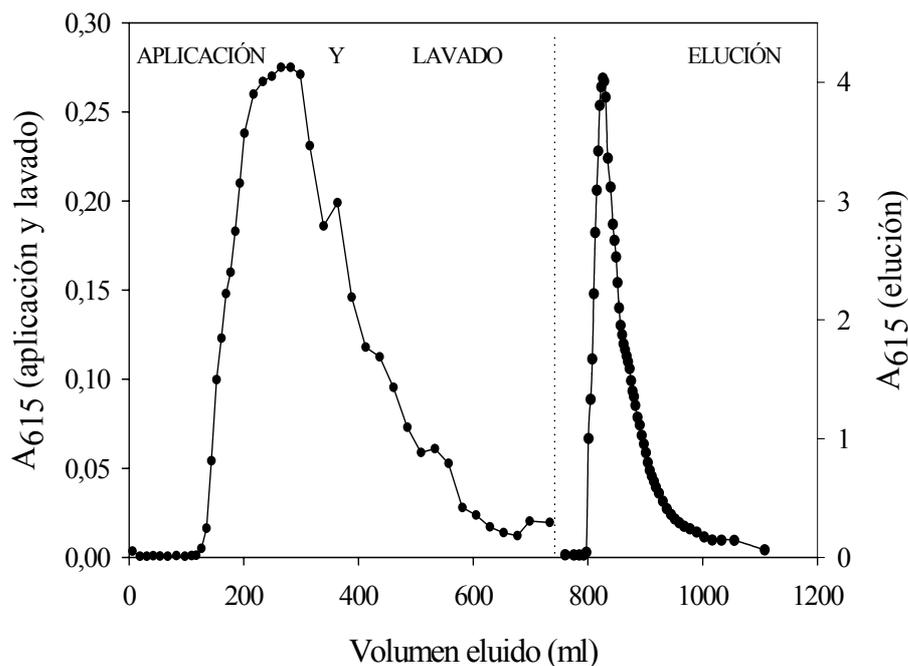


Figura 4.24

Perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de $50 \cdot 2'5$ cm.

Microalga *Spirulina platensis*. Volumen extracto aplicado= 222 ml. $[C-PC]_{\text{extracto}} = 0'3$ mg/ml.

Vflujo (aplicación y lavado)= 181 cm h^{-1} . Vflujo (elución)= 150 cm h^{-1} .

La Imagen 4.7 muestra el detalle de la experiencia y en ella puede apreciarse la columna de lecho expandido teñida de azul intenso debido a la fijación de las ficocianinas sobre el relleno Streamline DEAE. También pueden observarse las tonalidades verde-marrón de los tubos del colector de fracciones pertenecientes a las moléculas del extracto que no se enlazan al relleno cromatográfico como son clorofilas y carotenoides.

Synechocystis aquatilis.

En tercer lugar, para el extracto de C-PC proveniente de *Synechocystis aquatilis*, la viscosidad y carga proteica utilizadas fueron $1'025$ mP y $4'9$ mg C-PC/ml adsorbente respectivamente. Los tiempos de operación empleados para esta columna se muestran en Tabla 4.36. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.34 y 4.35 (Anexo 2).

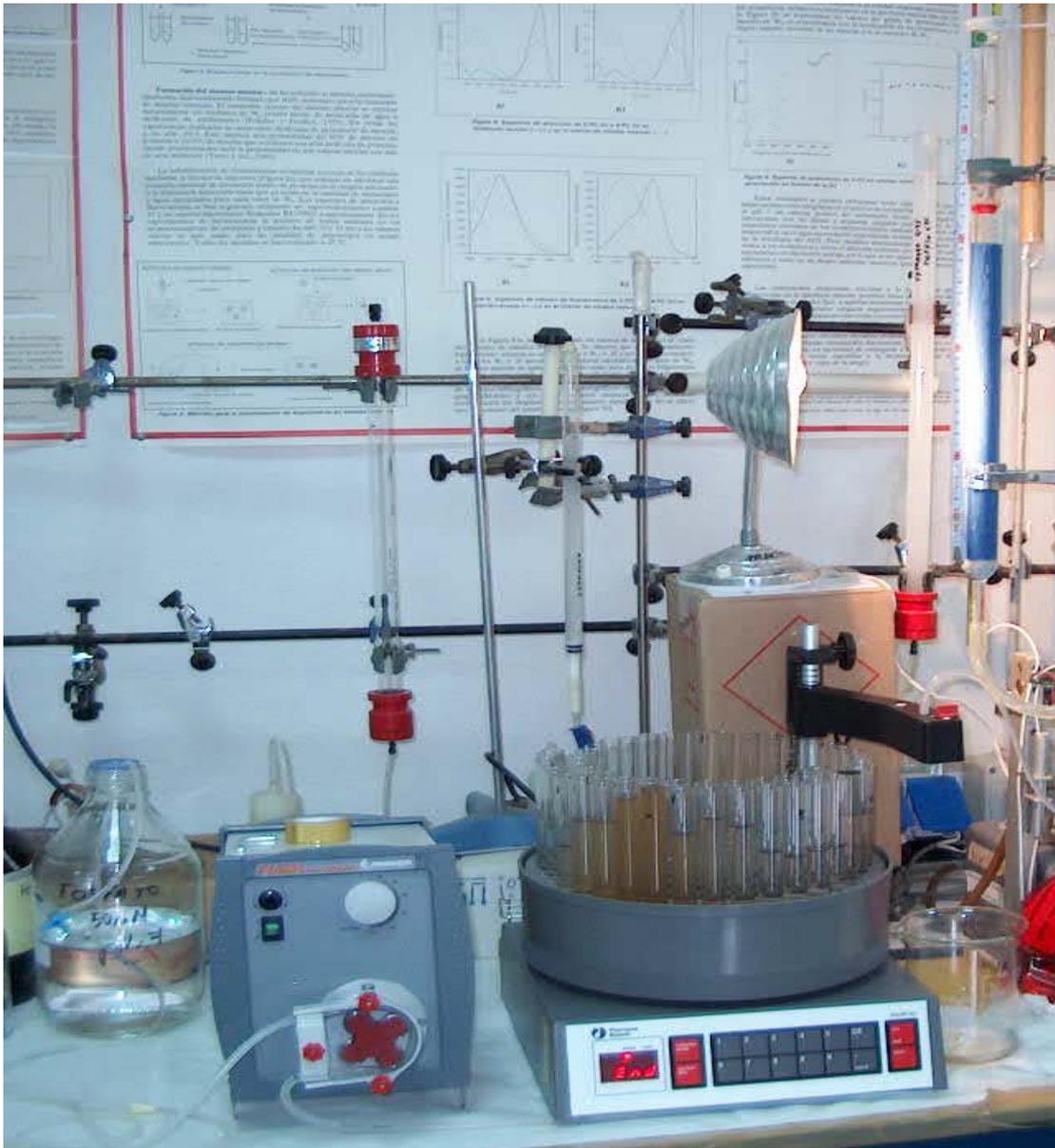


Imagen 4.7

Experiencia de CALE en columna de $50 \cdot 2,5$ cm para *Spirulina platensis*.
 Volumen extracto aplicado= 222 ml. Vflujo (aplicación y lavado)= 181 cm h^{-1} .
 Vflujo (elución)= 150 cm h^{-1} . $[\text{C-PC}]_{\text{extracto}} = 0,3 \text{ mg/ml}$.

La Figura 4.25 muestra el perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de 2,5 cm de diámetro para el extracto de C-PC procedente de *Synechocystis aquatilis*. Para esta especie, la cantidad de C-PC recuperada durante la etapa de lecho expandido ha sido igual al 92,7 % (ver Tablas 4.34 y 4.35 del Anexo 2).

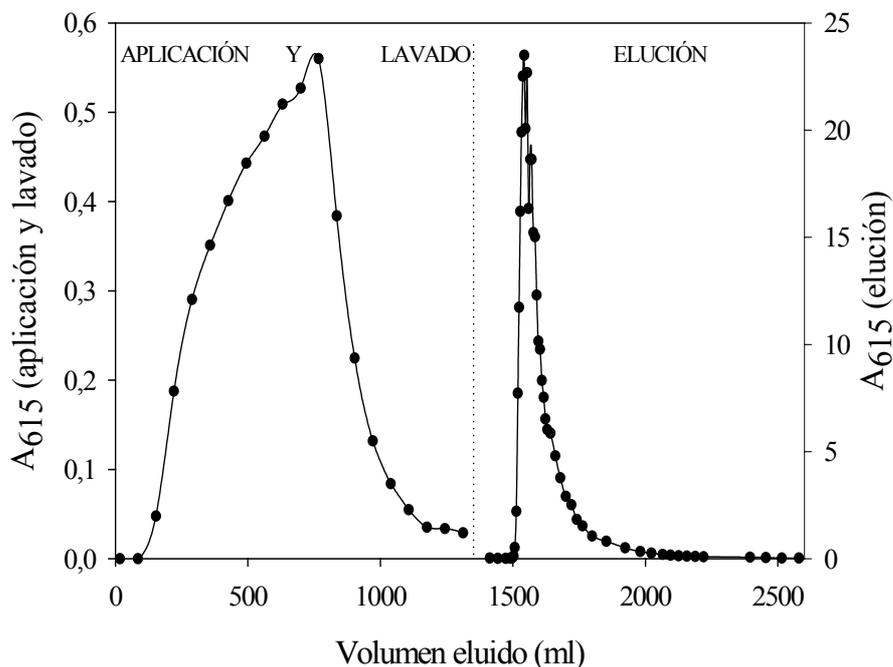


Figura 4.25

Perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de $50 \cdot 2'5$ cm.

Microalga *Synechocystis aquatilis*. Volumen extracto aplicado= 726 ml. $[C-PC]_{\text{extracto}} = 0'5$ mg/ml.

Vflujo (aplicación y lavado)= 197 cm h^{-1} . Vflujo (elución)= 215 cm h^{-1} .

Análoga discusión a la realizada para el caso de la columna de $50 \cdot 1'5$ cm puede hacerse en este caso, comprobando mediante los espectros uv-visible que el avance en la purificación de ficocianinas es totalmente análogo.

A modo de resumen, la Tabla 4.36 muestra los tiempos de operación empleados en cada una de las etapas del proceso de CALE para la columna de $50 \cdot 2'5$ cm.

Tabla 4.36
 Tiempos de operación en las etapas de CALE en columna de 50 · 2'5 cm
 para los diferentes extractos de C-PC.

SUBETAPA	Extracto de <i>Anabaena</i>	Extracto de <i>Spirulina</i>	Extracto de <i>Synechocystis</i>
	<i>marina</i> TIEMPO (min)	<i>platensis</i> TIEMPO (min)	<i>aquaticus</i> TIEMPO (min)
Equilibrado	45	45	45
Aplicación	41	15	46
Lavado	43	34	46
Elución	35	35	68
Limpieza	80	80	80
TOTAL	244	209	285

4.2.2.3.3.-Columna de 4 cm.

El siguiente paso en el proceso de escalado ha sido la utilización de la columna de 50 · 4 cm. Los parámetros de trabajo han sido los mismos que en las anteriores columnas y con un comportamiento totalmente análogo.

Anabaena marina.

La viscosidad y la capacidad de adsorción utilizadas para el extracto de C-PC proveniente de *Anabaena marina* han sido 1'109 mP y 0'9 mg C-PC/ml adsorbente respectivamente y los tiempos de operación empleados para esta columna se muestran en Tabla 4.43. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.37 y 4.38 (Anexo 3).

La Figura 4.26 muestra el perfil cromatográfico de la experiencia de CALE para el extracto de C-PC procedente de *Anabaena marina*, donde se puede seguir el valor de la absorbancia a 615 nm característica de C-PC en función del volumen eluido en cada momento como variable de monitorización del proceso completo de CALE.

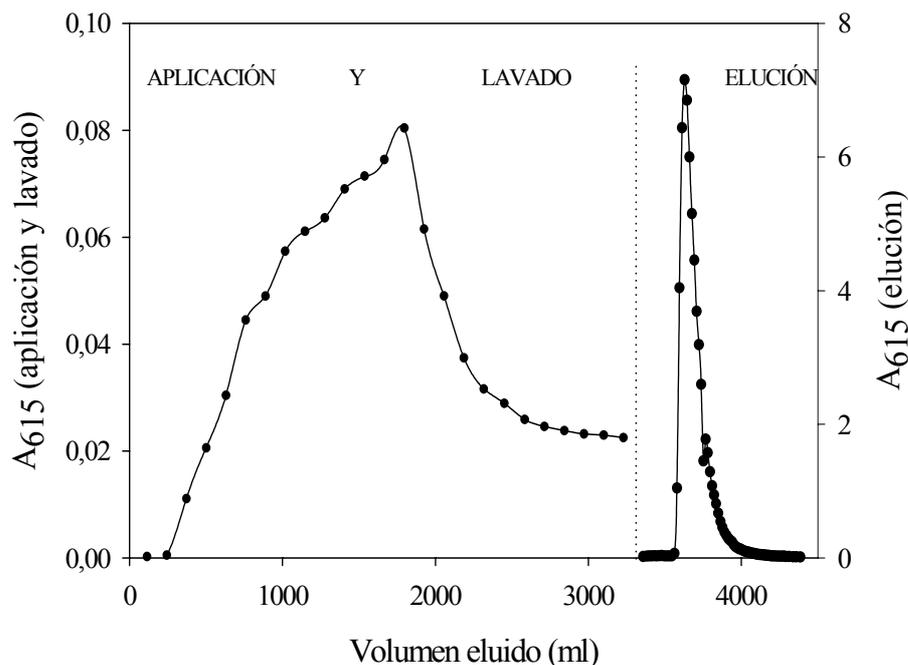


Figura 4.26

Perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de 50 · 4 cm. Microalga *Anabaena marina*. Volumen extracto aplicado= 1652ml. Vflujo (aplicación y lavado)= 161cm h⁻¹.
Vflujo (elución)= 97 cm h⁻¹. [C-PC]_{extracto}= 0'1 mg/ml.

La cantidad de C-PC recuperada durante la etapa de lecho expandido para el extracto proveniente de *Anabaena marina*, ha sido igual al 85'9% (ver Tablas 4.37 y 4.38).

Spirulina platensis.

La viscosidad y capacidad de adsorción utilizadas para el extracto de C-PC proveniente de *Spirulina platensis* son 1'084 mP y 0'91 mg C-PC/ml adsorbente respectivamente y los tiempos de operación empleados para esta columna se muestran en Tabla 4.43. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.39 y 4.40 (Anexo 3).

La Figura 4.27 muestra el perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de 4 cm de diámetro para el extracto de C-PC procedente de *Spirulina platensis*, donde se puede seguir el valor de la absorbancia a 615 nm característica de C-PC en función del volumen eluido en cada momento como variable de monitorización del proceso completo de CALE.

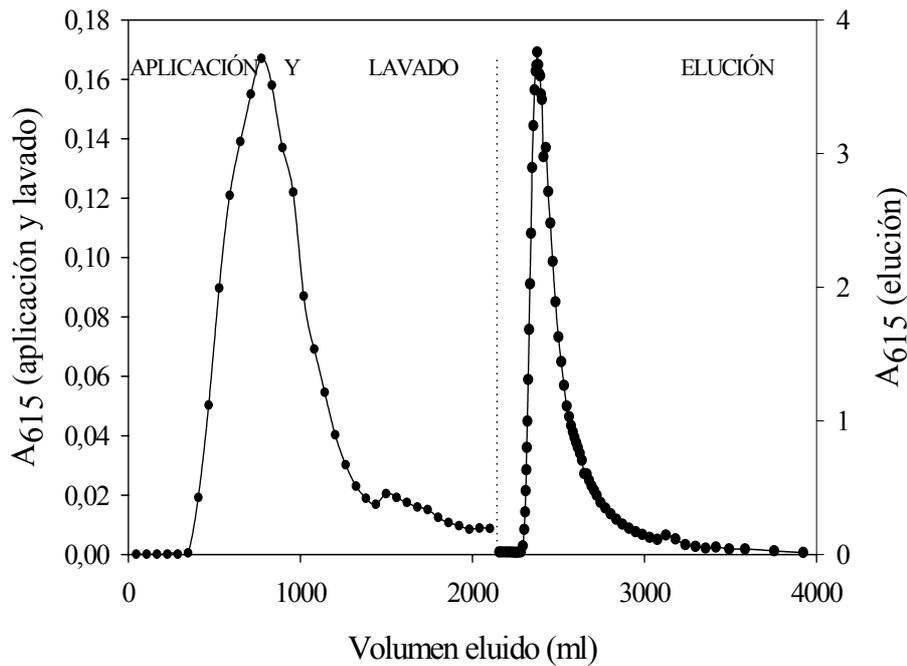


Figura 4.27

Perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de 50 · 4 cm. Microalga *Spirulina platensis*. Volumen extracto aplicado= 568ml. Vflujo (aplicación y lavado)= 175cm h⁻¹.
Vflujo (elución)= 177 cm h⁻¹. [C-PC]_{extracto}= 0'3 mg/ml.

La cantidad de C-PC recuperada durante la etapa de lecho expandido para el extracto proveniente de *Spirulina platensis*, ha sido igual al 76'5 % (ver Tablas 4.39 y 4.40 del Anexo 3).

Synechocystis aquatilis.

La viscosidad y capacidad de adsorción utilizadas para el extracto de C-PC proveniente de *Synechocystis aquatilis* son 1'025 mP y 4'9 mg C-PC/ml adsorbente respectivamente y los tiempos de operación empleados para esta columna se muestran en Tabla 4.43. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.41 y 4.42 (Anexo 3).

La Figura 4.28 muestra el perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de 4 cm de diámetro para el extracto de C-PC procedente de *Synechocystis aquatilis*, donde se puede seguir el valor de la absorbancia a 615 nm característica de C-PC en función del volumen eluido en cada momento como variable de monitorización del proceso completo de CALE.

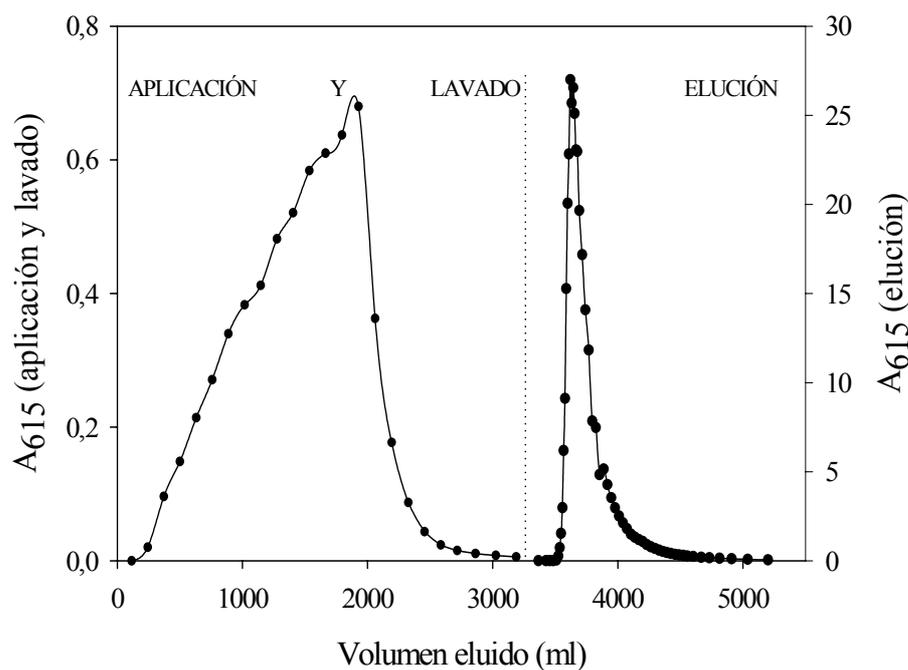


Figura 4.28

Perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de $50 \cdot 4$ cm. Microalga *Synechocystis aquatilis*. Volumen extracto aplicado= 1766ml. Vflujo (aplicación y lavado)= 168 cm h^{-1} .
 Vflujo (elución)= 113 cm h^{-1} . $[\text{C-PC}]_{\text{extracto}} = 0,5 \text{ mg/ml}$.

La cantidad de C-PC recuperada durante la etapa de lecho expandido para el extracto proveniente de *Synechocystis aquatilis* ha sido igual al 88 % (ver Tablas 4.41 y 4.42).

La Tabla 4.43 muestra los tiempos de operación empleados en cada una de las etapas del proceso de CALE para la columna de $50 \cdot 4$ cm.

Tabla 4.43
 Tiempos de operación en las etapas de CALE en columna de 50 · 4 cm
 para los diferentes extractos de C-PC.

SUBETAPA	Extracto de <i>Anabaena marina</i> TIEMPO (min)	Extracto de <i>Spirulina platensis</i> TIEMPO (min)	Extracto de <i>Synechocystis aquatilis</i> TIEMPO (min)
Equilibrado	55	55	55
Aplicación	38	15	50
Lavado	49	38	59
Elución	53	52	84
Limpieza	70	70	70
TOTAL	265	230	318

4.2.2.3.4.-Columna de 6 cm.

Por último y con los correspondientes parámetros optimizados, se ha procedido al desarrollo de una experiencia óptima en columna de 50 · 6 cm.

Anabaena marina.

La viscosidad y capacidad de adsorción utilizadas para el extracto de C-PC proveniente de *Anabaena marina* han sido 1'109 mP y 0'9 mg C-PC/ml adsorbente respectivamente. Los tiempos de operación empleados para esta columna se muestran en Tabla 4.50. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.44 y 4.45 (Anexo 4).

La Figura 4.29 muestra el perfil cromatográfico de la experiencia de CALE para el extracto de C-PC procedente de *Anabaena marina*, donde se puede seguir el valor de la absorbancia a 615 nm característica de C-PC en función del volumen eluido en cada momento como variable de monitorización del proceso completo de CALE.

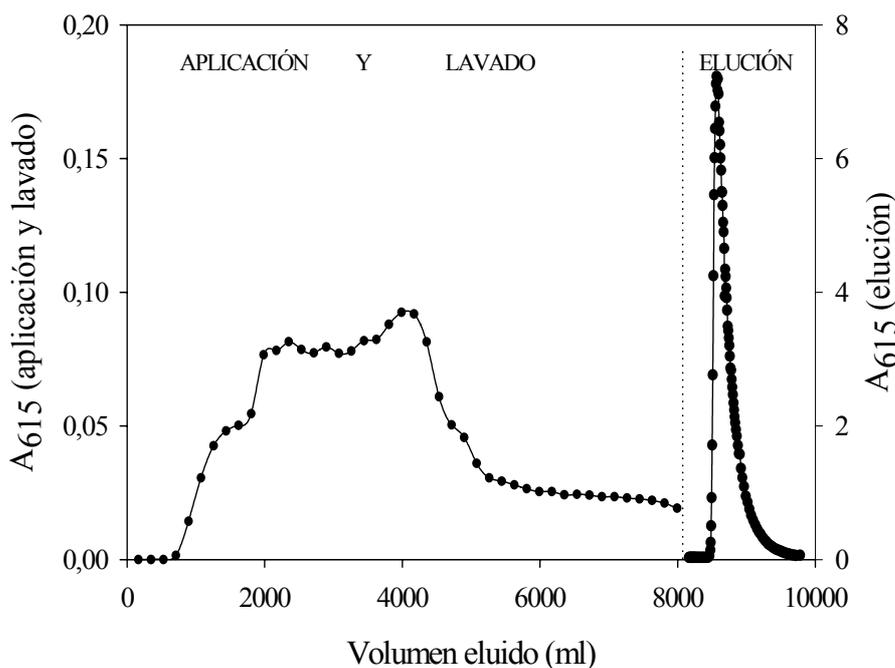


Figura 4.29

Perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de 50 · 6cm. Microalga *Anabaena marina*.

Volumen extracto aplicado= 3718ml. Vflujo (aplicación y lavado)= 172 cm h⁻¹.

Vflujo (elución)= 100 cm h⁻¹. [C-PC]_{extracto}= 0'1 mg/ml.

La cantidad de C-PC recuperada durante la etapa de lecho expandido para el extracto proveniente de *Anabaena marina* ha sido igual al 85 % (ver Tablas 4.44 y 4.45 del Anexo 4).

Spirulina platensis.

Para el caso de *Spirulina platensis*, la viscosidad y la capacidad de adsorción utilizadas para el extracto de C-PC han sido 1'084 mP y 0'91 mg C-PC/ml adsorbente respectivamente y los tiempos de operación empleados para esta columna se muestran en Tabla 4.50. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.46 y 4.47.

La Figura 4.30 muestra el perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de 6 cm de diámetro para el extracto de C-PC procedente de *Spirulina platensis*, donde se puede seguir el valor de la absorbancia a 615 nm característica de C-PC en función del volumen eluido en cada momento como variable de monitorización del proceso completo de CALE.

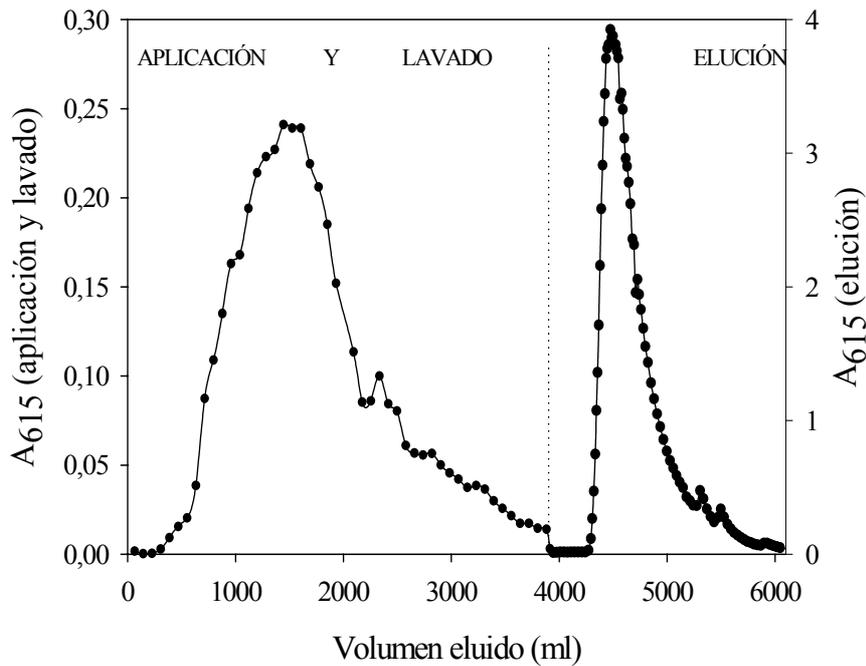


Figura 4.30

Perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de 50 · 6cm. Microalga *Spirulina platensis*. Volumen extracto aplicado= 1275ml. Vflujo (aplicación y lavado)= 130 cm h⁻¹.

Vflujo (elución)= 212 cm h⁻¹. [C-PC]_{extracto}= 0'3 mg/ml

La cantidad de C-PC recuperada durante la etapa de lecho expandido para el extracto proveniente de *Spirulina platensis* ha sido igual al 76'8 % (ver Tablas 4.46 y 4.47).

Synechocystis aquatilis.

La viscosidad y capacidad de adsorción utilizadas para el extracto de C-PC proveniente de *Synechocystis aquatilis* han sido 1'025 mP y 4'9 mg C-PC/ml adsorbente respectivamente y los tiempos de operación empleados para esta columna se muestran en Tabla 4.50. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.48 y 4.49 (Anexo 4).

La Figura 4.31 muestra el perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de 6 cm de diámetro para el extracto de C-PC procedente de *Synechocystis aquatilis*, donde se puede seguir el valor de la absorbancia a 615 nm característica de C-PC en función del volumen eluido en cada momento como variable de monitorización del proceso completo de CALE.

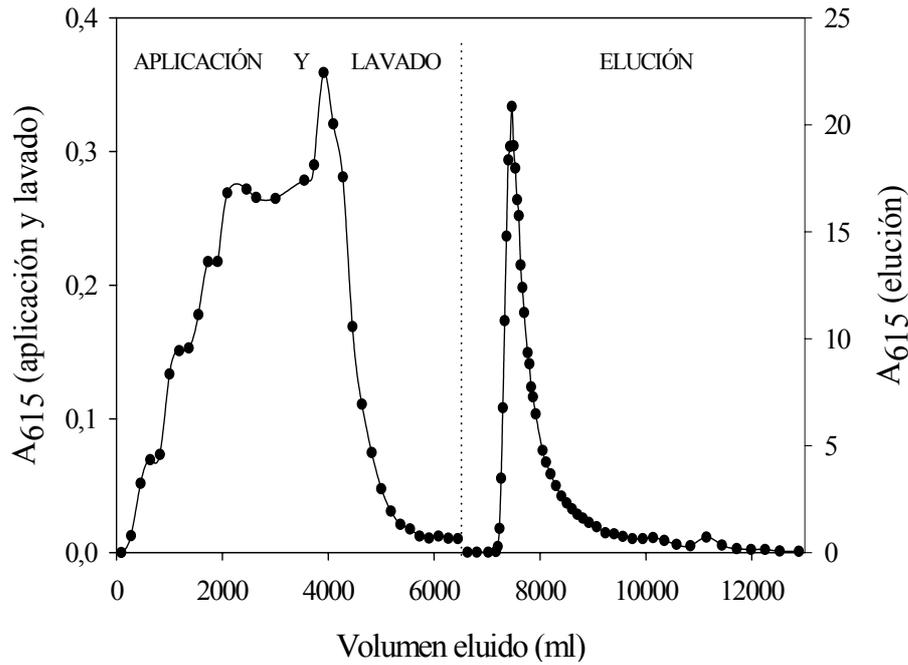


Figura 4.31

Perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de 50 · 6cm. Microalga *Synechocystis aquatilis*. Volumen extracto aplicado= 4059ml. Vflujo (aplicación y lavado)= 187 cm h⁻¹.

Vflujo (elución)= 283 cm h⁻¹. [C-PC]_{extracto}= 0'5 mg/ml.

La cantidad de C-PC recuperada durante la etapa de lecho expandido para el extracto proveniente de *Synechocystis aquatilis*, ha sido igual al 90 % (ver Tablas 4.48 y 4.49).

Tabla 4.50

Tiempos de operación en las etapas de CALE en columna de 50 · 6 cm para los diferentes extractos de C-PC.

SUBETAPA	Extracto de <i>Anabaena marina</i>	Extracto de <i>Spirulina platensis</i>	Extracto de <i>Synechocystis aquatilis</i>
	TIEMPO (min)	TIEMPO (min)	TIEMPO (min)
Equilibrado	60	60	60
Aplicación	55	21	70
Lavado	53	38	64
Elución	44	50	75
Limpieza	80	80	80
TOTAL	292	249	349

Con el objetivo de sintetizar todos los resultados obtenidos, las Tablas 4.51, 4.52 y 4.53 muestran los diferentes parámetros obtenidos en el escalado para las diferentes columnas y con cada una de las microalgas ensayadas.

Tabla 4.51

Resumen de los datos correspondientes al escalado del proceso de recuperación de ficocianinas procedentes de *Anabaena marina* mediante CALE en columnas de Streamline de 1'5 a 6 cm de diámetro. ($X_m = 0'90$ mg/ml).

D.I.(cm)	C-PC cargada (mg)	Volumen muestra aplicado (ml)	Factor Elución (SBV)	Pico Elución (ml)	Volumen relleno sedimentado (ml)	Tiempo total operación (min)	%Recuperación C-PC
1'5	24	234	19'1	506	26'5	178	86'1
2'5	66	645	20'0	1506	74	244	82'8
4	170	1652	19'2	3629	189	265	85'9
6	382	3718	20'2	8586	424	292	85'0

Tabla 4.52

Resumen de los datos correspondientes al escalado del proceso de recuperación de ficocianinas procedentes de *Spirulina platensis* mediante CALE en columnas de Streamline de 1'5 a 6 cm de diámetro. ($X_m = 0'91$ mg/ml).

D.I.(cm)	C-PC cargada (mg)	Volumen muestra aplicado (ml)	Factor Elución (SBV)	Pico Elución (ml)	Volumen relleno sedimentado (ml)	Tiempo total operación (min)	%Recuperación C-PC
1'5	24'1	80	9'6	254	26'5	141	75'5
2'5	67'0	222	11'2	826	74	209	74'2
4	171'5	568	12'5	2376	189	230	76'5
6	385'9	1275	10'5	4473	424	249	76'8

Tabla 4.53

Resumen de los datos correspondientes al escalado del proceso de recuperación de ficocianinas procedentes de *Synechocystis aquatilis* mediante CALE en columnas de Streamline de 1'5 a 6 cm de diámetro. ($X_m = 4'9$ mg/ml).

D.I.(cm)	C-PC cargada (mg)	Volumen muestra aplicado (ml)	Factor Elución (SBV)	Pico Elución (ml)	Volumen relleno sedimentado (ml)	Tiempo total operación (min)	%Recuperación C-PC
1'5	130	261	24	639	26'5	241	90'8
2'5	361	726	20'8	1542	74	285	92'7
4	924	1766	19'1	3613	189	318	88'0
6	2078	4059	17'6	7864	424	349	90'0

Del análisis de los resultados reflejados en las Tablas, se desprende que los rendimientos de operación resultantes para cada microalga, son similares entre sí e independientes del diámetro de columna empleado. Así, para cada grupo de experiencias que involucran a la misma especie, los perfiles cromatográficos procedentes de las diferentes columnas son muy similares y las disoluciones ricas en ficocianinas procedentes de la etapa de elución poseen las mismas razones espectroscópicas A_{615}/A_{280} , lo que indica, que el proceso de escalado se ha alcanzado satisfactoriamente. Además, otro factor muy importante que denota que el proceso de escalado se ha desarrollado de forma efectiva, es la reproducibilidad en los valores obtenidos para el parámetro SBV, calculado como cociente entre el volumen correspondiente al pico de elución y el volumen de lecho sedimentado.

4.2.3.-PRODUCCIÓN DE FICOCIANINAS ULTRAPURAS.

Una vez finalizada la etapa de CALE, se obtiene una disolución rica en ficocianinas donde hay presencia mayoritaria de C-PC y APC, junto con otras moléculas que las acompañan. El objetivo de la siguiente etapa es obtener puras las diferentes ficocianinas que aparecen en los extractos enriquecidos tras la etapa de CALE. Así, se han obtenido, estudiado y caracterizado, C-PC, APC y R-PC. A modo de ejemplo, se describe en esta Memoria la purificación de C-PC procedente del extracto enriquecido tras CALE utilizando biomasa de *Anabaena marina* como materia prima de partida. La descripción de los resultados y métodos para obtener las demás (APC y R-PC) no se incluyen, pues han seguido los trabajos previos desarrollados por nuestro grupo de investigación y por tanto bien conocidos, partiendo de microalgas *Spirulina platensis* (para obtener APC) (Bermejo y col., 1997; 2006) y *Porphyridium cruentum* (para obtener R-PC) (Bermejo y col., 2002a;2003a). Así, la disolución rica en ficocianinas procedente de la etapa de CALE (usando biomasa de *Anabaena marina*) constituye la muestra de partida para la etapa cromatográfica siguiente, que tiene como objetivo la obtención de C-PC pura y que se ha realizado en formato de cromatografía empaquetada convencional.

El objetivo de obtener C-PC pura, se ha alcanzado usando dos tipos de cromatografía convencional diferentes; cromatografía de exclusión molecular (también denominada filtración por gel) y cromatografía de intercambio iónico.

4.2.3.1.-Cromatografía de exclusión molecular.

En primer lugar se describirán los resultados obtenidos mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando como fase estacionaria Sephadex G-100, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.2.4. La Tabla 4.54 muestra los resultados obtenidos en la mejor de las experiencias realizadas.

Tabla 4.54

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en cromatografía de exclusión molecular. Matriz cromatográfica= Sephadex G-100. Altura relleno= 58cm. Dimensión columna = 90 · 2'5 cm. Vol._{muestra aplicado}= 4 ml. [C-PC]_{muestra}= 0'468 mg/ml. Velocidad flujo= 0'24 cm·h⁻¹.

FRACCIONES	A ₆₁₅	A ₆₅₂	A ₇₃₀	A ₂₈₀	R(*)	VOL (ml)	[C-PC] (mg/ml)	mg C-PC
1	0'092	0'020	0'001	0'037	2'49	--	---	---
2	0'188	0'027	0'001	0'049	3'83	12	0'033	0'392
3	0'140	0'017	0'001	0'038	3'69	12	0'025	0'295
4	0'133	0'020	0'004	0'052	2'55	--	---	---

(*) R= A₆₁₅/A₂₈₀

Es importante resaltar que como criterio de pureza preliminar para este tipo de proteínas, se suele usar la relación espectroscópica de absorbancias A₆₁₅/A₂₈₀, aunque posteriormente la pureza debe ser corroborada mediante electroforesis SDS-PAGE y otros tipos de técnicas. En la Tabla 4.54, las fracciones 2 y 3 revelan que contienen C-PC pura (A₆₁₅/A₂₈₀>3'5) y el cálculo de la cantidad de proteína pura contenida en ellas, genera un rendimiento para esta etapa cromatográfica igual al 37%.

La Figura 4.32 muestra a título de ejemplo, el espectro de absorción de la fracción número 2. Este perfil cromatográfico es el típico de una disolución de C-PC pura.

En el desarrollo de la cromatografía de exclusión molecular la variable más importante de trabajo, a igualdad de las restantes, es la velocidad de flujo. Por tanto, utilizando el mejor valor de ésta se consigue como máximo un rendimiento de recuperación de C-PC pura de 37%.

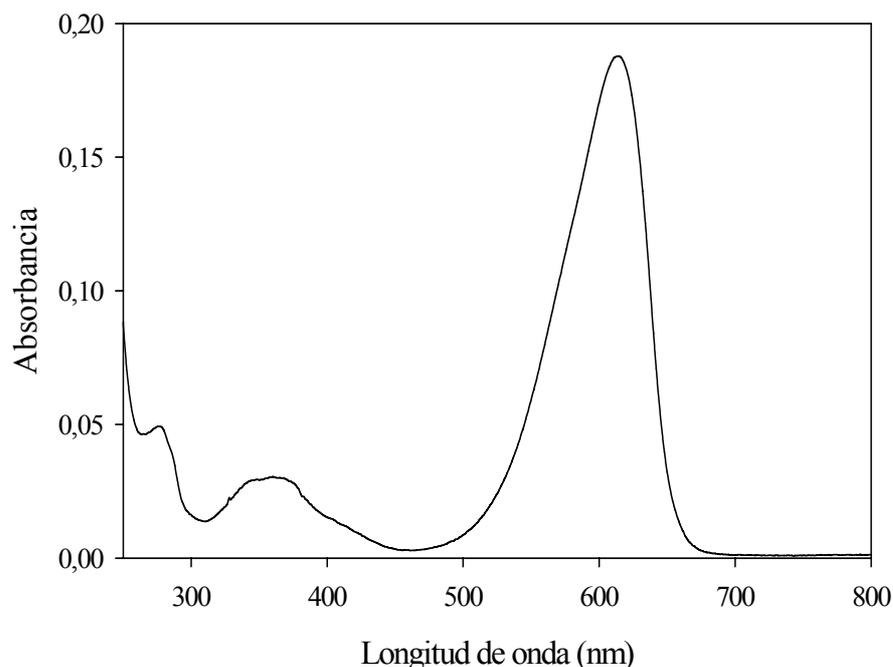


Figura 4.32

Espectro de absorción del eluido de la columna de cromatografía de exclusión molecular.

4.2.3.2.-Cromatografía de intercambio iónico.

La utilización de la cromatografía de exclusión molecular es, a priori, interesante debido a su simplicidad, pues para desarrollarla se utiliza un medio isocrático compuesto por tampón fosfato pH=7 (50mM) como fase móvil. Sin embargo, el rendimiento de recuperación proteico obtenido (37%) podría elevarse y por ello se ha ensayado la cromatografía de intercambio iónico, que utiliza un gradiente discontinuo de fuerza iónica (ver el apartado 3.2.2.5 de Métodos).

La Tabla 4.55 muestra los resultados obtenidos con la mejor de las experiencias realizadas. Si analizamos los resultados mostrados en la Tabla 4.55, la suma de las fracciones donde aparece C-PC pura ($R > 3'5$), genera una masa de C-PC (1'45mg), que corresponde a un 74% de rendimiento de recuperación proteico. Este elevado rendimiento frente al anterior valor obtenido por exclusión molecular (37%), hace que se opte por el intercambio iónico como etapa final del proceso de purificación de C-PC.

Tabla 4.55

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en cromatografía de intercambio iónico con matriz cromatográfica DEAE celulosa DE-52. Dimensión columna = 20 · 2'5 cm.

Altura relleno= 15 cm. Vol._{muestra aplicado}= 6ml. [C-PC]_{muestra}= 0'32 mg/ml. Velocidad flujo= 24'4 cm·h⁻¹.

NºTUBO	A ₆₁₅	A ₂₈₀	R	A ₇₃₀	A ₆₅₂	[C-PC] (mg/ml)	mg C-PC
1	0'536	0'136	3'94	0'0015	0'086	0'093	0'232
2	0'750	0'174	4'31	0'0009	0'114	0'130	0'326
3	0'549	0'133	4'13	0'0008	0'082	0'096	0'239
4	0'420	0'103	4'08	0'0007	0'062	0'073	0'183
5	0'322	0'078	4'13	0'0007	0'047	0'056	0'140
6	0'229	0'054	4'24	0'0006	0'033	0'040	0'100
7	0'159	0'038	4'18	0'0001	0'022	0'028	0'070
8	0'117	0'028	4'18	0'0001	0'016	0'021	0'051
9	0'096	0'027	3'56	0'0007	0'013	0'017	0'042
10	0'084	0'021	4'00	0'0005	0'011	0'015	0'037
11	0'074	0'021	3'52	0'0000	0'010	0'013	0'032

$$R = A_{615}/A_{280}$$

La Figura 4.33 muestra a título de ejemplo, el espectro de absorción de la fracción nº2 del eluido de la columna de cromatografía de intercambio iónico y que se corresponde con C-PC pura.

La Imagen 4.8 muestra el detalle del proceso de elución de la muestra rica en ficocianinas procedente de CALE, en la columna de intercambio iónico utilizando DEAE-52 como relleno cromatográfico.

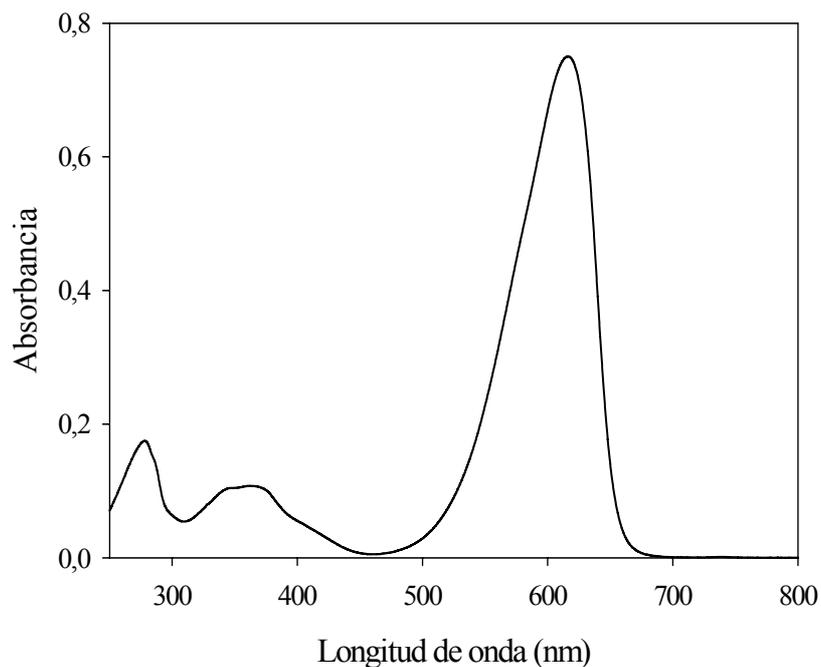


Figura 4.33.

Espectro de absorción de C-PC pura del eluido de la columna de cromatografía de intercambio iónico. Fracción nº 2.

Por tanto, se consigue mediante esta última etapa la obtención de C-PC pura y como se ha comentado anteriormente, siguiendo la metodología anteriormente desarrollada por nuestro grupo, también se obtienen APC y R-PC. Así, se dispone de tres biomoléculas con las que poder trabajar, en su caracterización y estudio, con el objetivo de poder utilizarlas en diferentes campos de aplicación.



Imagen 4.8

Cromatografía de intercambio iónico en columna DEAE-52 utilizando la disolución rica en ficocianinas procedente de CALE.

4.2.3.3.-Evaluación global del proceso de purificación.

Una vez completado el proceso global de purificación de las distintas ficocianinas, se puede pasar a evaluar el rendimiento total del proceso. Así, utilizando los rendimientos de recuperación de ficocianinas obtenidos en cada una de las tres etapas que constituyen el proceso global, se ha calculado el valor global de porcentaje de recuperación.

Las Tablas 4.56, 4.57 y 4.58, muestran los valores parciales y el rendimiento global de recuperación basado en las determinaciones de C-PC en las distintas etapas de purificación y para cada una de las microalgas ensayadas.

Tabla 4.56

Rendimientos de recuperación y pureza de las fracciones de las diferentes etapas del proceso de purificación de C-PC procedente de *Anabaena marina*.

Etapa	%Recuperación C-PC	A_{615}/A_{280}
Extracción	97	0'6
Lecho expandido (CALE)	86	2
Lecho empaquetado	74	>3'5
Recuperación Total	62	-

Tabla 4.57

Rendimientos de recuperación y pureza de las fracciones de las diferentes etapas del proceso de purificación de C-PC procedente de *Spirulina platensis*.

Etapa	%Recuperación C-PC	A_{615}/A_{280}
Extracción	100	0'19
Lecho expandido (CALE)	79	0'87
Lecho empaquetado	74	>3'5
Recuperación Total	59	-

Tabla 4.58

Rendimientos de recuperación y pureza de las fracciones de las diferentes etapas del proceso de purificación de C-PC procedente de *Synechocystis aquatilis*.

Etapa	%Recuperación C-PC	A ₆₁₅ /A ₂₈₀
Extracción	100	0'62
Lecho expandido (CALE)	91	2'56
Lecho empaquetado	74	>3'5
Recuperación Total	67	-

Los rendimientos para la etapa de extracción han sido calculados teniendo en cuenta tres extracciones repetitivas. Así, para el caso de las microalgas *Spirulina platensis* y *Synechocystis aquatilis*, con estas tres extracciones se conseguía ya el total de ficobiliproteínas presentes, mientras que para *Anabaena marina* se conseguía el 97%. El rendimiento en la etapa de intercambio iónico se estima igual para las tres algas, siendo del 74%, por lo que la diferencia en el porcentaje de recuperación final viene dada por la etapa de adsorción en lecho expandido. Así, es para *Synechocystis aquatilis* para la que se obtiene un mayor porcentaje de recuperación en CALE (91%), lo cual produce que sea esta especie microalgal la que genera un mayor porcentaje de recuperación global (67%).

Teniendo en cuenta la cantidad total de C-PC presente en cada extracto microalgal y el rendimiento global de recuperación de C-PC para cada uno de ellos, se puede concluir que se puede llegar a obtener una cantidad de C-ficocianina ultrapura con respecto a la cantidad de biomasa microalgal de partida de: 1'1% para *Anabaena marina*; 1'71% para *Spirulina platensis* y 1'82% para el caso de *Synechocystis aquatilis*.

4.2.4.-IDENTIFICACIÓN DE LAS BILIPROTEINAS PURIFICADAS.

La obtención de macromoléculas biológicas requiere de la realización de diferentes análisis que permitan corroborar su pureza y además presentar sus características físico-químicas diferenciadoras. Por esto, una vez obtenidas las diferentes ficocianinas se ha procedido a su identificación y caracterización físico-química.

4.2.4.1.-Análisis espectroscópico.

Inicialmente, las disoluciones de biliproteínas purificadas se precipitan con sulfato amónico al 70 % y tras la correspondiente centrifugación se resuspenden en tampón fosfato pH 7 (20mM). Posteriormente dializan frente al mismo tampón y se liofilizan las muestras para almacenarlas a 4° C hasta el momento de su utilización (Imagen 4.9). Las biliproteínas purificadas se han caracterizado espectroscópicamente mediante la utilización de absorción, fluorescencia y anisotropía de estado estacionario siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.3.



Imagen 4.9

Díálisis de C-PC pura procedente de la precipitación con sulfato amónico de la disolución obtenida tras cromatografía de intercambio iónico con DEAE-52.

Como ejemplo, las Figuras 4.34, 4.35 y 4.36 muestran los espectros de absorción uv-visible y emisión de fluorescencia en estado estacionario, correspondientes a C-PC y APC (purificadas de *Anabaena marina* y *Spirulina platensis* respectivamente) y R-PC purificada de *Porphyridium cruentum*, en tampón fosfato pH 7 (20mM). La Figura 4.37 muestra los correspondientes espectros de anisotropía de fluorescencia característicos de las tres macromoléculas biológicas.

C-ficocianina procedente de *Anabaena marina*.

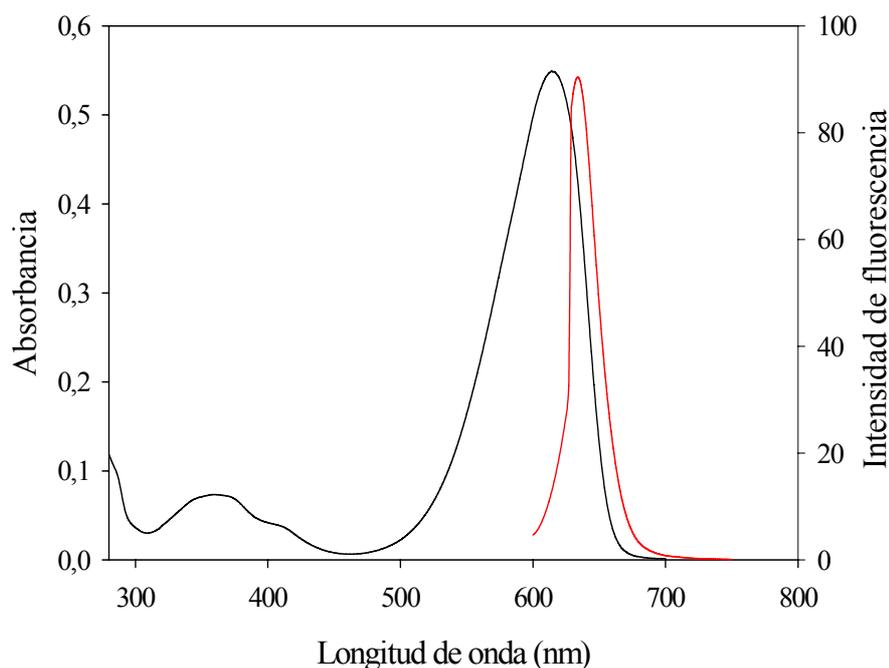


Figura 4.34

Espectros de absorción uv-visible (———)([C-PC]= $8 \cdot 10^{-7}$ M) y de emisión de fluorescencia (———) ($\lambda_{\text{ex}}=540$ nm; $\Delta\lambda_{\text{ex}}=\Delta\lambda_{\text{em}}=1'5$ nm)([C-PC]= $4 \cdot 10^{-8}$ M)) de C-PC de *Anabaena marina* en tampón fosfato pH 7 (20mM).

El espectro de absorción uv-visible de C-PC presenta máximos característicos a 280, 360 y 615 nm. La relación espectroscópica A_{615}/A_{280} está muy por encima de 3'5, valor característico de disoluciones puras de C-PC. Así mismo, el espectro de emisión de fluorescencia de C-PC de *Anabaena marina* presenta una sola banda con un máximo de emisión a 638 nm y el espectro de anisotropía obtenido junto con los datos de absorción y fluorescencia, son característicos de C-PC pura y en estado de agregación trimérico.

Para la obtención de los espectros de anisotropía de la Figura 4.37, la longitud de onda de emisión se fijó adecuadamente y la de excitación se varió cada 5nm, entre 500 y 660 nm. El valor empleado de la longitud de onda de emisión permite que, en las condiciones experimentales empleadas, se puedan obtener los datos de anisotropía que corresponden a las mayores longitudes de onda del espectro de excitación sin interferencias originadas por la presencia de luz dispersa. Además, esta longitud de onda de emisión corresponde a la zona menos energética del espectro de fluorescencia, lo que permite asegurar que la emisión corresponde al estado excitado de menos energía del cromóforo o cromóforos fluorescentes de la biliproteína. Los valores de anisotropía obtenidos a partir de los correspondientes valores de polarización se indican en la Tabla 4.59.

Tabla 4.59

Valores de polarización y anisotropía de fluorescencia de C-PC de *Anabaena marina* en tampón fosfato 20 mM (pH 7). $\lambda_{em}= 634$ nm. Cada valor de polarización y anisotropía ha sido calculado como media de tres medidas experimentales.

$\lambda_{excitación}$ (nm)	Polarización (P)	Anisotropía (A)
520	0'21	0'15
525	0'21	0'15
530	0'21	0'15
535	0'23	0'17
540	0'23	0'17
545	0'24	0'17
550	0'27	0'20
555	0'28	0'21
560	0'28	0'21
565	0'28	0'21
570	0'34	0'25
575	0'34	0'26
580	0'35	0'26
585	0'34	0'25
590	0'34	0'26
595	0'34	0'26
600	0'35	0'27
605	0'36	0'28
610	0'45	0'35
615	0'46	0'36
620	0'46	0'37
625	0'47	0'37
630	0'50	0'40

Aloficocianina procedente de *Spirulina platensis*.

De la misma forma, se ha procedido a caracterizar espectroscópicamente la APC obtenida mediante metodología previamente desarrollada por nuestro grupo (Bermejo y col., 2006).

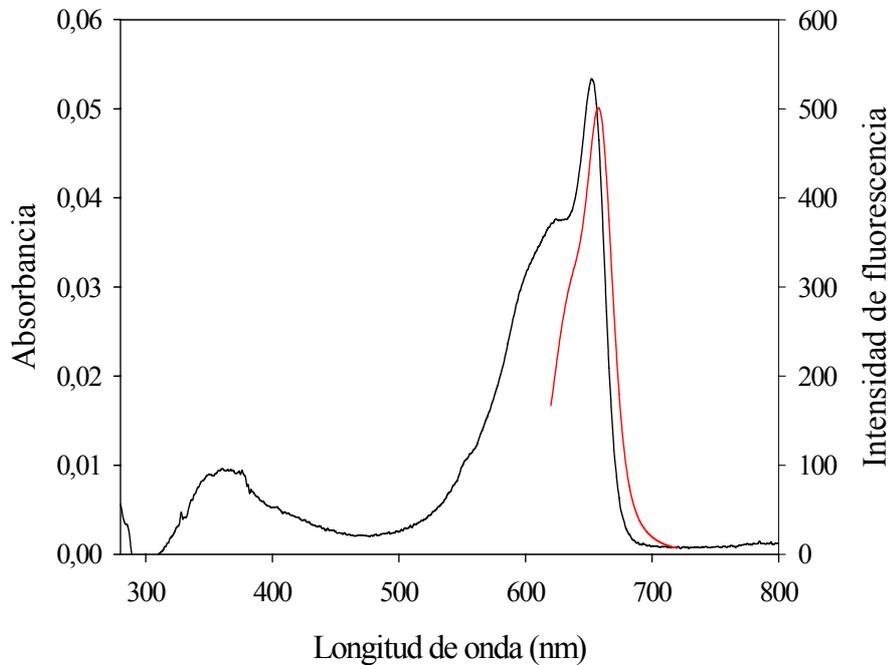


Figura 4.35

Espectros de absorción uv-visible (—) y de emisión de fluorescencia (—) ($\lambda_{\text{ex}}=590$ nm; $\Delta\lambda_{\text{ex}}=20$ $\Delta\lambda_{\text{em}}=10$ nm) de APC en tampón fosfato pH 7 (20mM). $[\text{APC}]=4'87\cdot 10^{-8}\text{M}$.

El espectro de absorción uv-visible presenta máximos característicos de APC a 280, 360 y 652 nm y un hombro sobre 610 nm. La relación espectroscópica A_{652}/A_{280} está muy por encima de 3'5, valor característico de disoluciones puras de APC. El espectro de emisión de fluorescencia de APC presenta una sola banda con un máximo de emisión a 658 nm y el espectro de anisotropía obtenido junto con los datos de absorción y fluorescencia, son característicos de APC pura y en estado de agregación trimérico.

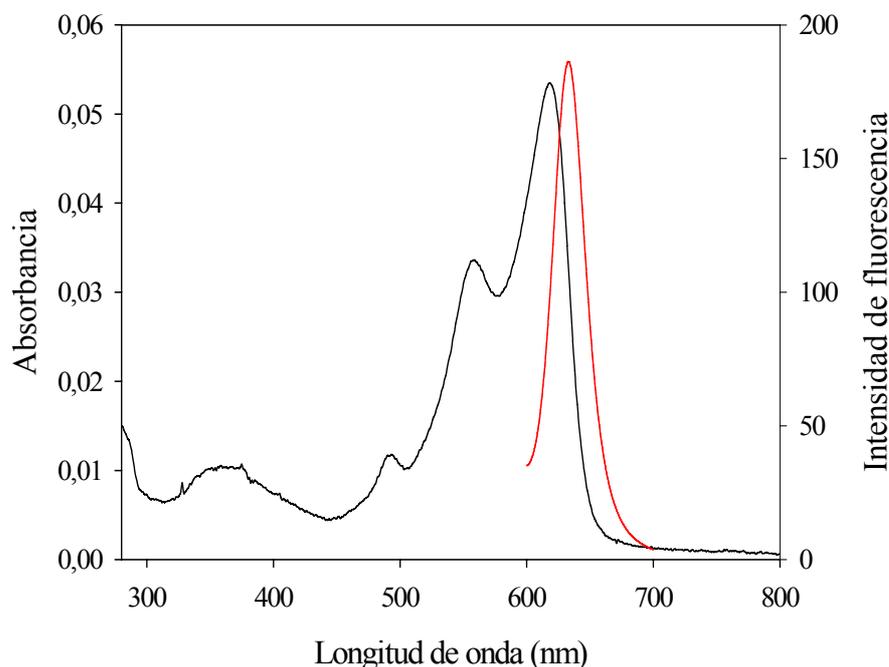
R-ficocianina procedente de *Porphyridium cruentum*.

Figura 4.36

Espectros de absorción uv-visible (—) ($[R-PC]=1,7 \cdot 10^{-7} M$) y de emisión de fluorescencia (—) ($\lambda_{ex}=590 \text{ nm}$; $\Delta\lambda_{ex}=\Delta\lambda_{em}=3 \text{ nm}$) ($[R-PC]=4 \cdot 10^{-8} M$) de R-PC en tampón fosfato pH 7 (20mM).

El espectro de absorción uv-visible de R-PC presenta máximos característicos a 280, 360 y 618 nm y un hombro sobre 560 nm. La relación espectroscópica A_{618}/A_{280} está por encima de 3,5, valor característico de disoluciones puras de R-PC. El espectro de emisión de fluorescencia de R-PC presenta una sola banda con un máximo de emisión a 632 nm. El espectro de anisotropía obtenido junto con los datos de absorción y fluorescencia, son característicos de R-PC pura y en estado de agregación trimérico.

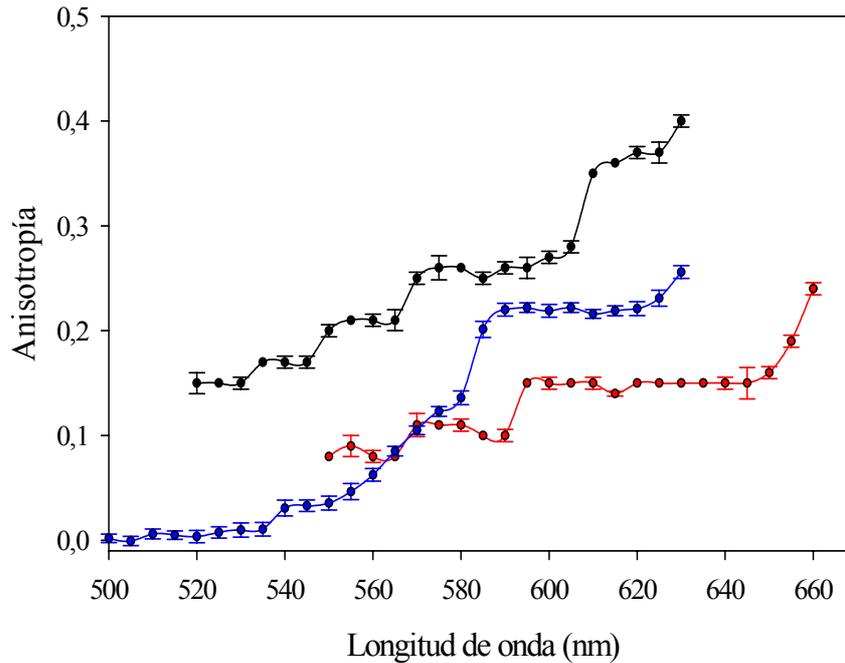


Figura 4.37

Espectros de anisotropía de fluorescencia de C-PC (—)(λ_{em} =634 nm),
 APC (—)(λ_{em} =660 nm y 675nm) y R-PC (—)(λ_{em} =635 y 650 nm).

Los valores de anisotropía de fluorescencia son la media de tres determinaciones y las barras de error reflejadas corresponden a la desviación estándar de las mismas.

Todos los datos espectroscópicos mostrados para las tres ficocianinas están en buena concordancia con los obtenidos previamente por otros autores (MacColl y col., 1971; Saito y col., 1974; Mimuro y col., 1986; Glazer, 1999), lo que permite aseverar que las macromoléculas han sido purificadas correctamente y en los estados de agregación descritos.

4.2.4.2.-Electroforesis.

La utilización de ensayos electroforéticos es una herramienta fundamental en estudios que involucran la obtención y caracterización de macromoléculas biológicas como son las proteínas. Así, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.4, se han desarrollado geles tipo SDS-PAGE para realizar un seguimiento del proceso de purificación de C-PC en cada una de las microalgas utilizadas.

***Anabaena marina*.**

La Figura 4.38 muestra un gel de electroforesis tipo SDS-PAGE en el que se puede apreciar el avance en el proceso de purificación de C-PC procedente de *Anabaena marina*.

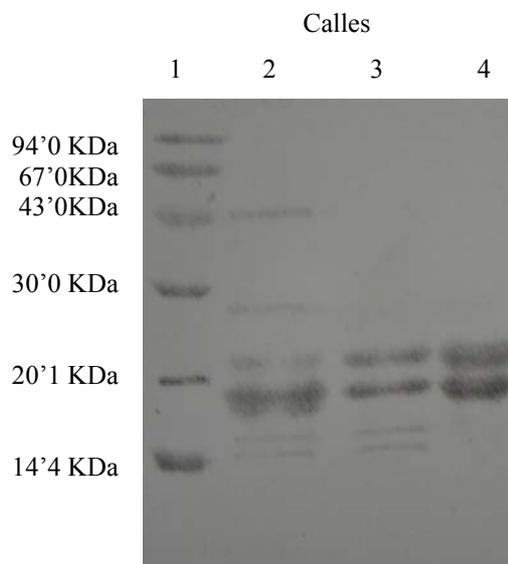


Figura 4.38

SDS-PAGE de las disoluciones procedentes de las distintas etapas del proceso de purificación de C-PC procedente de *Anabaena marina*. Calle 1 = patrones de peso molecular, calle 2 = extracto crudo de ficocianinas, calle 3 = disolución rica en ficocianinas procedentes de CALE, calle 4 = C-PC purificada tras la etapa de cromatografía de intercambio iónico.

En esta Figura 4.38, el avance de las calles 2 a 4 muestra como las proteínas contaminantes que acompañan a las ficocianinas de interés van siendo retiradas paulatinamente a medida que avanzan las etapas de purificación. Así, al final del proceso, el eluido procedente de cromatografía de intercambio iónico (calle 4), genera únicamente dos bandas bien resueltas que se asignan a las subunidades α y β de C-PC pura. Las bandas que aparecen en el gel correspondientes a las calles 2 y 3, pueden asignarse a la combinación de las subunidades α y β de C-PC, APC y a otras proteínas contaminantes que acompañan en las muestras, siendo estas bandas de menor intensidad que la correspondiente a la de la biliproteína de interés. Puede observarse como buena parte de las proteínas contaminantes procedentes del extracto crudo (calle 2) han sido eliminadas con la etapa de CALE (calle 3). En la calle 4, puede apreciarse la ausencia de bandas correspondientes a proteínas contaminantes.

Spirulina platensis.

La Figura 4.39 muestra un gel de electroforesis tipo SDS-PAGE en el cual se ve el avance en la purificación de C-PC procedente de *Spirulina platensis*.

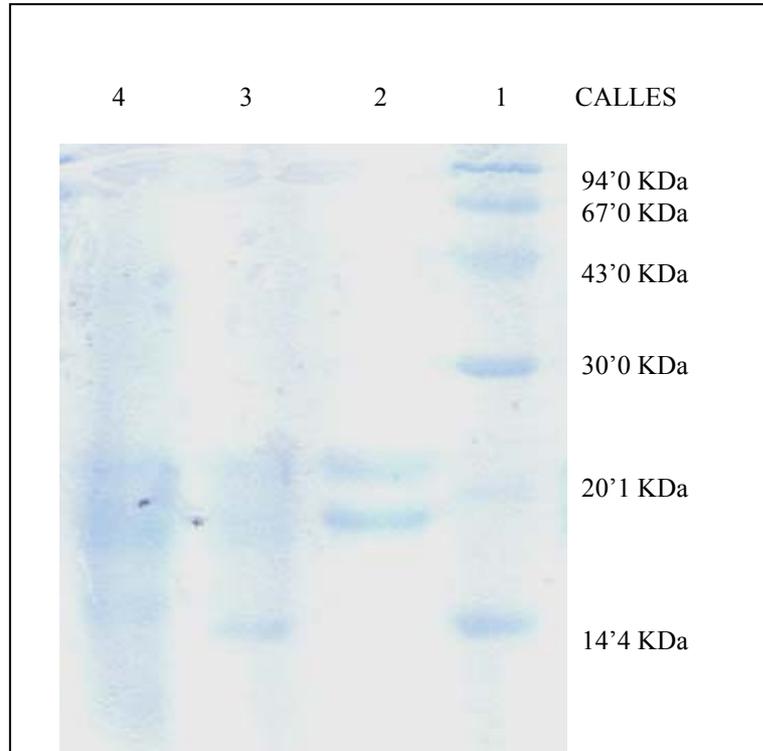


Figura 4.39

SDS-PAGE de las disoluciones procedentes de las distintas etapas del proceso de purificación de C-PC procedente de *Spirulina platensis*. Calle 4 = extracto crudo de ficocianinas, calle 3 = disolución rica en ficocianinas procedentes de CALE, calle 2 = eluido tras la etapa de cromatografía de intercambio iónico, calle 1 = patrones de peso molecular.

Al igual que ocurre con el gel anteriormente descrito, el eluido procedente de la cromatografía de intercambio iónico (calle 2) genera dos bandas bien resueltas asignándose a las subunidades α y β de C-PC pura respectivamente. Las bandas que aparecen en el gel correspondientes a las calles 3 y 4, pueden asignarse a la combinación de las subunidades α y β de C-PC, así como de APC y a otras proteínas contaminantes que acompañan en las muestras, siendo estas bandas de menor intensidad que la correspondiente a la de la biliproteína de interés. Puede observarse como buena parte de las proteínas contaminantes procedentes del extracto crudo (calle 4), han sido eliminadas con la etapa de CALE (calle 3). En la calle 2, puede apreciarse la ausencia de bandas correspondientes a proteínas contaminantes.

***Synechocystis aquatilis*.**

La Figura 4.40 muestra un gel de electroforesis tipo SDS-PAGE en el cual se ve el avance en la purificación de C-PC procedente de *Synechocystis aquatilis*.

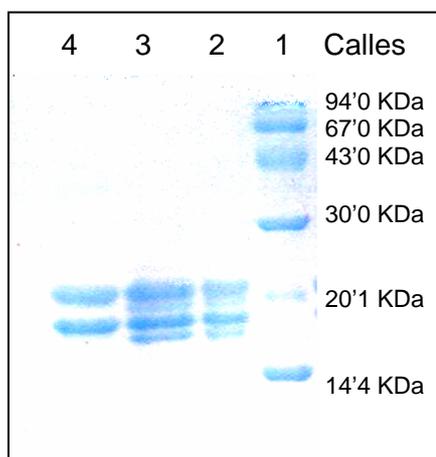


Figura 4.40

SDS-PAGE de las disoluciones procedentes de las distintas etapas del proceso de purificación de C-PC procedente de *Synechocystis aquatilis*. Calle 1 = patrones de peso molecular, calle 2 = extracto crudo de ficocianinas, calle 3 = disolución rica en ficocianinas procedentes de CALE, calle 4 = C-PC purificada tras la etapa de cromatografía de intercambio iónico.

En esta Figura y al igual que ocurría en los anteriores geles, las líneas 2, 3, y 4, muestran como las proteínas contaminantes que acompañan a las ficocianinas de interés van siendo eliminadas paulatinamente a medida que avanzan las etapas de purificación. Así, al final del proceso, el eluido procedente de la cromatografía de intercambio iónico (calle 4) genera dos bandas bien resueltas que corresponden a las subunidades α y β de C-PC pura respectivamente.

4.2.4.3.-**Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).**

Se han realizado experiencias de cromatografía líquida de alta resolución utilizando las muestras de las distintas biliproteínas purificadas y siguiendo la Metodología descrita en el apartado 3.2.6. De esta forma, se ha corroborado la pureza de las disoluciones de biliproteínas obtenidas. Así, los diferentes cromatogramas mostraron únicamente los picos

correspondientes a las subunidades α y β de C-PC, APC y R-PC, sin que aparezcan otros picos que pudieran denotar presencia de otros compuestos contaminantes.

La Figura 4.41 muestra como ejemplo, el cromatograma correspondiente a la muestra de C-PC purificada procedente de *Anabaena marina*, apareciendo el pico correspondiente a la subunidad α a 27'9 minutos y el correspondiente a la subunidad β a 31 minutos.

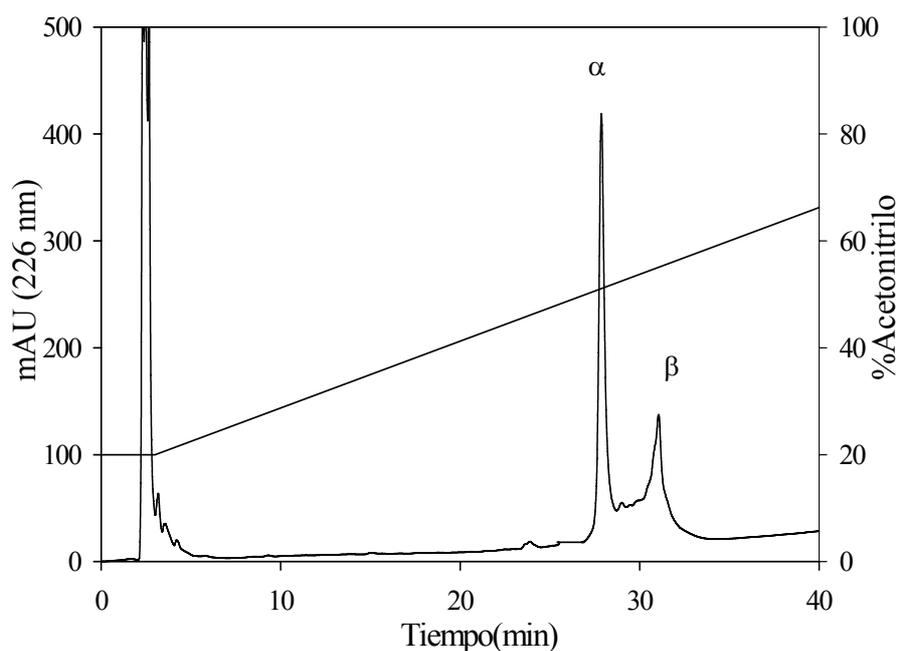


Figura 4.41

Cromatograma de la muestra de C-PC purificada de *Anabaena marina* obtenido utilizando una columna C4 (250 · 4'6 mm).

Análogamente las Figuras 4.42 y 4.43 muestran a título de ejemplo, los cromatogramas correspondientes a APC procedente de *Anabaena marina* y de R-PC procedente de *Porphyridium cruentum*.

La Figura 4.42 muestra dos picos bien resueltos a tiempos de retención de 30'9 y 36'1 minutos que pertenecen a las subunidades β y α de APC respectivamente.

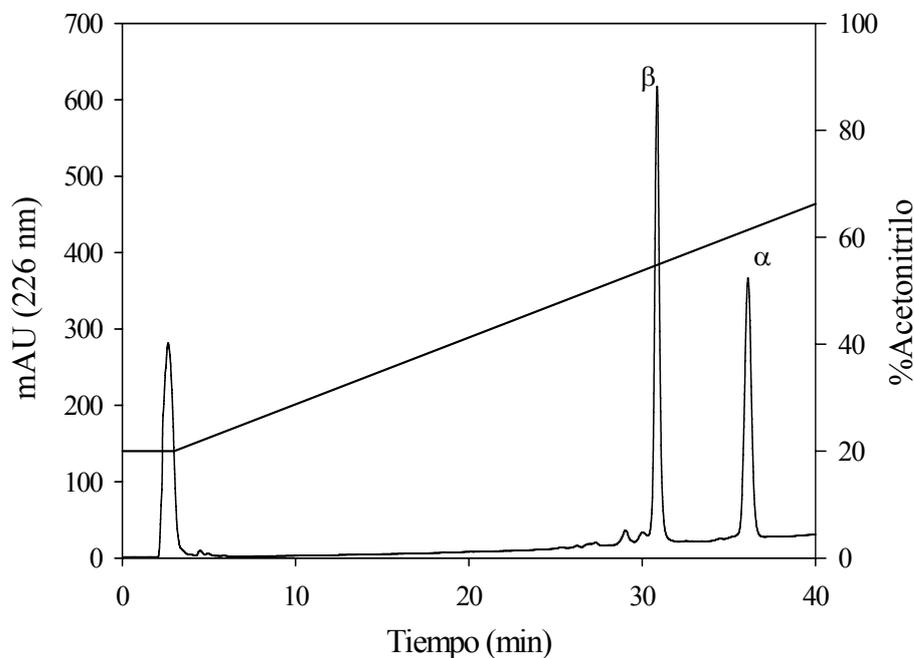


Figura 4.42

Cromatograma de la muestra de APC purificada de *Anabaena marina* obtenido utilizando una columna C4 (250 · 4'6 mm).

Analogamente, la Figura 4.43 muestra dos picos a 29'5 y a 30'3 minutos que pertenecen a las subunidades β y α respectivamente de R-PC.

La identificación de los picos se ha realizado inyectando las muestras recogidas preparativamente, en un espectrómetro de masas y comparando los datos de peso molecular con los valores publicados para las subunidades α y β . De las tres ficocianinas utilizadas la mejor separación se obtiene para APC donde los picos correspondientes a las subunidades α y β se encuentran muy bien resueltos. También se produce una buena separación para el caso de C-PC siendo algo menor la obtenida para R-PC procedente de *Porphyridium cruentum*.

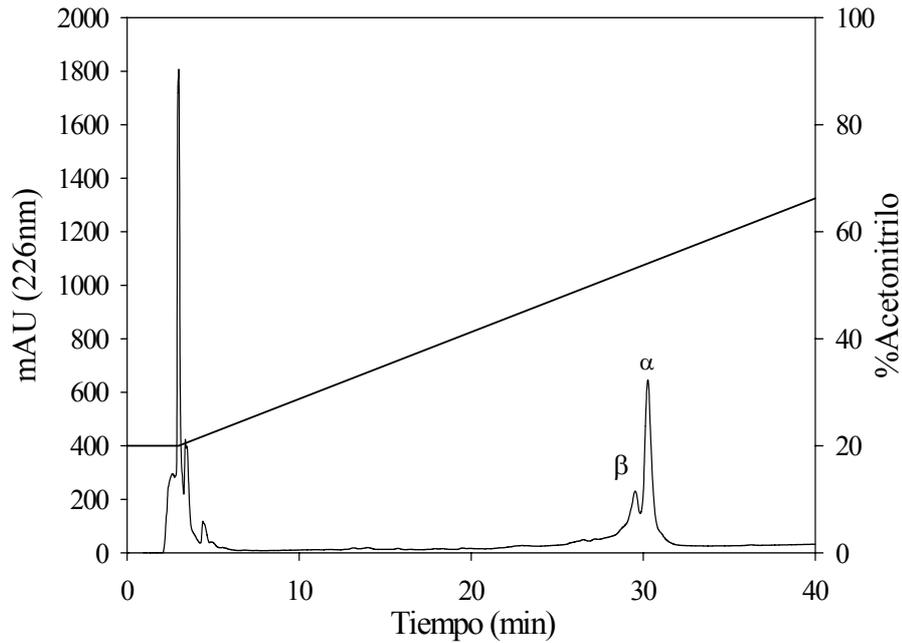


Figura 4.43

Cromatograma de la muestra de R-PC purificada de *Porphyridium cruentum* obtenido utilizando una columna C4 (250 · 4'6 mm).

4.2.5.-PLANTA PILOTO PARA LA PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE FICOCIANINAS.

Una vez estudiado el escalado del proceso de purificación utilizando CALE, se ha procedido al desarrollo de una planta piloto de producción de ficocianinas con el objetivo de obtener cantidades importantes de extracto rico en estas proteínas para poder ensayar sus potenciales aplicaciones en diferentes sectores industriales (por ejemplo como colorantes naturales en alimentación, cosmética y farmacia).

Teniendo en cuenta que de la especie microalgal *Spirulina platensis* era de la que más biomasa se disponía, la experiencia se ha desarrollado con ella.

4.2.5.1.-Columna de 50· 9 cm.

Previo a la utilización de la columna de escala piloto (15·130cm), se ha realizado una experiencia de CALE utilizando como aproximación una columna de 9 cm de diámetro interno, que complementaría al escalado del proceso para el caso de *Spirulina platensis*. Así, con los correspondientes parámetros optimizados, se ha procedido al desarrollo de una experiencia óptima en columna de 9 cm, utilizando el extracto crudo de ficocianinas procedente de *Spirulina platensis*. El proceso a seguir es el que se describe en el apartado 3.2.2.3.2 de Métodos. Los parámetros de trabajo han sido: altura del relleno $H_0=15$ cm, grado de expansión $H/H_0=2$, carga proteica 0'91 mg C-PC/ml adsorbente, viscosidad 1'084 mP, fase móvil de equilibrado y lavado tampón fosfato pH 7 (50 mM) y fase de elución tampón fosfato pH 7 (500mM). Como en los anteriores experimentos, el comportamiento del lecho expandido estuvo cercano a la idealidad, sin observarse canales preferentes de ascenso de la muestra que pudieran provocar pérdidas irreversibles de las ficocianinas de interés. Los tiempos de operación empleados para esta columna se muestran en Tabla 4.60.

Tabla 4.60

Tiempos de operación en las etapas de CALE en columna de 50 · 9 cm,
para el extracto de C-PC proveniente de *Spirulina platensis*.

[C-PC]_{extracto}=0'3 mg/ml.

SUBETAPA	TIEMPO (min)
Equilibrado	85
Aplicación	19
Lavado	34
Elución	40
Limpieza	87
TOTAL	265

Análogamente a como se ha procedido en todas las experiencias anteriores de CALE, para seguir la evolución del proceso, se ha procedido a monitorizar todas las subetapas, midiendo espectrofotométricamente las fracciones recogidas a la salida de la columna. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.61 y 4.62 (Anexo 5).

La Figura 4.44 muestra el perfil cromatográfico de la experiencia de CALE para el extracto de C-PC procedente de *Spirulina platensis*, donde se puede seguir el valor de la absorbancia a 615 nm característica de C-PC, en función del volumen eluido en cada momento como variable de monitorización del proceso completo de CALE.

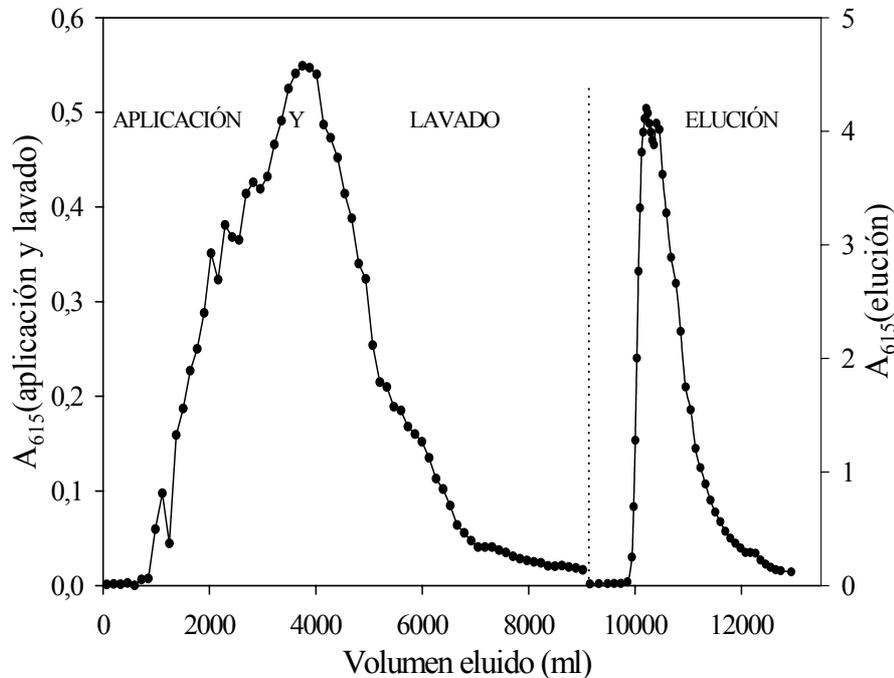


Figura 4.44

Perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de 50 · 9cm. Microalga *Spirulina platensis*. Volumen extracto aplicado= 3000ml. Vflujo (aplicación y lavado)= 149 cm h⁻¹.
Vflujo (elución)= 89 cm h⁻¹. [C-PC]_{extracto}=0'3 mg/ml.

La cantidad de C-PC recuperada durante la etapa de lecho expandido para el extracto proveniente de *Spirulina platensis*, expresada como porcentaje de la cantidad total en el eluido por cantidad de biliproteína cargada en la matriz cromatográfica mediante aplicación de la muestra es igual al 76'4 %.

4.2.5.2.-Columna escala piloto para producción de ficocianinas (15 · 130 cm)

Tras el correspondiente escalado del proceso de CALE usando columnas de 1'5, 2'5 , 4 y 6 cm de diámetro y después de comprobar que la experiencia en columna de 9 cm también ha generado resultados satisfactorios, se ha procedido al desarrollo de una planta piloto para la

recuperación a gran escala de ficocianinas a través de CALE. Con los correspondientes parámetros optimizados, se ha desarrollado una experiencia óptima en columna de 130 · 15 cm utilizando el extracto crudo de ficocianinas procedente de *Spirulina platensis* (Imagen 4.10).



Imagen 4.10

Columna escala piloto (130 · 15 cm) de CALE para la obtención de ficocianinas procedentes de *Spirulina platensis*.

Los parámetros de trabajo han sido: altura del relleno $H_0=46$ cm, grado de expansión $H/H_0=2$, carga proteica 0'91 mg C-PC/ml adsorbente por lo que se cargaron 7410 mg de C-PC, viscosidad 1'084 mP, volumen total de muestra 9599 ml, fase móvil de equilibrado y lavado tampón fosfato pH 7 (50 mM) y fase de elución tampón fosfato pH 7 (500mM). Como se puede comprobar, en este caso se ha utilizado una $H_0=46$ cm (en vez de 15cm), con objeto de obtener la mayor cantidad posible de ficocianinas. Los tiempos de operación empleados para la experiencia de planta piloto se muestran en Tabla 4.63 y los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.64 y 4.65 (Anexo 6).

Tabla 4.63

Tiempos de operación en las etapas de CALE en columna de 130 · 15 cm para el extracto de C-PC proveniente de *Spirulina platensis*.

SUBETAPA	TIEMPO (min)
Equilibrado	120
Aplicación	22
Lavado	120
Elución	150
Limpieza	180
TOTAL	592

La Imagen 4.11 muestra en detalle el comportamiento del lecho expandido, sin observarse canales preferentes de ascenso de la muestra (comportamiento cercano al denominado “flujo en tapón”).

La Figura 4.45 muestra el perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en planta piloto para el extracto de C-PC procedente de *Spirulina platensis*, donde se puede seguir el valor de la absorbancia a 615 nm característica de C-PC en función del volumen eluido en cada momento como variable de monitorización del proceso completo de CALE.



Imagen 4.11

Detalle del ascenso homogéneo de la muestra en CALE para la obtención de ficocianinas procedentes de *Spirulina platensis*.

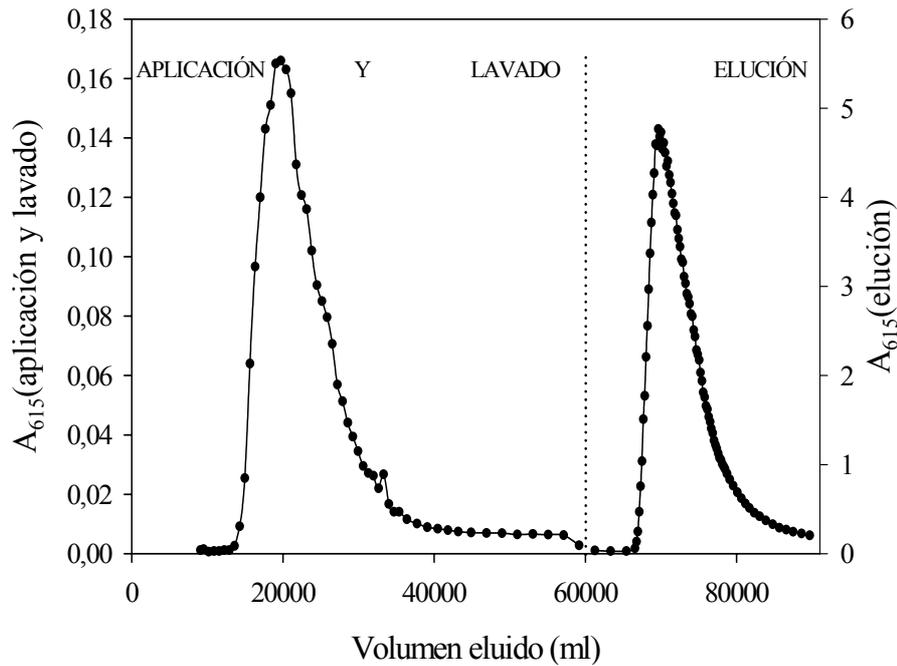


Figura 4.45

Perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de 130 · 15 cm.

Volumen extracto aplicado= 9599 ml. Vflujo (aplicación y lavado)= 160 cm h⁻¹.

Vflujo (elución)= 150 cm h⁻¹. [C-PC]_{extracto}= 0'77 mg/ml. Microalga *Spirulina platensis*.

La Imagen 4.12 muestra como las ficocianinas de interés se quedan retenidas en el lecho cromatográfico, mientras que otras moléculas como carotenos y clorofilas no son adsorbidas por el relleno y salen por la parte superior del lecho cromatográfico.

La cantidad de C-PC de recuperada en la planta piloto expresada como porcentaje de la cantidad total en el eluido por cantidad de biliproteína cargada en la matriz cromatográfica mediante aplicación de la muestra es igual al 79 %. Esta experiencia genera una importante cantidad de ficocianinas y prueba de ello es la obtención de 5870 mg de C-PC, lo cual justificaría la utilización de CALE para la obtención de ficobiliproteínas para su aplicación industrial (Imagen 4.13).



Imagen 4.12

Detalle de la aplicación de la muestra en CALE para obtener ficocianinas de *Spirulina platensis*. En la parte superior se puede apreciar como eluyen las moléculas no adsorbidas por el relleno, como por ejemplo las clorofilas.



Imagen 4.13

Detalle de la elución de grandes cantidades de ficocianinas en CALE para la microalga *Spirulina platensis*.

Este resultado, muestra la eficiencia del proceso de escalado desarrollado habiendo utilizado en la planta piloto con columna de 15 cm de diámetro interno, lo que supone un factor de escala 100 veces superior a la columna de 50·1'5 cm, en base a la sección transversal del flujo. La Tabla 4.66 resume todos los parámetros del escalado y planta piloto, derivados de la experiencia de CALE desarrolladas para obtener ficocianinas procedentes de la cianobacteria *Spirulina platensis*.

Tabla 4.66
Resumen de los datos del escalado y escala planta piloto para la recuperación de C-PC (procedente de *Spirulina platensis*) a través de CALE.

Diámetro de columna (cm)	C-PC cargada (mg)	Volumen muestra (ml)	[C-PC] muestra (mg/ml)	Factor elución (SBV) *	Pico elución (ml)	Volumen relleno sedimentado (ml)	Tiempo total (min)	Recuperación de C-PC (%)
1'5	24	80	0'30	9'6	254	26'5	141	75'5
2'5	67	222	0'30	11'2	826	74	209	74'2
4	172	568	0'30	12'5	2376	189	230	76'5
6	386	1275	0'30	10'5	4473	424	249	76'8
9	868	3000	0'30	12'3	11720	954	265	76'4
15	7410	9599	0'77	**	71150	8143	592	79'0

*: El factor de dilución se obtiene dividiendo el volumen del pico de elución por el volumen de relleno sedimentado.

** : El valor SBV para la columna de 15 cm de diámetro no se muestra ya que no es comparativo con el resto debido a que la altura de lecho sedimentado utilizada para esta columna fue de 46 cm (con el fin de conseguir gran cantidad de ficocianinas purificadas) frente a los 15 cm para el resto de las columnas.

4.3.-CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE BILIPROTEINAS Y SUS SUBUNIDADES.

Una vez obtenidas las diferentes ficocianinas, se ha realizado la caracterización físico-química de las macromoléculas purificadas en su forma nativa trimérica. Además, se ha procedido a obtener de forma semipreparativa las subunidades α y β constitutivas de las ficocianinas y también se han caracterizado.

4.3.1.-CARACTERIZACIÓN DE LAS FICOCIANINAS PURIFICADAS.

A continuación se muestran los resultados de la caracterización de las ficocianinas purificadas: C-PC de *Anabaena marina*, *Spirulina platensis* y *Synechocystis aquatilis*, APC de *Spirulina platensis* y R-PC de *Porphyridium cruentum*.

4.3.1.1.-Determinación de pesos moleculares.

En este apartado se muestran los pesos moleculares de las biliproteínas purificadas, calculados fundamentalmente utilizando electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Además, en los casos en que fue posible, se calculó también el peso molecular de algunas subunidades mediante espectrometría de masas, como se indica en el apartado 3.2.3.4 de Métodos.

C-ficocianina procedente de *Anabaena marina*.

El peso molecular correspondiente a las subunidades de C-PC procedente de *Anabaena marina* ha sido de 17.648 Da para la subunidad α y 20.527 Da para la subunidad β calculados por comparación con los patrones de peso molecular en el gel de electroforesis SDS-PAGE (Figura 4.38). Así, el monómero ($\alpha\beta$) tendrá por tanto un peso molecular de 38.175 Da y la proteína en estado de agregación trimérico posee un peso molecular de 114.525 Da.

El peso molecular determinado mediante electroforesis en gel tiene asociado un error de aproximadamente un 5%, debido a la propia naturaleza de la técnica. En este caso y como ejemplo de determinación de pesos moleculares utilizando espectrometría de masas, se ha determinado el valor correspondiente a la subunidad α de C-PC obteniéndose un valor de 17.909 Da (Figura 4.46).

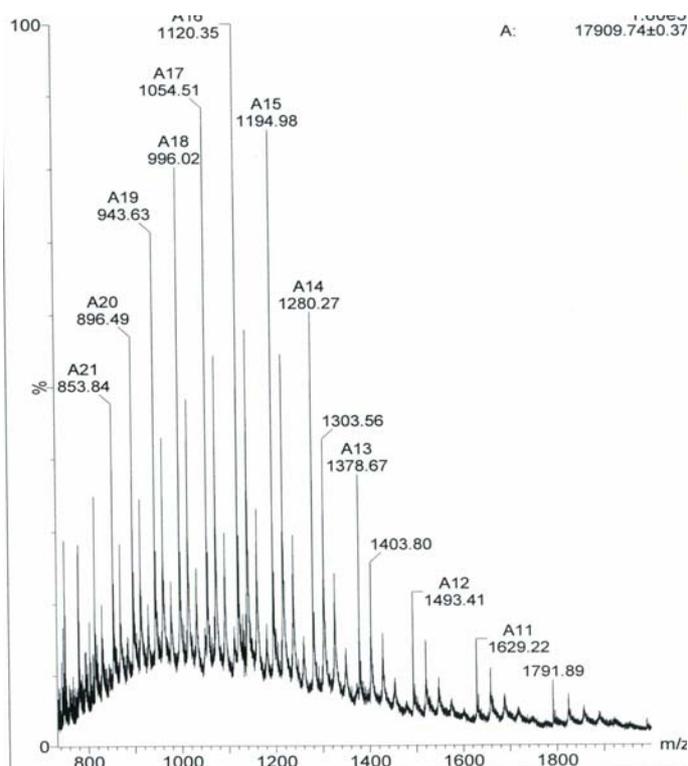


Figura 4.46

Espectro de masas correspondiente a la subunidad α de C-PC purificada de *Anabaena marina*.

C-PC procedente de *Spirulina platensis*.

De la misma forma, el peso molecular de C-PC procedente de *Spirulina platensis* se ha calculado mediante SDS-PAGE, obteniéndose un valor de 17783 Da para la subunidad α y 20.893 Da para la subunidad β (Figura 4.39). Con estos resultados, el monómero ($\alpha\beta$) tendrá un peso molecular de 38.676 dalton y la proteína en estado de agregación trimérico tendría un peso molecular de 116.028 Da.

C-PC procedente de *Synechocystis aquatilis*.

Análogamente, el peso molecular calculado para cada subunidad de C-PC procedente de *Synechocystis aquatilis* ha sido de 17.783 Da para la subunidad α y 20.100 Da para la subunidad β respectivamente (Figura 4.40). Así el monómero ($\alpha\beta$) tendría un peso molecular de 37.883 Da y el trímero de 113.649 Da.

Como resumen de los resultados obtenidos, los valores de pesos moleculares obtenidos para la C-PC de las diferentes especies de microalgas utilizadas, son bastantes similares entre sí y están en buena concordancia con los publicados por otros autores para C-PC procedente de otros microorganismos (O'Carra 1970; Bennett y Bogorad, 1971; Glazer y Cohen-Bazire, 1971; O'Carra y Kilillea, 1971; Glazer y Fangs, 1973; Wolfgang y Werner, 1988; Algarra y col., 1990; Hilditch y col., 1991).

Aloficocianina.

Para el caso de APC, los pesos moleculares de las subunidades de aloficocianina se han determinado experimentalmente por espectrometría de masas utilizando la proteína purificada de *Spirulina platensis* (Figuras 4.47 y 4.48). Así, se han obtenido valores de 17.864 Da para la subunidad α y 17.931 Da para la subunidad β , lo que genera un valor de peso molecular para el monómero ($\alpha\beta$) de 35.795 Da y para el trímero ($\alpha\beta$)₃ de 107.385 Da. Estos resultados están en concordancia con los publicados en la base de datos UniprotKB para APC de *Spirulina platensis* y los publicados por Cohen-Bazire y col., (1977), Rusckowski y Zilinskas (1982) y Wolfgang y Werner (1988) para APC de diferentes especies.

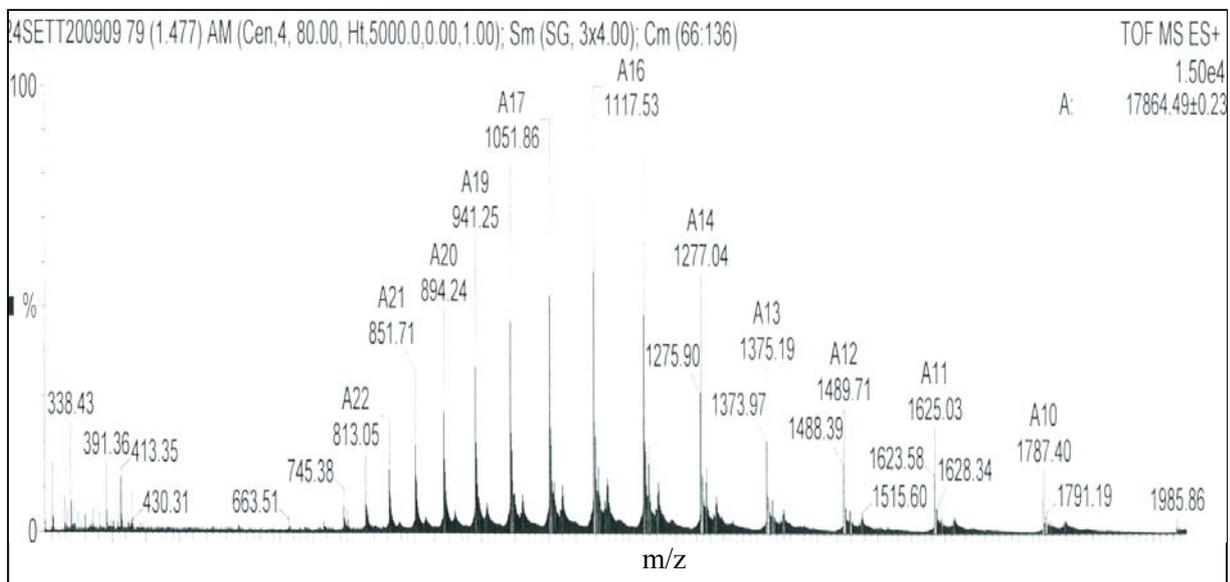


Figura 4.47

Espectro de masas correspondiente a la subunidad α de APC purificada de *Spirulina platensis*.

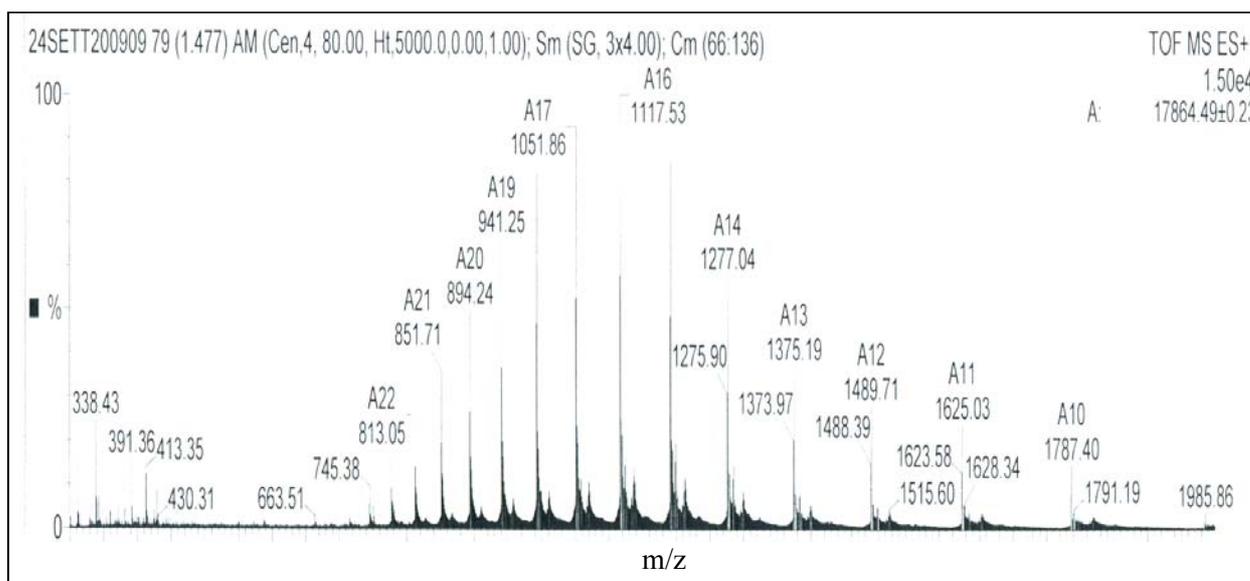


Figura 4.48

Espectro de masas correspondiente a la subunidad β de APC purificada de *Spirulina platensis*.

R-ficocianina.

Respecto a R-ficocianina, los pesos moleculares determinados mediante SDS-PAGE han sido 18.170 y 19.250 Da para las subunidades α y β respectivamente. Estos valores son similares a los previamente publicados por otros autores para R-PC procedente de diferentes microalgas (Glazer y Hixson, 1975; Zeng y col., 1992; Jiang y col., 2001; Ma y col., 2008). A título de ejemplo, el peso molecular determinado experimentalmente por espectrometría de masas (Figura 4.49) ha sido de 18.050 Da para la subunidad α . Este valor coincide con el publicado por Ducret y col. (1994) para R-PC de *Porphyridium cruentum*.

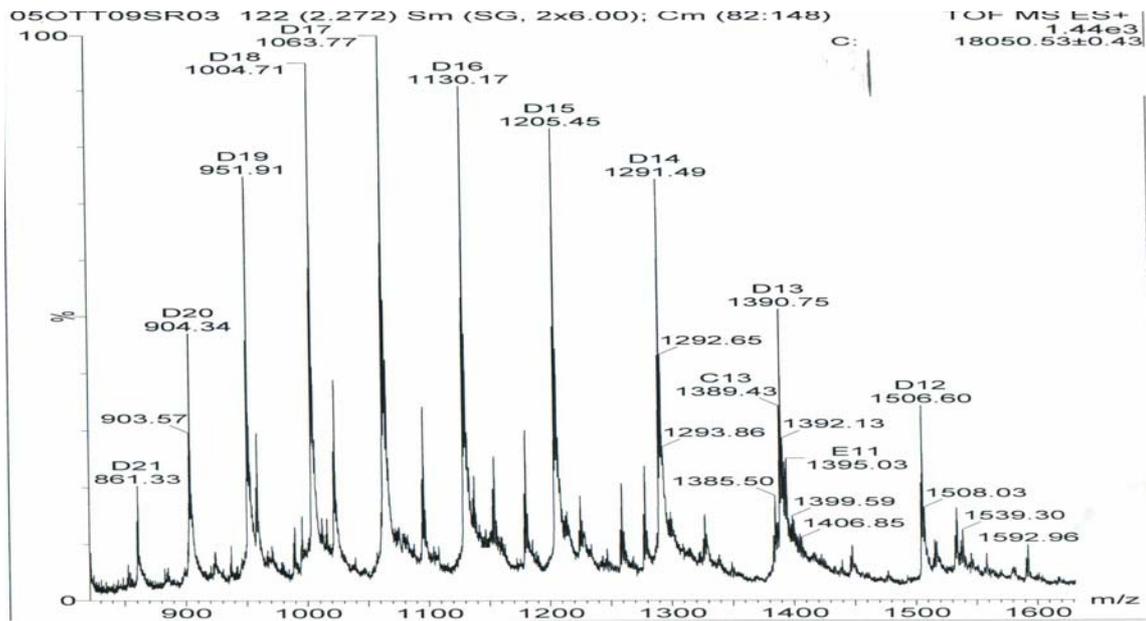


Figura 4.49

Espectro de masas correspondiente a la subunidad β de R-PC procedente de *Porphyridium cruentum*.

4.3.1.2.-Determinación de los parámetros espectroscópicos.

4.3.1.2.1.- Coeficiente de extinción molar.

Se han realizado medidas de absorbancia a disoluciones con diferentes concentraciones de ficocianinas, con el fin de determinar el coeficiente de extinción molar a través de la ley de Lambert-Beer ($A=\varepsilon \cdot b \cdot c$), donde “ ε ” es el coeficiente de extinción molar, “ b ” el camino óptico y “ c ” la concentración de la disolución correspondiente.

La Tabla 4.67 muestra el resumen de todos los datos obtenidos en estas experiencias para C-PC, APC y R-PC.

Las Figuras 4.50, 4.51 y 4.52 muestran el comportamiento de la absorbancia monitorizada en el máximo visible de cada proteína, en función de la concentración de cada una de las disoluciones ensayadas.

Tabla 4.67

Parámetros espectroscópicos de absorción de las distintas ficocianinas en función de la concentración.

Parámetro	C-PC	APC	R-PC
Rango de concentración ensayado (M)	$[0-43 \cdot 10^{-7}]$	$[0-30 \cdot 10^{-7}]$	$[0-14 \cdot 10^{-7}]$
Rango de concentración de respuesta lineal (M)	$[0-15 \cdot 10^{-7}]$	$[0-10 \cdot 10^{-7}]$	$[0-8 \cdot 10^{-7}]$
Ordenada en el origen (*)	-0'0034	-0'0068	0'0068
Pendiente (*)	$6'7 \cdot 10^5$	$11'65 \cdot 10^5$	$3'17 \cdot 10^5$
r^2 (*)	0'998	0'998	0'999
Coefficiente de extinción molar ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$) (*)	$\epsilon_{615} = 6'7 \cdot 10^5$	$\epsilon_{652} = 1'165 \cdot 10^6$	$\epsilon_{618} = 3'17 \cdot 10^5$

(*) Datos calculados mediante ajuste en la zona de respuesta lineal.

C-ficocianina.

En la Figura 4.50 se muestra la representación de la absorbancia a 615nm frente a la concentración de C-PC. De ella puede deducirse, que existe una buena linealidad hasta una concentración de $15 \cdot 10^{-7}$ M. Mediante regresión de la zona lineal de los datos y la aplicación de la ley de Lambert-Beer, se ha calculado el coeficiente de extinción molar de C-PC (Tabla 4.67).

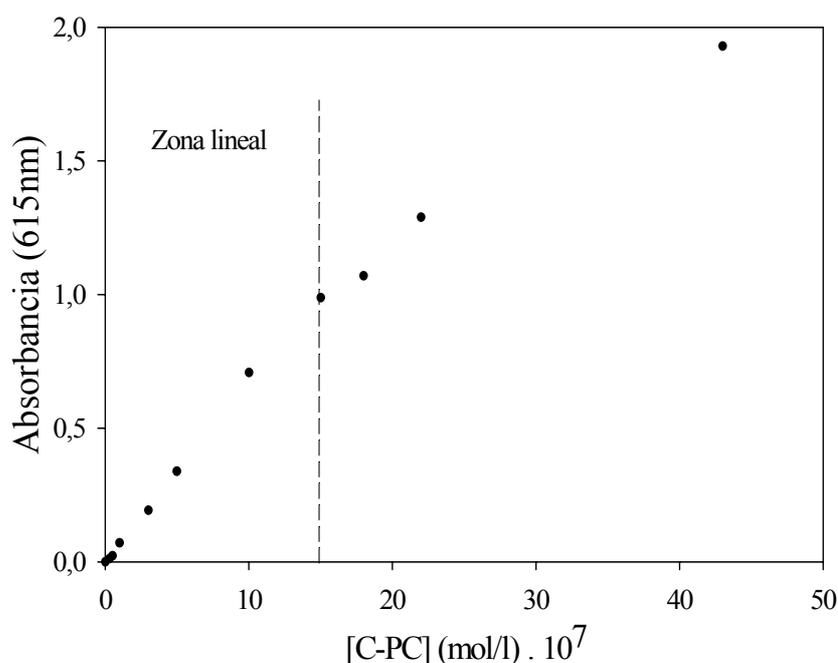


Figura 4.50

Absorbancia de C-PC a 615 nm en función de la concentración.

El coeficiente de extinción molar calculado ha sido de $6,7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y este resultado está en buena concordancia con los obtenidos por Bryant y col., (1976) trabajando con C-PC procedente de *Anabaena variabilis* ($\epsilon_{615}=2,9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y de *Anabaena sp* ($\epsilon_{615}=2,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Aloficocianina.

Analogamente, la Figura 4.51 muestra la representación de la absorbancia a 652nm frente a la concentración de APC. De ella puede deducirse que existe una buena linealidad hasta una concentración de $10 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ y mediante regresión de la zona lineal de los datos y la aplicación de la ley de Lambert-Beer, se ha obtenido un coeficiente de extinción molar igual a $\epsilon_{652}=11,65 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Tabla 4.67).

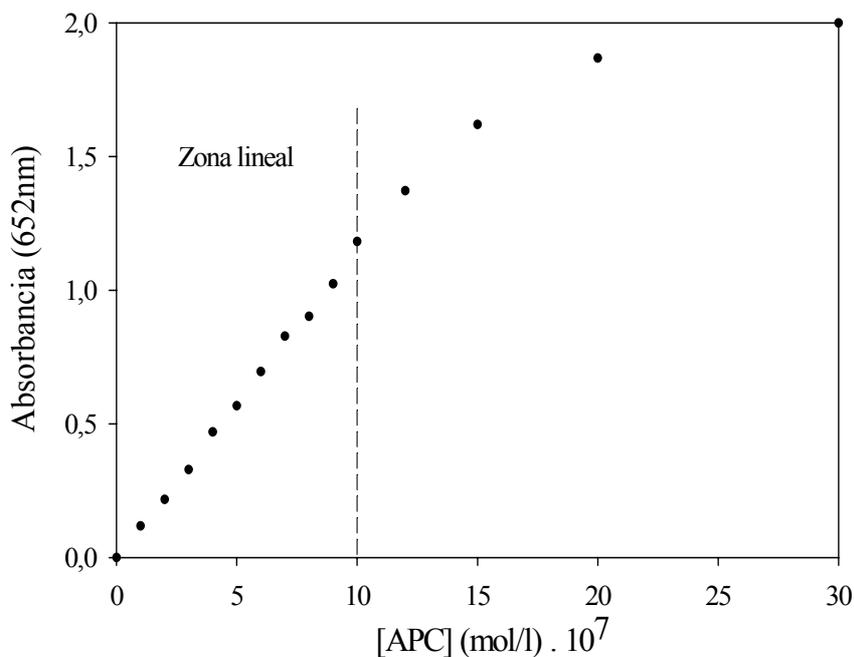


Figura 4.51

Absorbancia de APC a 652 nm en función de la concentración.

Este resultado está en concordancia con el obtenido por Glazer y Stryer (1984) trabajando con APC procedente de *Anabaena variabilis* ($\epsilon_{652}=7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

R-ficocianina.

Finalmente, para el caso de R-PC procedente de *Porphyridium cruentum*, la Figura 4.52 muestra la representación de la absorbancia a 618nm frente a la concentración de R-PC. De ella puede deducirse que existe una buena linealidad hasta una concentración de $8 \cdot 10^{-7}$ M. Mediante regresión de la zona lineal de los datos y la aplicación de la ley de Lambert-Beer se ha calculado un coeficiente de extinción molar de $\epsilon_{618} = 3'17 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Tabla 4.67).

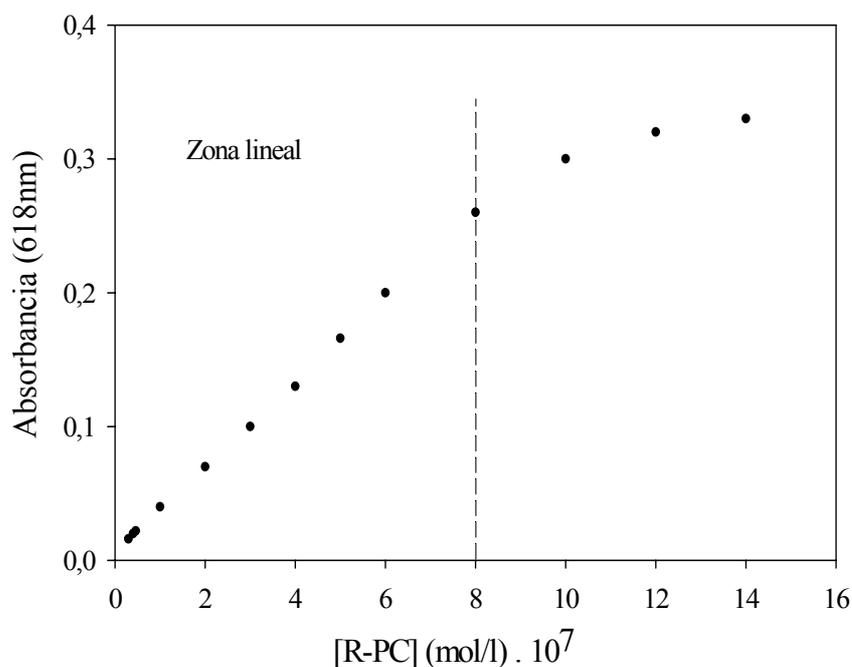


Figura 4.52

Absorbancia de R-PC a 618 nm en función de la concentración.

Estos resultados están en buen acuerdo con los obtenidos por Glazer y Hixson (1975) trabajando con R-PC procedente igualmente de *Porphyridium cruentum* ($\epsilon_{618} = 2'6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y con el reportado por Zeng y col., (1992) para R-PC procedente de *Porphyra haitanensis* ($\epsilon_{618} = 3'6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.3.1.2.2.- Intervalo lineal entre intensidad de fluorescencia y concentración.

Se han realizado medidas de emisión de fluorescencia en estado estacionario en función de la concentración de las ficocianinas, con el fin de determinar el intervalo lineal de respuesta, también denominada zona de cumplimiento de la ley de Kavanagh ($I_F = K \cdot c$), donde I_F es la intensidad relativa de fluorescencia, “c” es la concentración de compuesto fluorescente y “K” es la denominada constante de Kavanagh, que engloba a parámetros tales

como el rendimiento cuántico de fluorescencia y la intensidad de radiación incidente, entre otros.

La Tabla 4.68 muestra el resumen de todos los parámetros fluorimétricos obtenidos para las distintas ficocianinas ensayadas.

Tabla 4.68
Parámetros espectroscópicos de fluorescencia de las distintas biliproteínas en función de la concentración.

Parámetro	C-PC	APC	R-PC
Rango de concentración ensayado (M)	[0-19·10 ⁻⁸]	[0-20·10 ⁻⁸]	[0-18·10 ⁻⁸]
Rango de concentración de respuesta lineal (M)	[0-15·10 ⁻⁸]	[0-14·10 ⁻⁸]	[0-10·10 ⁻⁸]
Ordenada en el origen (*)	0'193	9'91	1'23
Pendiente (*)	47·10 ⁸	55·10 ⁸	57·10 ⁸
r ² (*)	0'999	0'999	0'998
Coefficiente de Kavanagh, K (M ⁻¹) (*)	K ₆₃₄ =47·10 ⁸	K ₆₆₀ =55·10 ⁸	K ₆₃₂ =57·10 ⁸

(*) Datos calculados mediante ajuste en la zona de respuesta lineal.

Las Figuras 4.53, 4.54 y 4.55 muestran los comportamientos espectroscópicos a nivel de intensidad de fluorescencia, en función de la concentración de las distintas disoluciones ensayadas de C-PC, APC y R-PC.

C-ficocianina.

En la Figura 4.53 se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de C-PC. En las condiciones experimentales utilizadas, la concentración máxima de C-PC que puede usarse es 19·10⁻⁸ M, ya que por encima de ésta se satura el detector. Existe buena linealidad hasta una concentración aproximada de 15·10⁻⁸ M y el ajuste de los datos (Tabla 4.68) genera un valor de constante de Kavanagh igual a K= 47·10⁸ M⁻¹.

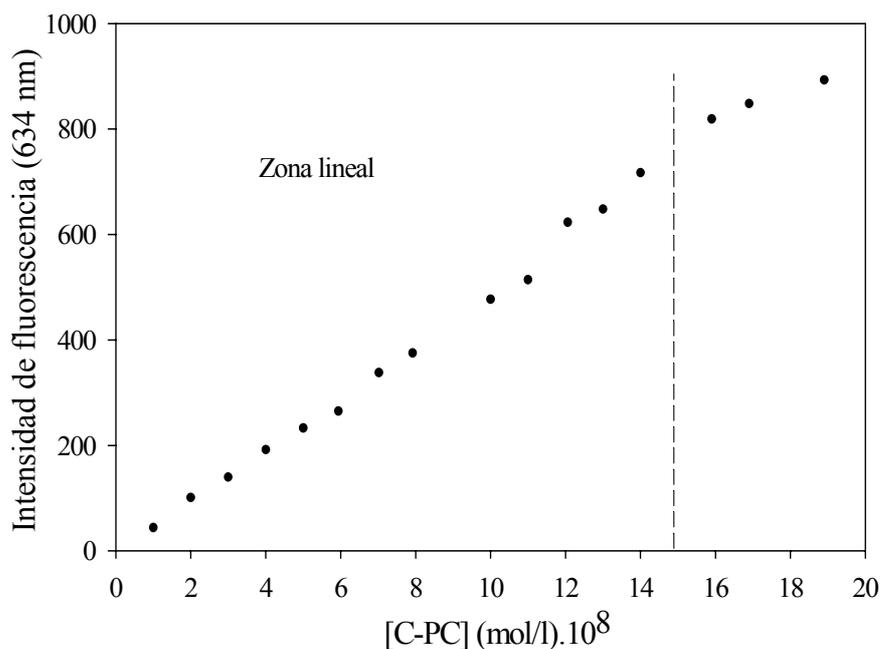


Figura 4.53

Intensidad relativa de fluorescencia a 634 nm en función de la concentración de C-PC.
 $(\lambda_{\text{exc}} = 590 \text{ nm}; \Delta\lambda_{\text{exc}} = 5 \text{ nm}, \Delta\lambda_{\text{em}} = 10 \text{ nm}).$

Alofocianina.

Analogamente, en la Figura 4.54 se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de APC.

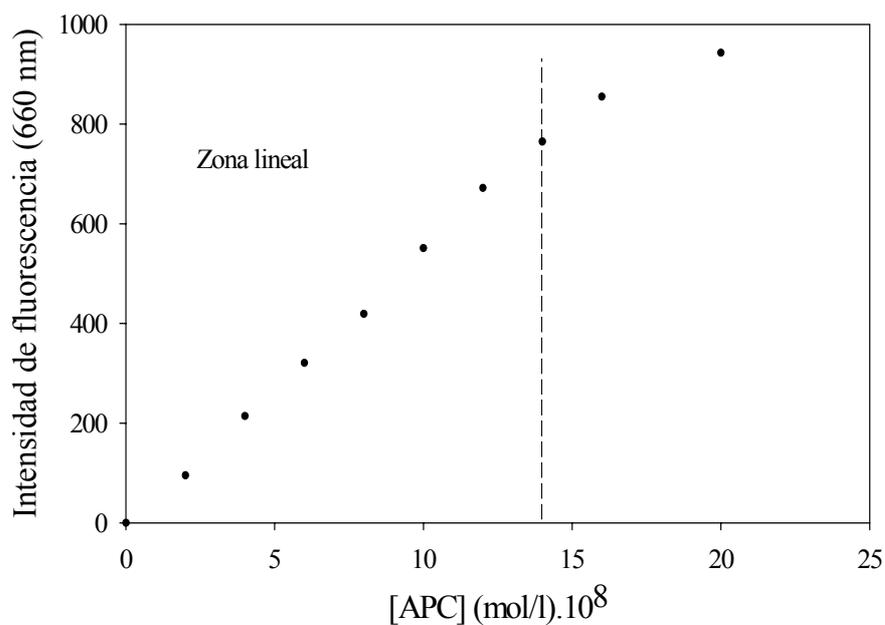


Figura 4.54

Intensidad relativa de fluorescencia a 660 nm en función de la concentración de APC.
 $(\lambda_{\text{exc}} = 583 \text{ nm}; \Delta\lambda_{\text{exc}} = 5 \text{ nm}, \Delta\lambda_{\text{em}} = 10 \text{ nm}).$

En las condiciones experimentales utilizadas la concentración máxima de APC que puede usarse es $20 \cdot 10^{-8}$ M ya que por encima de ésta se satura el detector. Observando la Figura se puede apreciar que existe buena linealidad hasta una concentración aproximada de $14 \cdot 10^{-8}$ M. El ajuste de los datos (Tabla 4.68) genera un valor de la constante de Kavanagh igual a $K = 55 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$.

R-ficocianina.

Para el caso de R-PC, la Figura 4.55 muestra la variación de la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de R-PC. Como se puede apreciar existe linealidad hasta una concentración aproximada de $10 \cdot 10^{-8}$ M y los valores del ajuste (Tabla 4.68) generan un valor de la constante de Kavanagh igual a $K = 57 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$.

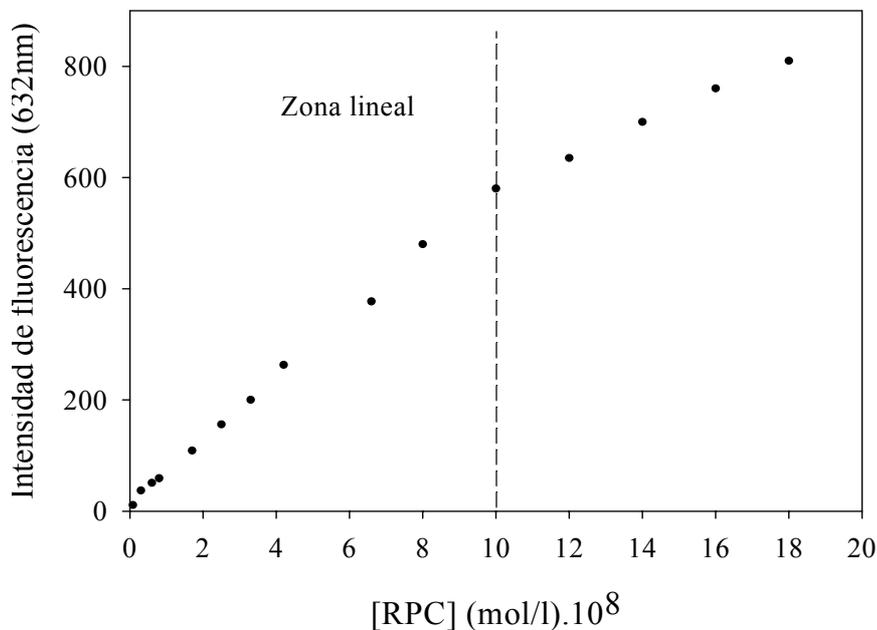


Figura 4.55

Intensidad relativa de fluorescencia a 632 nm en función de la concentración de R-PC.

$$(\lambda_{\text{exc}} = 540 \text{ nm}; \Delta\lambda_{\text{exc}}, \Delta\lambda_{\text{em}} = 5 \text{ nm}).$$

Los resultados obtenidos demuestran que las ficocianinas ensayadas poseen muy buenas características fluorescentes, con constantes de Kavanagh muy altas, siendo únicamente superados por otro tipo de biliproteínas, como son las pertenecientes a la familia de las ficoeritrinas y que se suelen encontrar en microalgas rojas.

4.3.1.3.- **Estabilidad.**

Las biliproteínas, como macromoléculas biológicas con estructura bien definida, tras el proceso de purificación seguido para su obtención, pueden sufrir alteraciones debido a diferentes variables que pueden modificar su conformación estructural. Por esto, se ha estudiado la estabilidad de las ficocianinas en función del pH y la fuerza iónica del medio, así como la estabilidad a lo largo del tiempo.

4.3.1.3.1.- **Estabilidad frente al pH.**

La estabilidad de las disoluciones de ficocianinas en función del pH, se ha estudiado a través de medidas de absorbancia y de emisión de fluorescencia en un rango de pH de 2 a 11. Los distintos valores de pH en las disoluciones utilizadas, se han alcanzado según la metodología descrita en el apartado 3.2.1.

C-ficocianina.

Conocidos los intervalos en donde existe linealidad entre absorbancia-fluorescencia y concentración, se han preparado disoluciones de C-PC de concentración $8 \cdot 10^{-8} \text{M}$ (0'009 mg/ml) en tampón fosfato 20mM a cada uno de los pH a ensayar.

La Figura 4.56 muestra los valores de absorbancia a 615 nm y de intensidad de fluorescencia a 634nm, de las muestras de C-PC a los diferentes valores de pH ensayados. En ella puede observarse que C-PC es estable en el rango de pH 4-9, donde aparecen los valores mayores de absorbancia y de fluorescencia, mientras que para valores fuera de este rango, es decir pH mayores de 9 y menores de 4, existe una considerable disminución y pérdida de las propiedades espectroscópicas.

Se presentan además, los espectros de absorbancia y de emisión de fluorescencia en las Figuras 4.57 y 4.58, donde puede apreciarse que los correspondientes al intervalo de pH 4-9 permanecen prácticamente invariables, lo que denota estabilidad de la proteína en ese rango. Sin embargo, para los demás valores de pH, el espectro de absorción presenta diferentes máximos y alturas (pH 2 y 3) o incluso se muestra distorsionado (pH 10 y 11). En el caso de los espectros de fluorescencia para estos valores de pH, éstos aparecen completamente distorsionados.

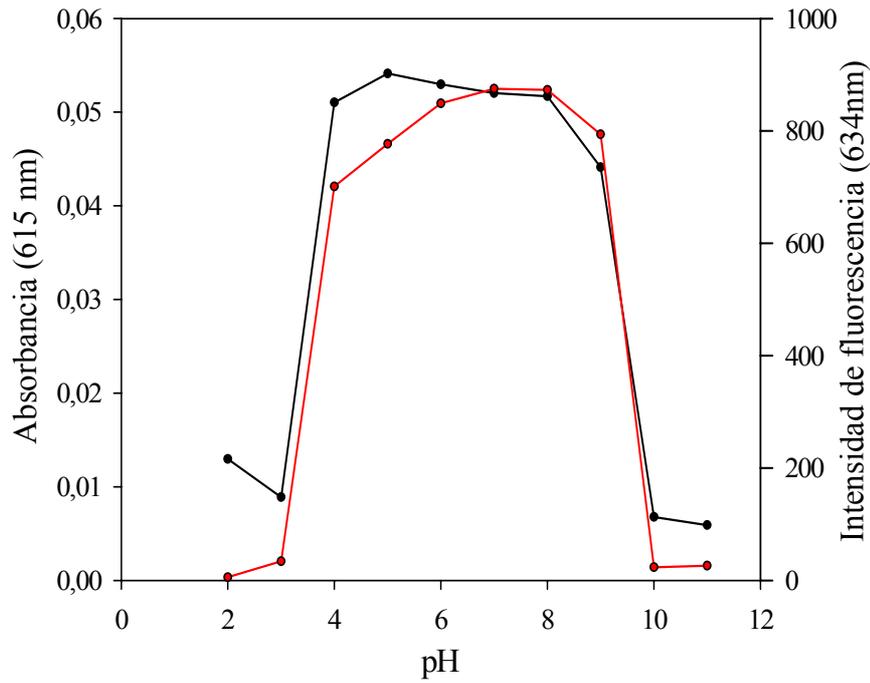


Figura 4.56

Valores de absorbancia (—) e intensidad de fluorescencia (—) ($\lambda_{exc}=560nm; \Delta\lambda_{exc}=\Delta\lambda_{emi}=10nm$) de disoluciones de C-PC en función del pH del medio. $[C-PC]=8 \cdot 10^{-8}M$.

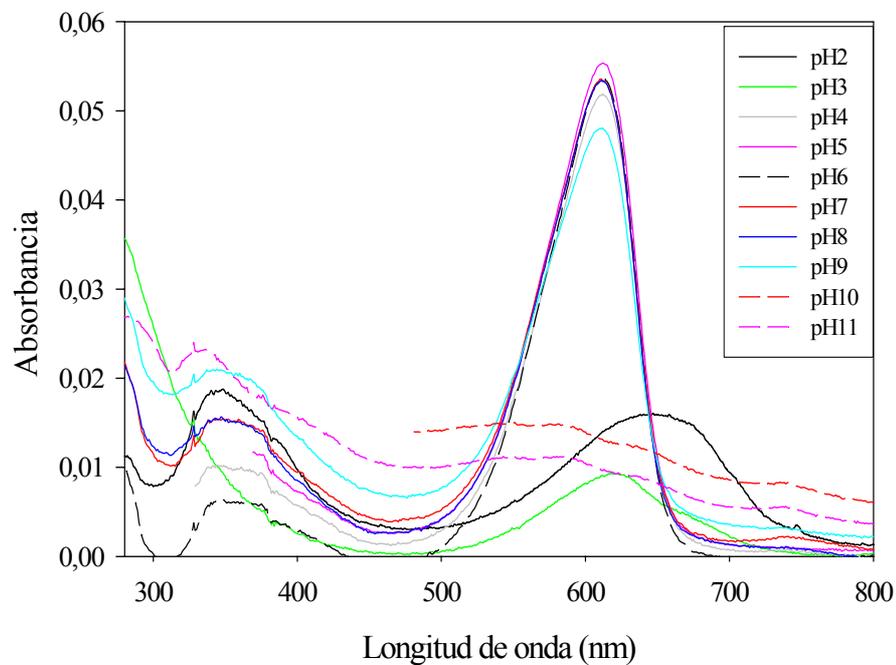


Figura 4.57

Espectros de absorbancia uv-visible de C-PC a diferentes valores de pH del medio. $[C-PC]=8 \cdot 10^{-8}M$.

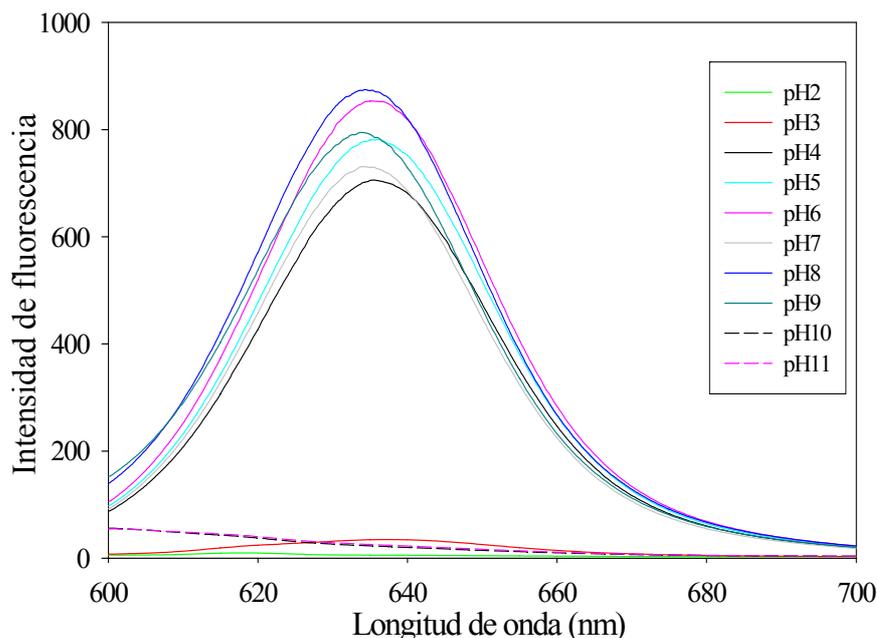


Figura 4.58

Espectros de emisión de fluorescencia de C-PC a diferentes valores de pH del medio

($\lambda_{exc}=560\text{nm}$; $\Delta\lambda_{exc}=\Delta\lambda_{emi}=10\text{nm}$). $[\text{C-PC}]=8\cdot 10^{-8}\text{M}$.

Alofocianina.

Análogamente se han preparado disoluciones de APC y la Figura 4.59 muestra los valores de absorbancia a 652 nm y de intensidad de fluorescencia ($\lambda_{em}=660\text{nm}$) de éstas a los diferentes pH ensayados. En ella puede verse que APC es estable en el rango de pH de 4-8 donde aparecen los mayores valores de absorbancia y de fluorescencia, mientras que para disoluciones fuera de este rango existe una considerable disminución de los parámetros espectroscópicos.

Se registraron los correspondientes espectros de absorbancia y de emisión de fluorescencia (Figuras 4.60 y 4.61), pudiendo apreciarse que en los correspondientes al intervalo de pH de 4-8, los perfiles permanecen prácticamente invariables, lo que denota estabilidad de la proteína en ese rango. Sin embargo, para los demás valores de pH el espectro de absorción presenta diferentes máximos y alturas. Igualmente ocurre en los espectros de fluorescencia, donde mantienen su forma característica en el intervalo de pH de 4- 8, variando el perfil y los máximos de emisión para los valores de pH fuera de ese rango.

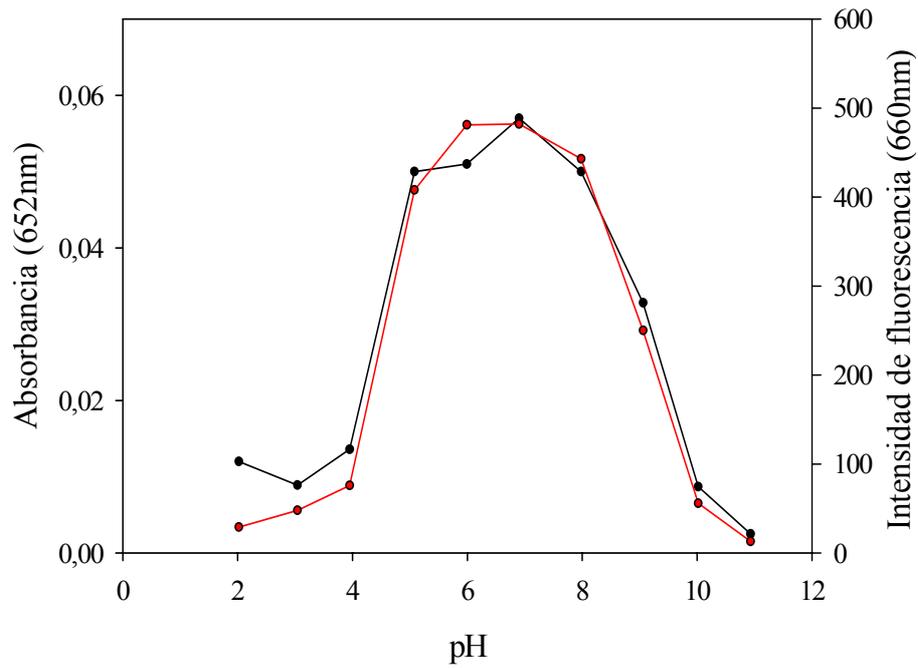


Figura 4.59

Valores de absorbancia (—) e intensidad de fluorescencia (—) ($\lambda_{exc}=590\text{nm}; \Delta\lambda_{exc}=\Delta\lambda_{emi}=10\text{nm}$) de disoluciones de APC en función del pH del medio. $[\text{APC}]=4,8 \cdot 10^{-8}\text{M}$ ($0,005\text{mg/ml}$).

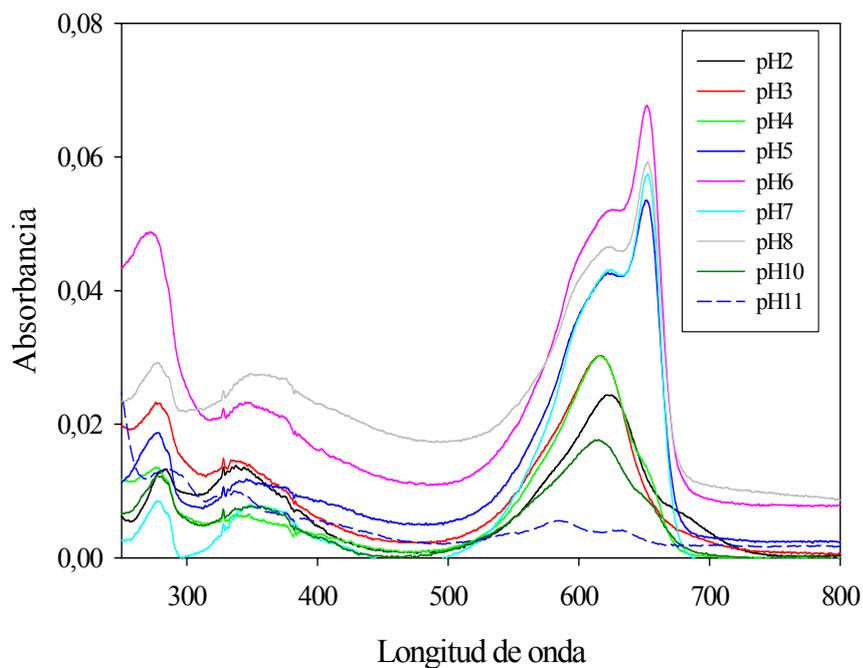


Figura 4.60

Espectros de absorbancia uv-visible de APC a diferentes valores de pH del medio. $[\text{APC}]=4,8 \cdot 10^{-8}\text{M}$.

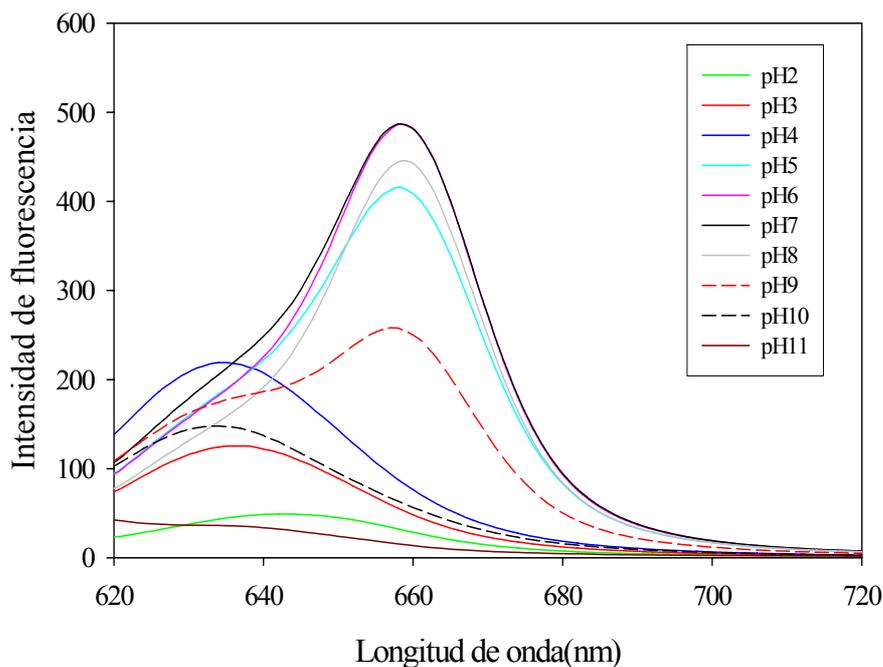


Figura 4.61

Espectros de emisión de fluorescencia de APC a diferentes valores de pH del medio ($\lambda_{\text{exc}}=590\text{nm}$; $\Delta\lambda_{\text{exc}}=\Delta\lambda_{\text{emi}}=10\text{nm}$). $[\text{APC}]=4,8 \cdot 10^{-8}\text{M}$

R-ficocianina.

Al igual que en los casos anteriores, se han preparado disoluciones de R-PC en tampón fosfato 20mM a cada uno de los pH a ensayar y con una concentración de proteína perteneciente a la zona de cumplimiento de las leyes de Beer y Kavanagh. La Figura 4.62 muestra los valores de absorbancia a 618 nm y de intensidad de fluorescencia ($\lambda_{\text{em}}=632\text{nm}$) de las muestras de R-PC a los diferentes pH ensayados. En ella puede apreciarse que R-PC es estable en el rango de pH de 4-9, mientras que para valores fuera de este rango hay una considerable disminución de la misma.

Los espectros de absorbancia y de emisión de fluorescencia (Figuras 4.63 y 4.64) indican que las disoluciones de R-PC preparadas en el intervalo de pH comprendido entre 4-9 poseen propiedades espectroscópicas de absorción y emisión de fluorescencia que no se alteran apreciablemente.

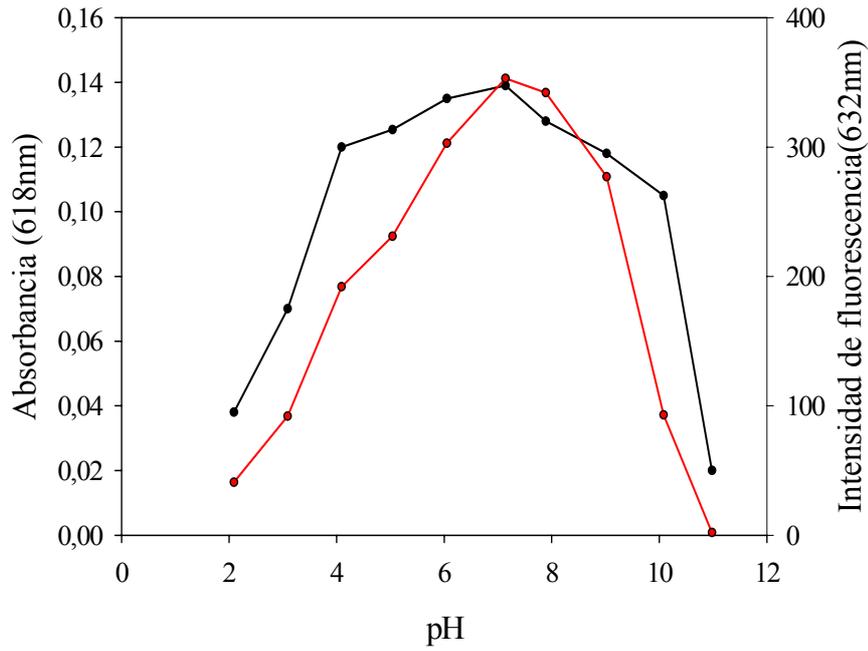


Figura 4.62

Valores de absorbancia (—) e intensidad de fluorescencia (—) ($\lambda_{\text{exc}}=590\text{nm}$; $\Delta\lambda_{\text{exc}}=\Delta\lambda_{\text{emi}}=10\text{nm}$) de disoluciones de R-PC en función del pH del medio. $[\text{R-PC}]=4\cdot 10^{-7}\text{ M}$ (0,046 mg/ml).

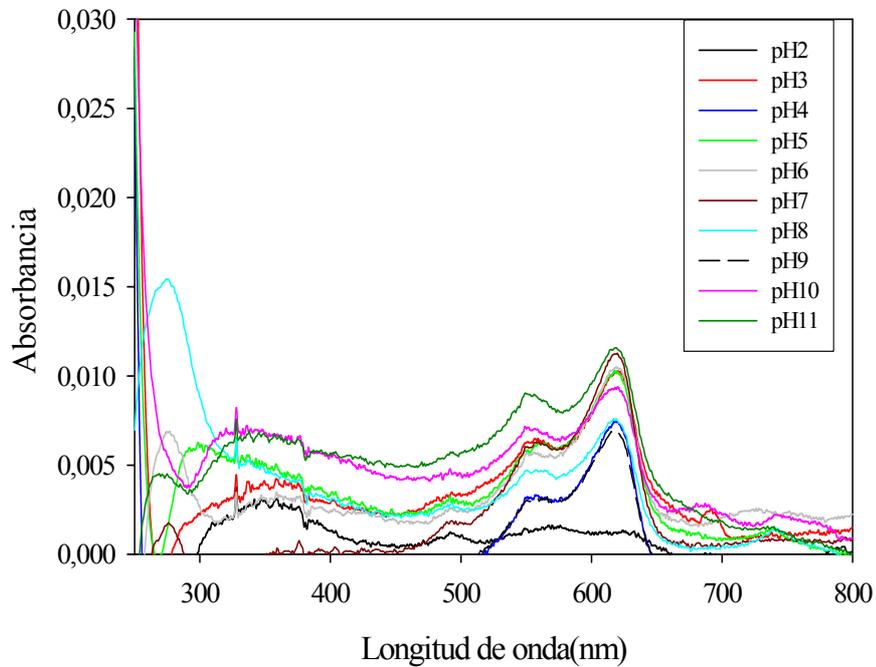


Figura 4.63

Espectros de absorbancia uv-visible de R-PC a diferentes valores de pH del medio. $[\text{R-PC}]=4\cdot 10^{-7}\text{ M}$.

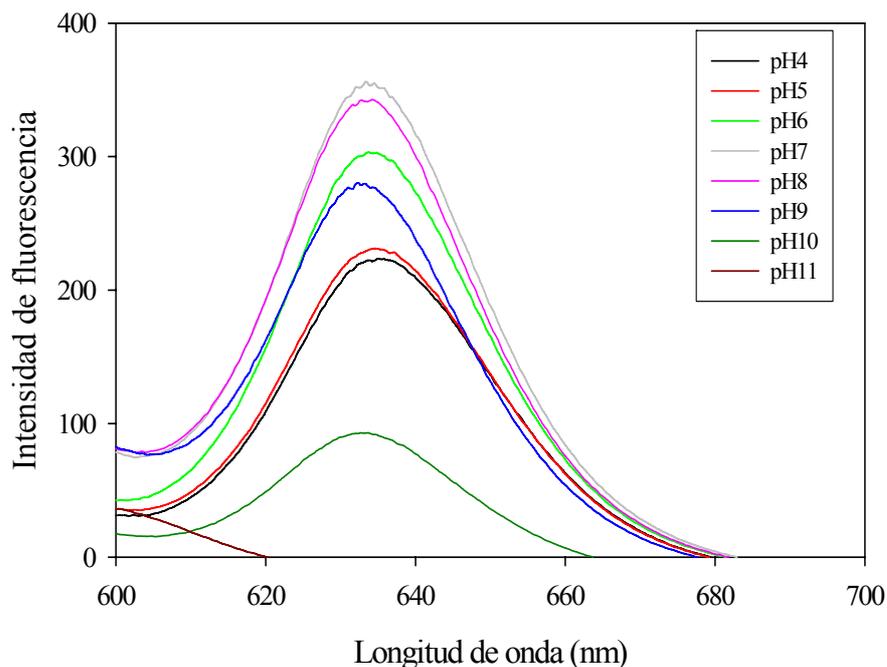


Figura 4.64

Espectros de emisión de fluorescencia de R-PC a diferentes valores de pH del medio. $\lambda_{\text{exc}}=590\text{nm}$; $\Delta\lambda_{\text{exc}}=\Delta\lambda_{\text{emi}}=10\text{nm}$. $[\text{R-PC}]=4\cdot 10^{-7}\text{ M}$.

En términos generales y en lo que a estabilidad en función del pH se refiere, los resultados obtenidos con las tres biliproteínas, denotan que el rango de pH óptimo para ellas es el comprendido entre 4 y 9. En este intervalo, los espectros corresponden a los de las proteínas en un entorno favorable, mientras que fuera de él la relación entre las absorbancias máximas del visible y del ultravioleta deja de ser la usual que presentan las moléculas en medios favorables, e incluso, como ocurre a pH 2 y pH 11, los espectros aparecen totalmente distorsionados mostrando nuevos picos y hombros. De los resultados obtenidos también se desprende que los cambios espectrales en las zonas alcalina y ácida son irreversibles, ya que, después de transcurrir una semana, los valores medidos en los máximos del visible al correspondiente valor de pH, han resultado incluso inferiores a los obtenidos tras inmediata preparación de la disolución.

4.3.1.3.2.-Estabilidad frente a la fuerza iónica.

Otra variable que puede afectar a las macromoléculas biológicas es la concentración de los distintos tipos de iones que existen en las disoluciones, denominada fuerza iónica (FI). Por ello y como ejemplo, se ha estudiado la estabilidad de la C-PC con respecto a la FI de la

disolución. Así, se prepararon disoluciones de C-PC de concentración $8 \cdot 10^{-8} \text{M}$ (0'009 mg/ml) en tampón fosfato pH 7, para cada una de las fuerzas iónicas a ensayar: 1000, 800, 600, 400, 200, 100 y 50mM.

La Figura 4.65 muestra los valores de absorbancia a 615 nm y de intensidad de fluorescencia a 634 nm, de las muestras de C-PC a los diferentes valores de FI ensayados. En ella puede observarse que C-PC es bastante estable en todo el rango de FI ensayado, presentando valores ligeramente superiores de absorbancia y de fluorescencia para los valores más bajos de fuerza iónica y siendo máximos sus valores en disoluciones de FI correspondiente a 50mM.

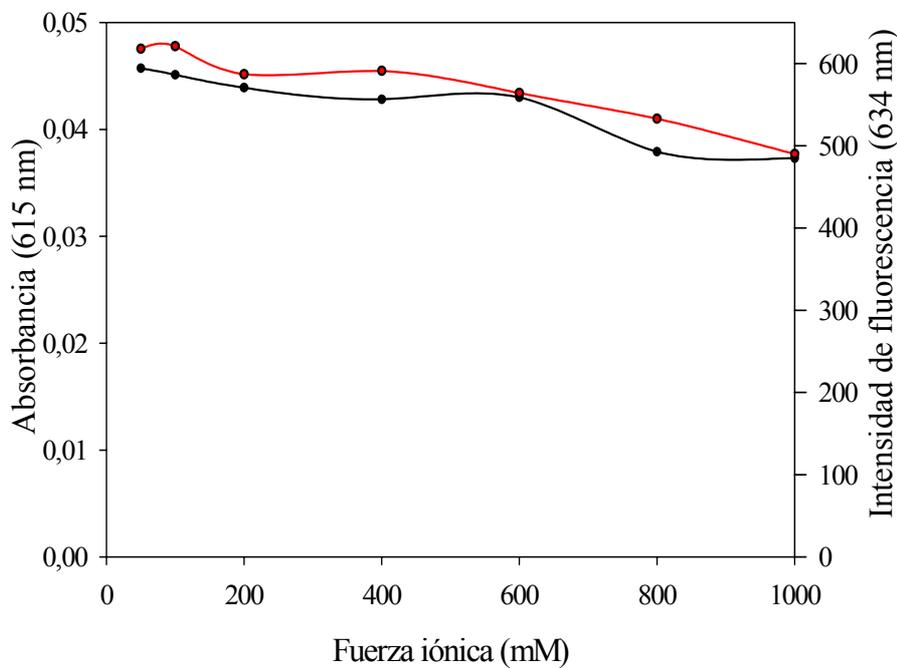


Figura 4.65

Valores de absorbancia (—) e intensidad de fluorescencia (—)($\Delta\lambda_{\text{exc}}=\Delta\lambda_{\text{emi}}=10\text{nm}$) de disoluciones de C-PC en función de la fuerza iónica del medio.

Los correspondientes espectros de absorbancia y de emisión de fluorescencia, se muestran en las Figuras 4.66 y 4.67, donde puede verse que éstos mantienen prácticamente invariable el perfil, variando ligeramente el valor de absorbancia y de fluorescencia en el máximo como se comentó anteriormente. Puede concluirse que aunque la FI no afecte fuertemente a las propiedades espectroscópicas, es conveniente, en la medida que sea posible, trabajar con disoluciones de biliproteína con baja FI.

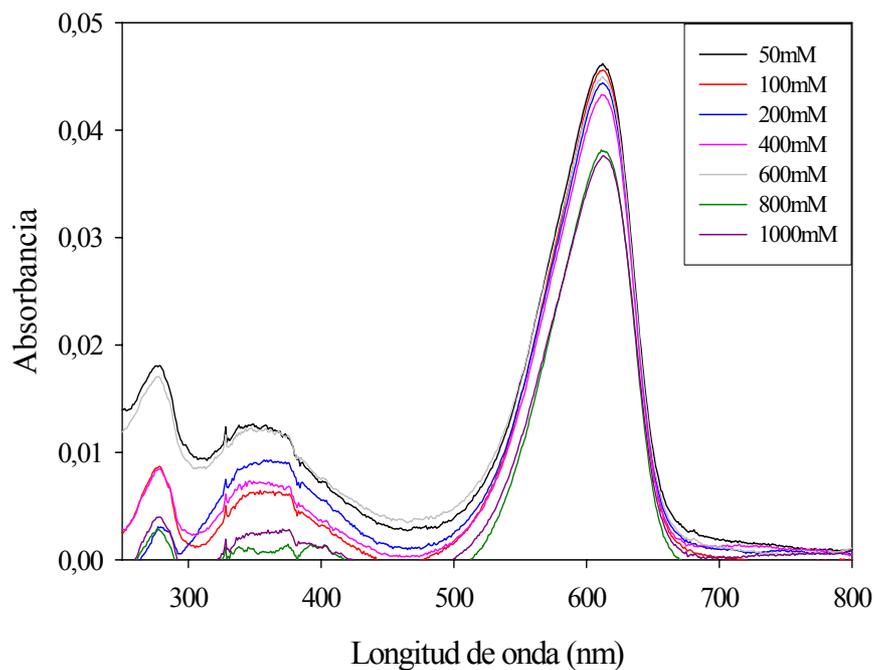


Figura 4.66

Espectros de absorbancia uv-visible de C-PC a diferentes valores de fuerza iónica del medio. $[C-PC]= 8 \cdot 10^{-8}M$.

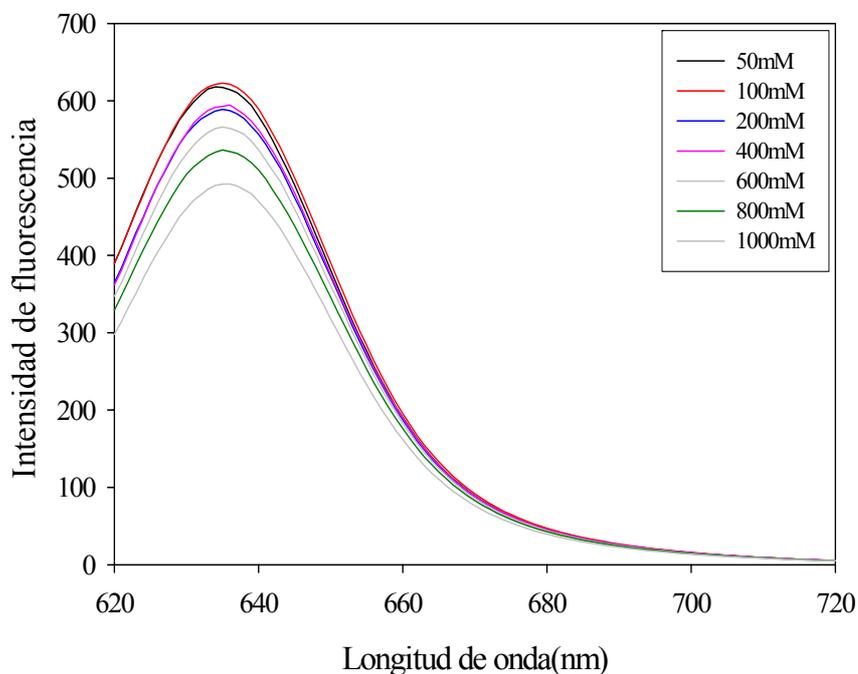


Figura 4.67

Espectros de emisión de fluorescencia de C-PC a diferentes valores de fuerza iónica del medio ($\lambda_{ex}= 590nm$; $\Delta\lambda_{ex}=\Delta\lambda_{em}=10$). $[C-PC]= 8 \cdot 10^{-8}M$.

4.3.1.3.3.- Estabilidad frente al tiempo.

Otra variable importante a tener en cuenta es el tiempo. Así, se han preparado disoluciones en tampón fosfato pH 7 (20mM) de las distintas ficocianinas purificadas y a éstas se les han realizado espectros de fluorescencia cada 24 horas, volviendo tras su medida a guardarlas a 4°C y en oscuridad, hasta completar un periodo de tiempo igual a un mes. La Figura 4.68 muestra el % de disminución de la fluorescencia a medida que avanzan los días para las tres biliproteínas. Como refleja la figura, R-PC pierde buena parte de sus propiedades a partir de las dos semanas, mientras que C-PC y APC parecen más estables manteniendo más del 50% de sus propiedades transcurrido el primer mes tras su preparación.

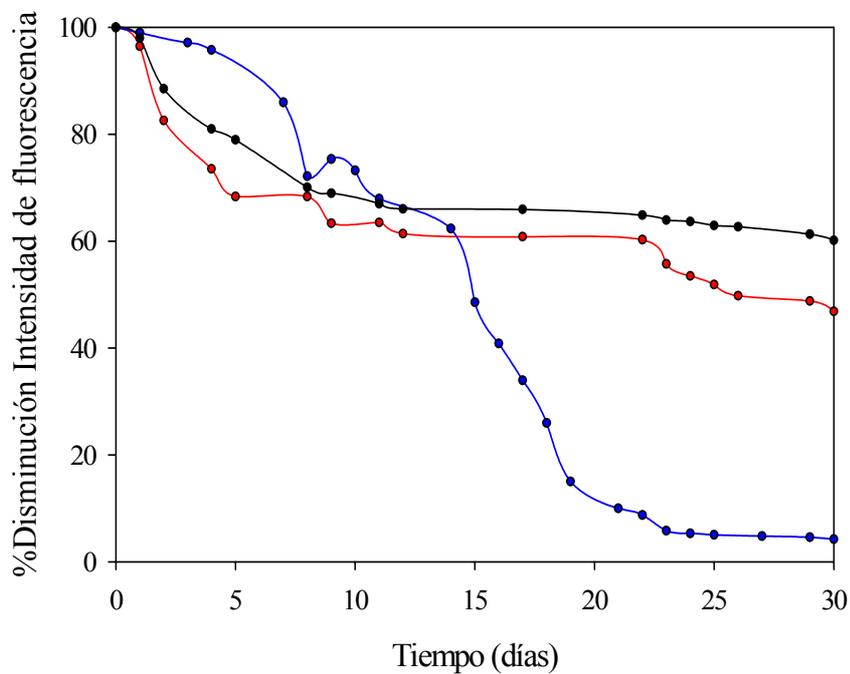


Figura 4.68

Medida de la estabilidad de las ficocianinas a través de fluorescencia.

C-PC (—, IF₆₃₄), APC (—, IF₆₆₀) y R-PC (—, IF₆₃₂).

[C-PC]= $8 \cdot 10^{-8}$ M, [APC]= $2,7 \cdot 10^{-8}$ M, [R-PC]= $8 \cdot 10^{-8}$ M.

4.3.1.4.- **Caracterización estructural mediante espectroscopía.**

Es bien conocido que en el intervalo de pH 5-8 y a bajos valores de fuerza iónica, las ficocianinas muestran un estado de agregación trimérico del tipo $(\alpha\beta)_3$ (Glazer, 1999). También se conoce que la acción de sales caotrópicas tales como el perclorato o tiocianato sódico a altas concentraciones (cerca de 1M), produce la disociación de biliproteínas desde estados de agregación altos (hexámeros, trímeros, etc) a disoluciones homogéneas de monómeros, debido a su capacidad de desorganizar la estructura acuosa, pero sin llegar a producir la disociación de monómeros a sus subunidades (MacColl y col., 1980). Ejemplos de este tipo de comportamiento lo constituyen C-ficocianina y aloficocianina.

Con objeto de conocer los cambios en las propiedades espectroscópicas provocados por los diferentes estados de agregación, se han estudiado las diferentes biliproteínas disueltas en presencia de agentes desagregantes como los anteriormente comentados. Así las ficocianinas purificadas, se han caracterizado mediante absorbancia y fluorescencia (estado estacionario y polarización de fluorescencia) tanto en su estado nativo trimérico, como en el estado monomérico provocado por la adición de perclorato sódico (1M).

C-ficocianina.

La Figura 4.69 muestra los espectros de absorbancia y de fluorescencia en estado estacionario, para una muestra de C-PC purificada procedente de *Anabaena marina* (en fosfato pH 7, 20mM) y de esa misma muestra a la que se le ha añadido perclorato sódico (1M). En ella puede verse como el espectro de absorbancia varía considerablemente al pasar la proteína de forma trimérica a monomérica, descendiendo considerablemente el valor en el máximo de absorción y apareciendo un nuevo pico a 487 nm con aproximadamente igual valor de absorbancia que el máximo correspondiente a 615 nm. En el caso de la fluorescencia, el máximo de emisión se desplaza un poco hacia el rojo para la forma monomérica (de 631 a 635 nm).

La Imagen 4.14 muestra la estructura tridimensional de C-PC en estado de agregación trimérico.

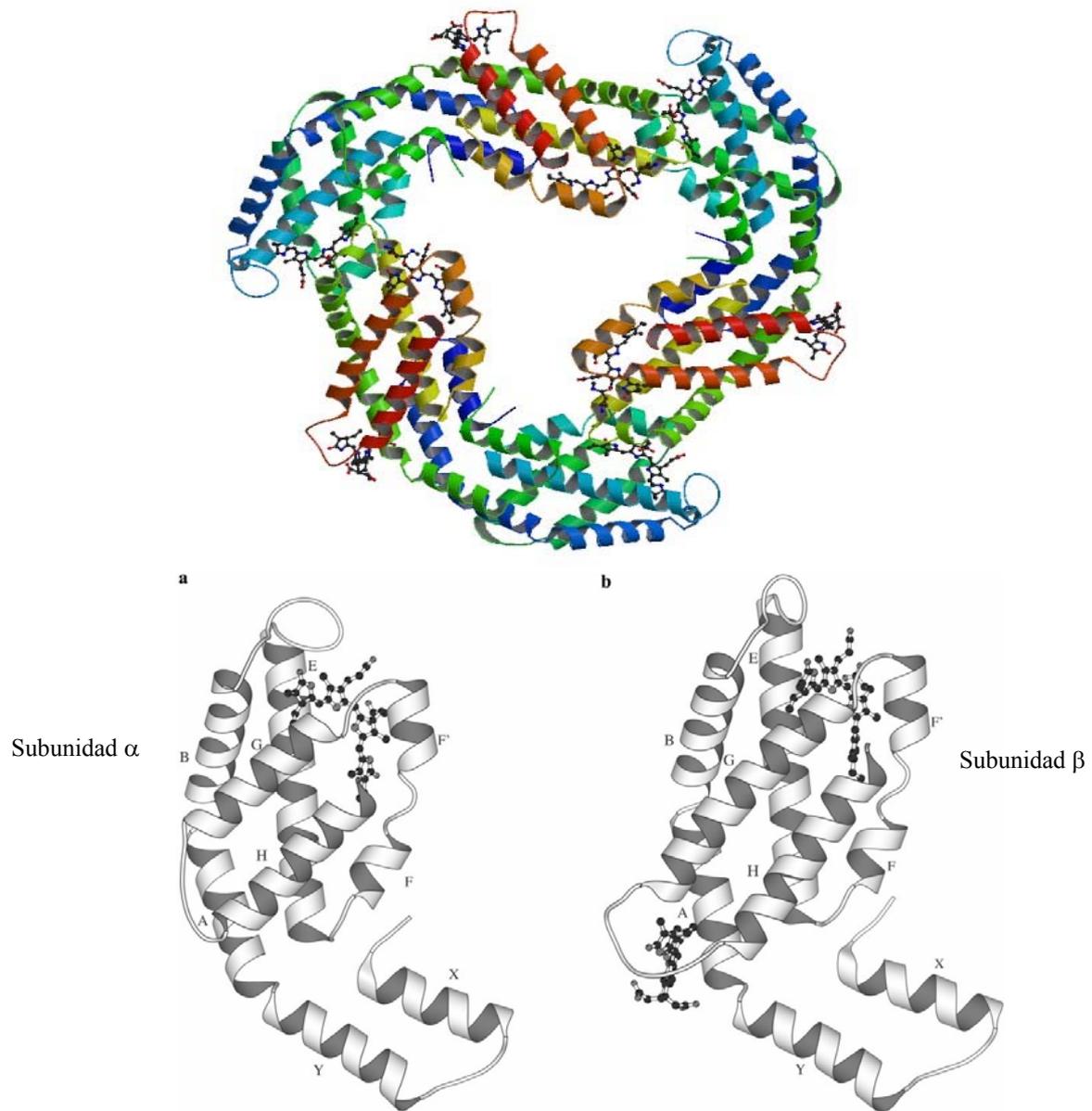


Imagen 4.14

Estructura tridimensional de C-PC en estado de agregación trimérico y estructura de las subunidades (Padyana y col., 2001; David y col., 2011).

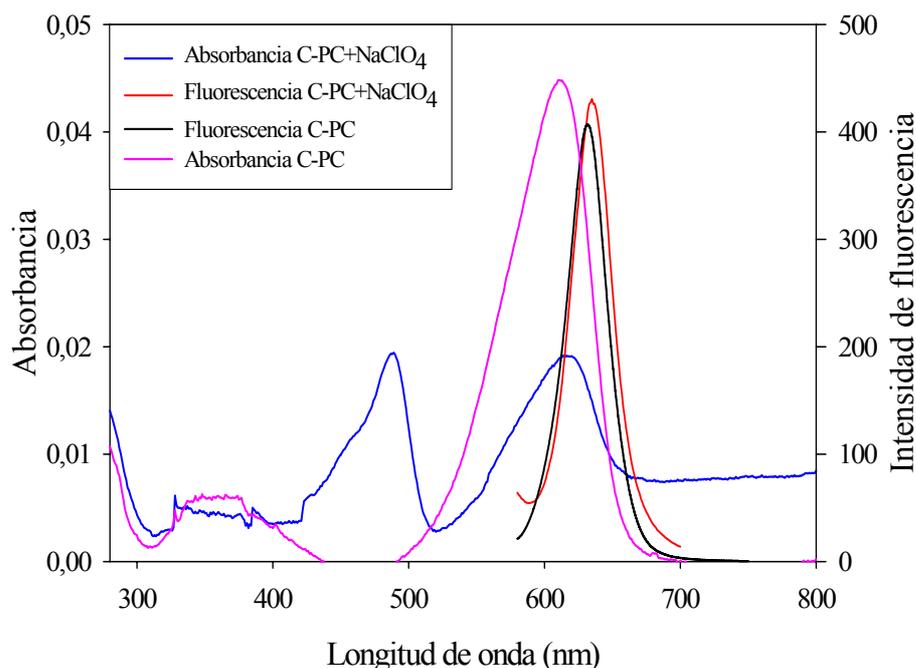


Figura 4.69

Espectros de absorción y de emisión de fluorescencia en estado estacionario de C-PC purificada de *Anabaena marina* en estado trimérico y monomérico.

La Figura 4.70 muestra los valores de anisotropía de fluorescencia para una muestra de C-PC purificada procedente de *Anabaena marina* y de esa misma muestra a la que se le ha añadido perclorato sódico (1M). Es importante resaltar que los espectros de fluorescencia de las biliproteínas están modulados por transferencia resonante de la energía por fluorescencia (FRET), entre los numerosos cromóforos que las biliproteínas tienen en sus diferentes subunidades (Dale y Teale, 1970). Por lo tanto, cuando el estado de agregación de las biliproteínas cambia de forma trimérica a disolución de monómeros, la transferencia de energía disminuye y se debe observar un dramático incremento en el espectro de anisotropía de fluorescencia, tal como ha sido señalado para C-PC procedente de *Mastidoglastrus laminosus* (Mimuro y col., 1986; Yeh y col., 1986) y C-PC procedente de *Spirulina platensis* (Bermejo y col., 1997). En este sentido, en la Figura 4.68 se puede apreciar un incremento considerable de los valores de polarización de fluorescencia al adicionar perclorato sódico, lo que confirma la desagregación de trímeros a monómeros que sufre C-PC.

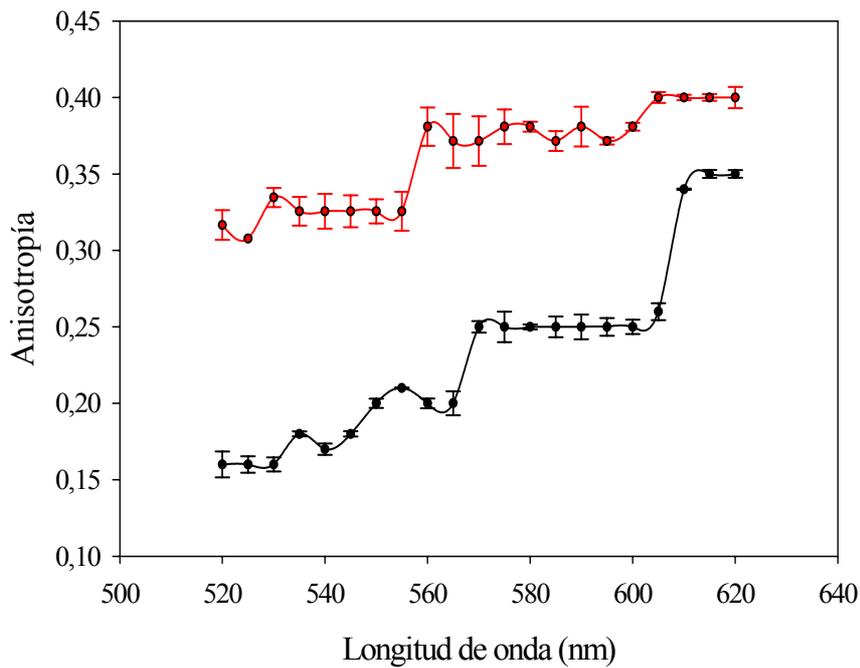


Figura 4.70

Anisotropía de fluorescencia de C-PC purificada de *Anabaena marina* en sus estados trimérico

(—, $\lambda_{em}=634$ nm) y monomérico (—, $\lambda_{em}=634$ nm). [C-PC]= 10^{-8} M.

Los valores de anisotropía de fluorescencia son la media de tres determinaciones y las barras de error reflejadas corresponden a la desviación estándar de las mismas.

Aloficocianina.

Analogamente, la Figura 4.71 muestra los valores de absorbancia para una muestra de APC purificada procedente de *Spirulina platensis* (en fosfato pH 7, 20mM) y de esa misma muestra a la que se le ha añadido perclorato sódico (1M). El espectro de absorción uv-visible de la proteína nativa presenta un máximo característico a 650 nm que se desplaza a 615nm para la forma monomérica, lo cual coincide con lo estudiado por Yeh y col., (1986) para la aloficocianina procedente de *Anabaena variabilis* y por Berns y MacColl (1989) para la aloficocianina de *P.Luridum* y que puede ser explicado según estos últimos autores por dos fenómenos: la deslocalización entre pares de bilinas fuertemente acopladas en la forma trimérica y por las diferencias conformacionales entre las bilinas en el monómero y en el trímero.

El espectro de emisión de fluorescencia de la proteína en su estado nativo presenta una sola banda con un máximo de emisión a 660 nm. En el espectro correspondiente a la forma monomérica, el máximo de emisión se desplaza hacia el azul (636nm) como era de esperar según Cohen- Bazire y col., (1977).

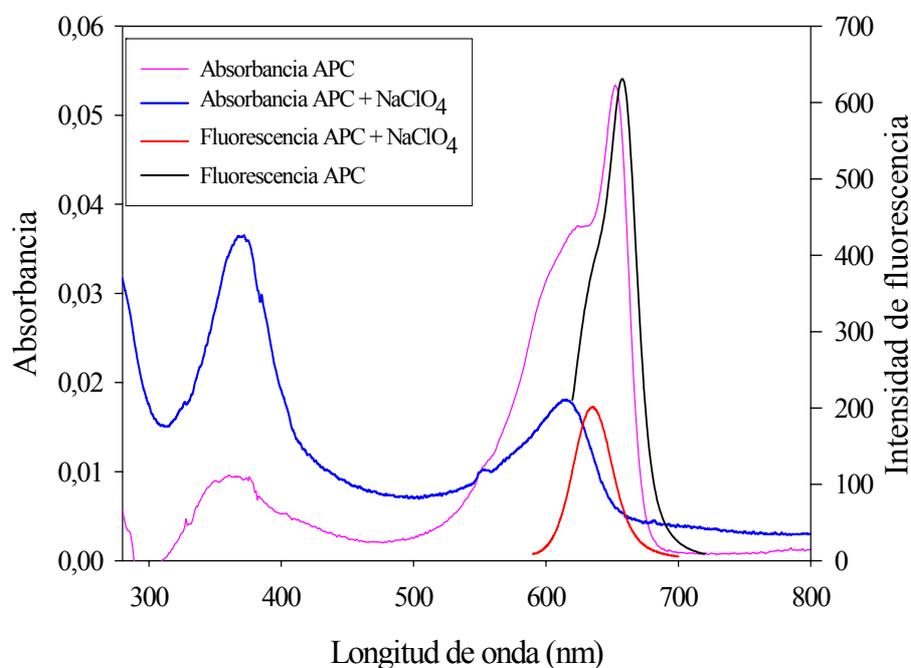


Figura 4.71

Espectros de absorción y emisión de fluorescencia en estado estacionario de APC purificada de *Spirulina platensis* en estado trimérico y monomérico.

La Imagen 4.15 muestra la estructura tridimensional de APC en estado de agregación trimérico.

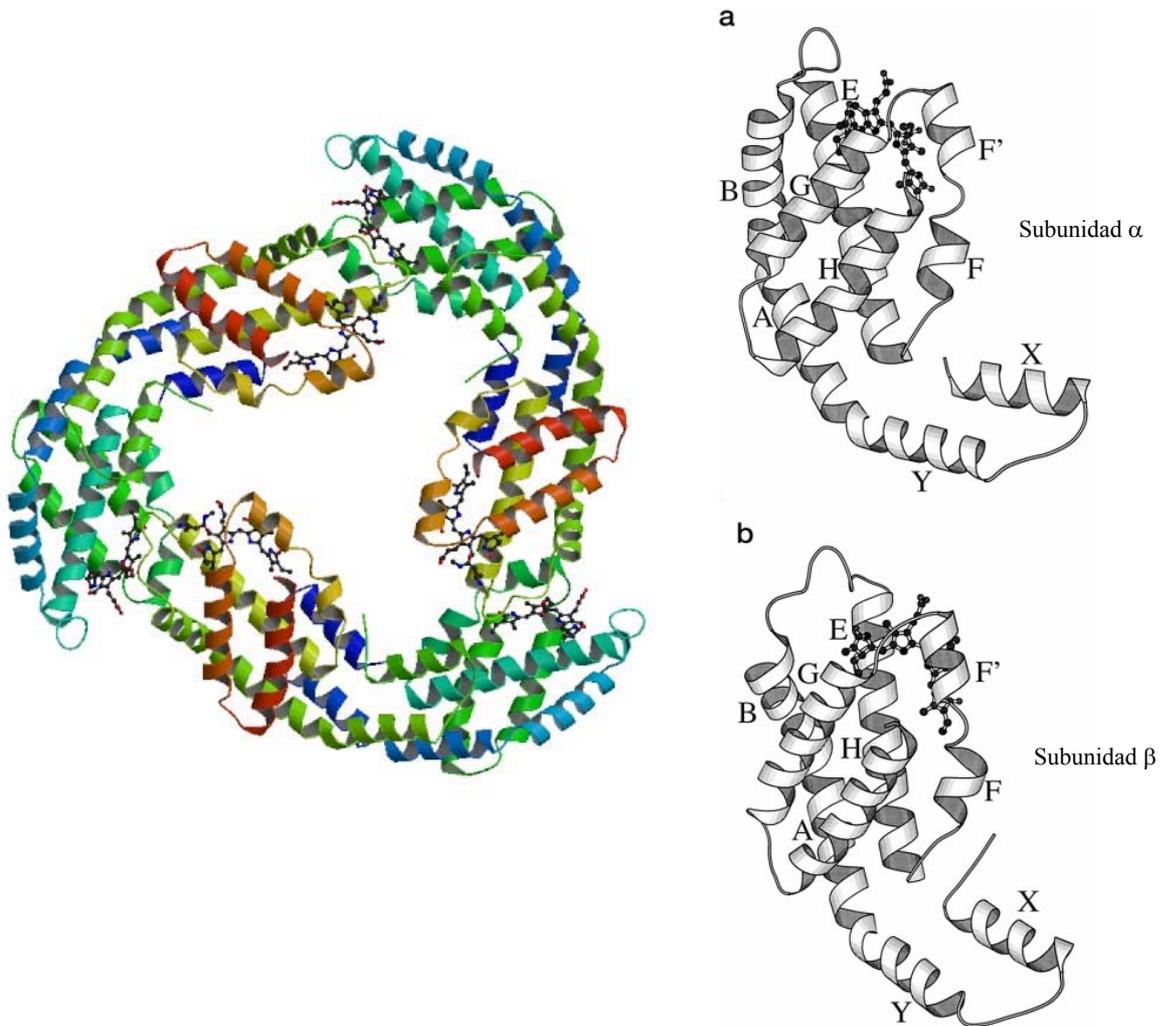


Imagen 4.15

Estructura tridimensional de APC en estado de agregación trimérico y estructura de las subunidades (Brejc y col., 1995)

La Figura 4.72 muestra los valores de anisotropía de fluorescencia para una muestra de APC purificada procedente de *Spirulina platensis* y de esa misma muestra a la que se le ha añadido perclorato sódico (1M). Los valores de polarización de fluorescencia obtenidos confirman que al adicionar perclorato sódico a APC, ésta se desagrega en sus monómeros, ya que como se ha comentado anteriormente, la desagregación de trímero a monómero provoca un crecimiento en la anisotropía de fluorescencia.

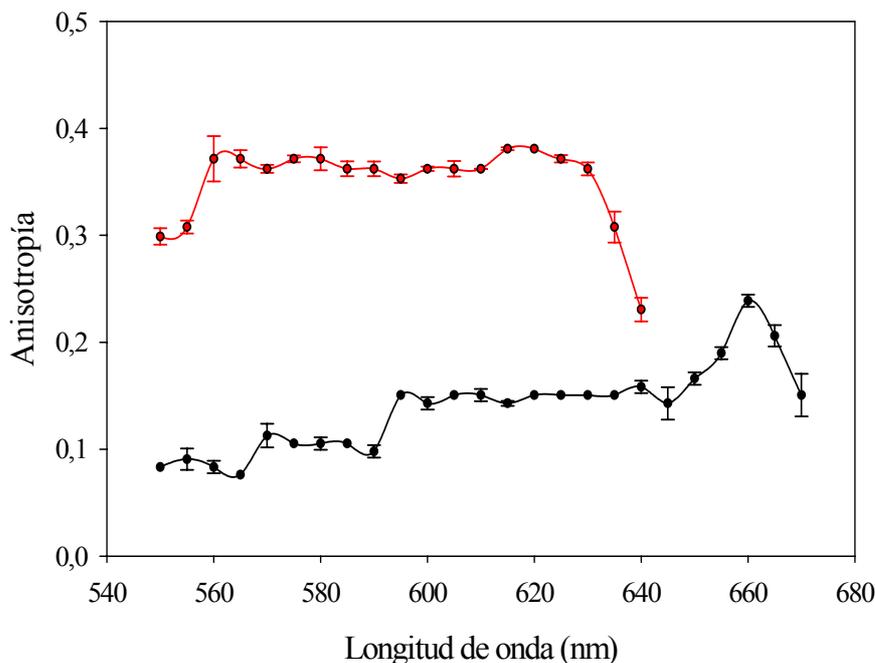


Figura 4.72

Anisotropía de fluorescencia de APC purificada de *Spirulina platensis* en sus estados trimérico (—, λ_{em} =660 y 680 nm) y monomérico (—, λ_{em} = 635 y 645nm). [APC]= $4 \cdot 10^{-8}$ mg/ml.

Los valores de anisotropía de fluorescencia son la media de tres determinaciones y las barras de error reflejadas corresponden a la desviación estándar de las mismas.

R-ficocianina.

Finalmente, la Figura 4.73 muestra los valores de absorbancia para una muestra de R-PC purificada procedente de *Porphyridium cruentum* (en fosfato pH 7, 20mM) y de esa misma muestra a la que se le ha añadido perclorato sódico. El espectro de absorción uv-visible de R-PC en su forma nativa trimérica presenta máximos a 556, 492, 360 y 280 nm y un máximo característico a 618 nm para R-PC, que se suavizan al pasar a la forma monomérica, donde los máximos a 556 y 360 nm se convierten en hombros. El espectro de emisión de fluorescencia de R-PC en su estado trimérico presenta una sola banda con un máximo de emisión a 632 nm, desplazándose hacia el rojo (635nm) para el caso de la forma monomérica, lo que coincide en comportamiento con lo sucedido para el caso de C-PC y difiere con lo obtenido con APC donde el desplazamiento era hacia el azul.

La Imagen 4.16 muestra la estructura tridimensional de R-PC en estado de agregación trimérico.

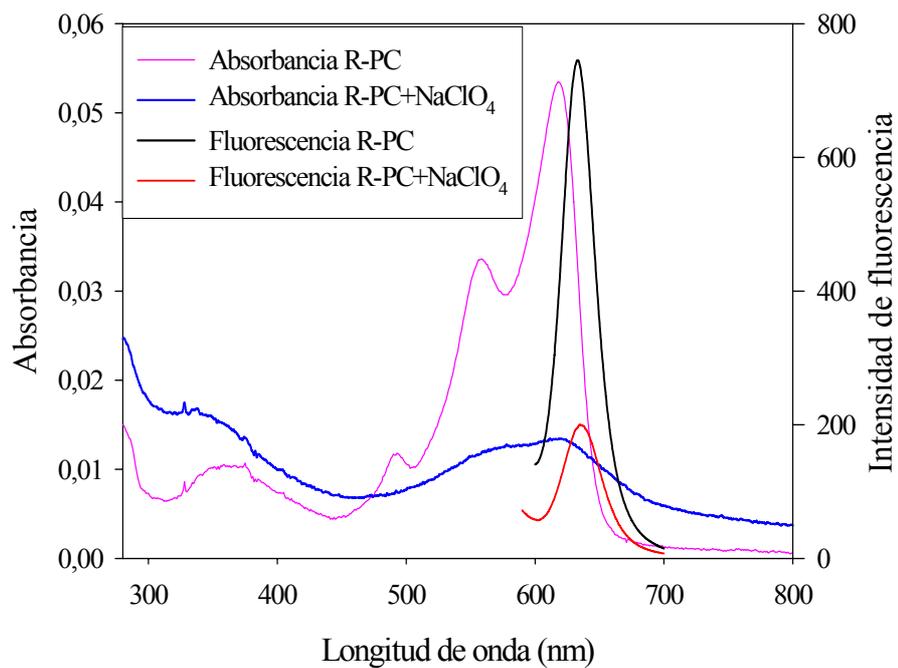


Figura 4.73

Espectros de absorbancia y de emisión de fluorescencia en estado estacionario de R-PC purificada de *Porphyridium cruentum* en estado trimérico y monomérico.

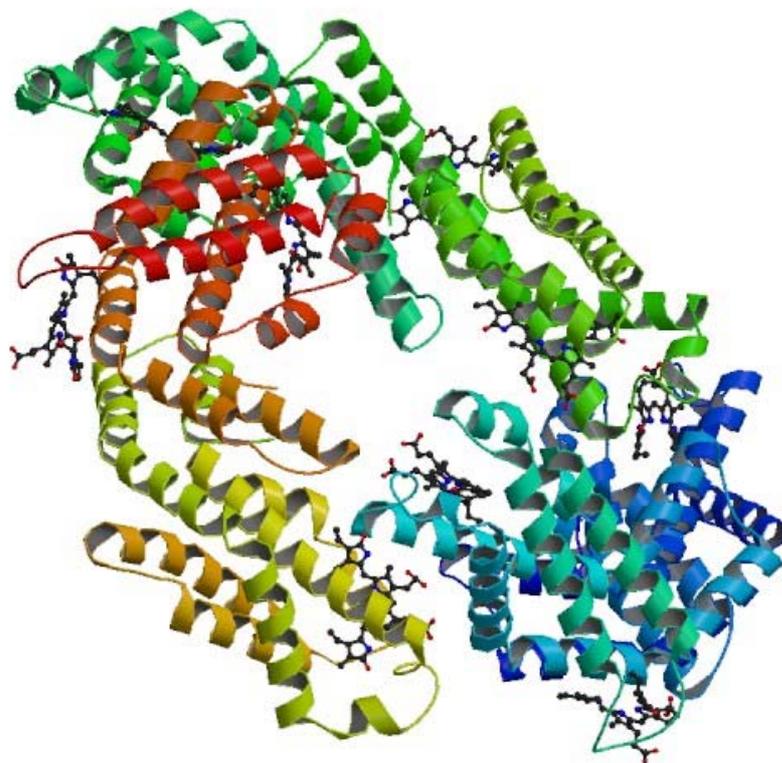


Imagen 4.16

Estructura tridimensional de R-PC en estado de agregación trimérico (Jiang y col., 2001).

La Figura 4.74 muestra los valores de anisotropía de fluorescencia para una muestra de R-PC purificada procedente de *Porphyridium cruentum* y de esa misma muestra a la que se le ha añadido perclorato sódico (1M). Los valores de anisotropía de fluorescencia confirman que al adicionar perclorato sódico a la R-PC, ésta se desagrega en sus monómeros ya que al igual que ocurría con C-PC y APC, la desagregación de trímero a monómero provoca un aumento considerable en la polarización de fluorescencia.

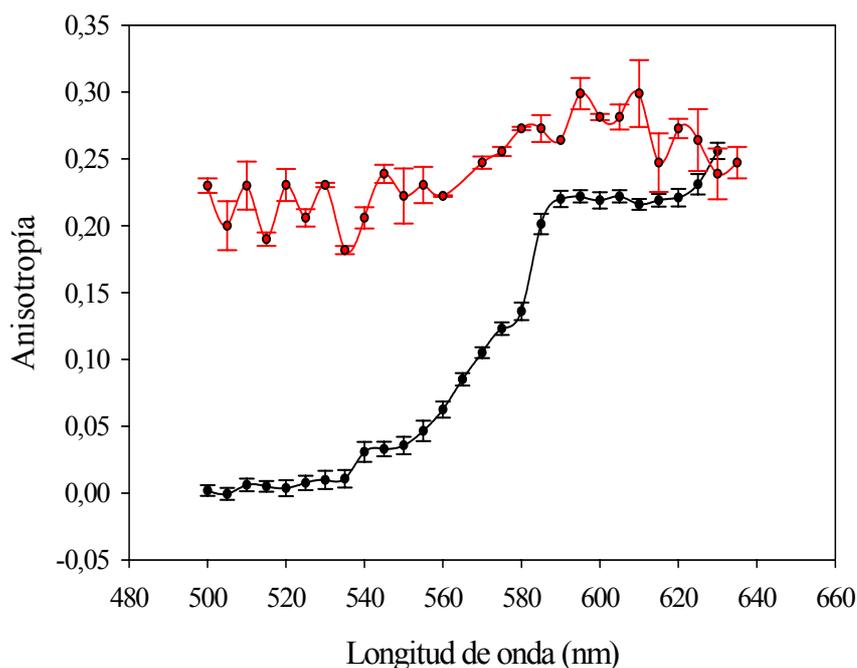


Figura 4.74

Anisotropía de fluorescencia de R-PC purificada de *Porphyridium cruentum* en sus estados trimérico (—, $\lambda_{em}= 640nm$) y monomérico (—, $\lambda_{ex}= 635 nm$). $[R-PC]= 10^{-7}$ mg/ml. Los valores de anisotropía de fluorescencia son la media de tres determinaciones y las barras de error reflejadas corresponden a la desviación estándar de las mismas.

4.3.2.- CARACTERIZACIÓN DE LAS SUBUNIDADES.

Debido a la disponibilidad de muestra, se ha utilizado C-PC pura procedente de *Anabaena marina* para la obtención y caracterización de sus correspondientes subunidades α y β .

4.3.2.1.- Obtención mediante HPLC.

Se ha utilizado cromatografía HPLC para la separación de las subunidades de C-PC purificada. Así, inicialmente se han ensayado las condiciones de separación en columna de tipo analítico para una vez optimizada la misma, pasar a utilizar columna de tipo semipreparativo. De esta forma, se han ensayado diferentes gradientes con diferentes tipos de pendientes hasta encontrar el óptimo, que se describe en el apartado 3.2.7 de Métodos. Es bien conocido que la propia composición de la fase móvil produce la desnaturalización de las biliproteínas separando la estructura y generando las correspondientes subunidades (Swanson y Glazer, 1990).

Una vez puesto a punto el método para columna pequeña, se ha desarrollado una metodología similar en columna semipreparativa (250 · 10 mm), con el objetivo de obtener las subunidades correspondientes para su posterior estudio espectroscópico. Los picos correspondientes a las subunidades α y β aparecen a 12'5 y 14'6 minutos respectivamente (Figura 4.75).

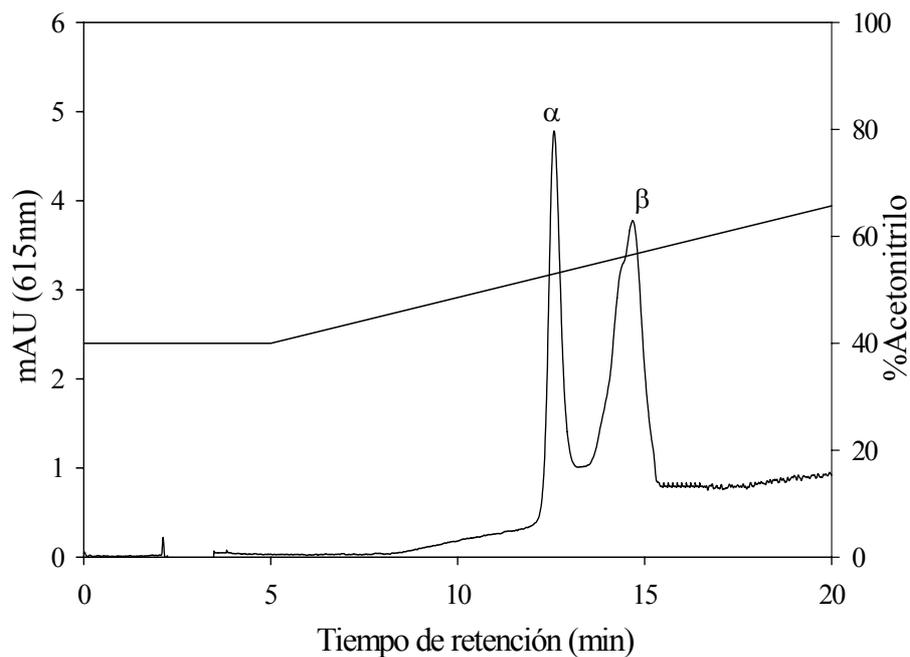


Figura 4.75

Separación semipreparativa de subunidades de C-PC purificada de *Anabaena marina* mediante HPLC utilizando una columna de fase reversa C4 (250 · 10 mm).

La Imagen 4.17 muestra el detalle de los viales conteniendo las subunidades α y β de C-PC obtenidas mediante HPLC semipreparativa y tras el correspondiente proceso de liofilización para eliminación del disolvente.

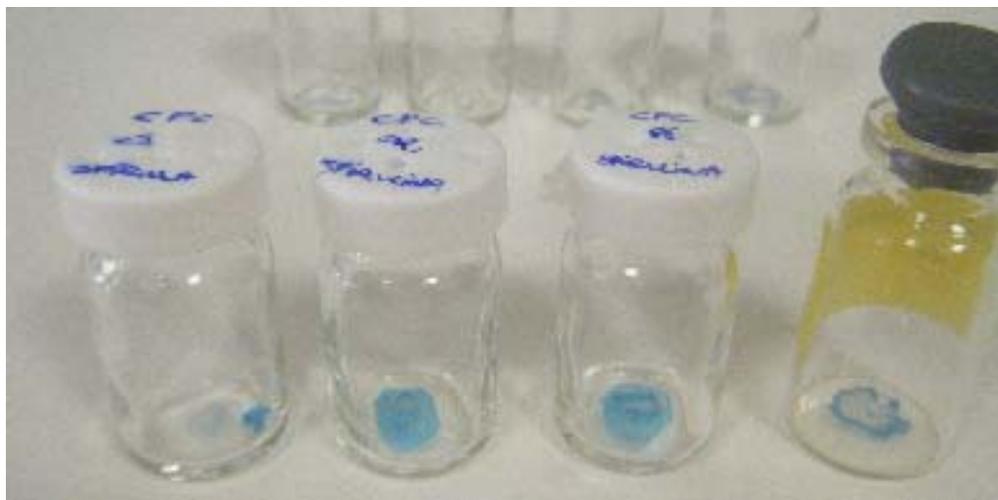


Imagen 4.17

Subunidades α y β de C-PC obtenidas mediante HPLC semipreparativa y tras proceso de liofilización.

4.3.2.2.- Caracterización de subunidades.

Una vez obtenidas las subunidades α y β de C-PC (procedente de *Anabaena marina*), se han caracterizado tanto en el medio de separación (mezcla de acetonitrilo y agua), como solubilizadas en medio acuoso (tampón fosfato pH7, 20mM) tras la correspondiente liofilización.

4.3.2.2.1.- Caracterización en medio de separación.

Las siguientes Figuras (4.76 y 4.77) muestran los espectros de absorción y fluorescencia de las subunidades α y β de C-PC procedente de *Anabaena marina* purificadas mediante HPLC, en medio acetonitrilo:agua. Debido a la desnaturalización que produce la fase móvil con el TFA añadido, los efectos locales del ambiente que rodean a los distintos cromóforos desaparecen y bajo estas condiciones, el perfil espectral de las subunidades α y β es prácticamente el mismo, mostrando máximos de absorción a 278, 346 y 637 nm. Respecto a la fluorescencia, la subunidad α presenta el máximo a 636 nm, mientras que el máximo del espectro de fluorescencia de la subunidad β se encuentra en 642 nm.

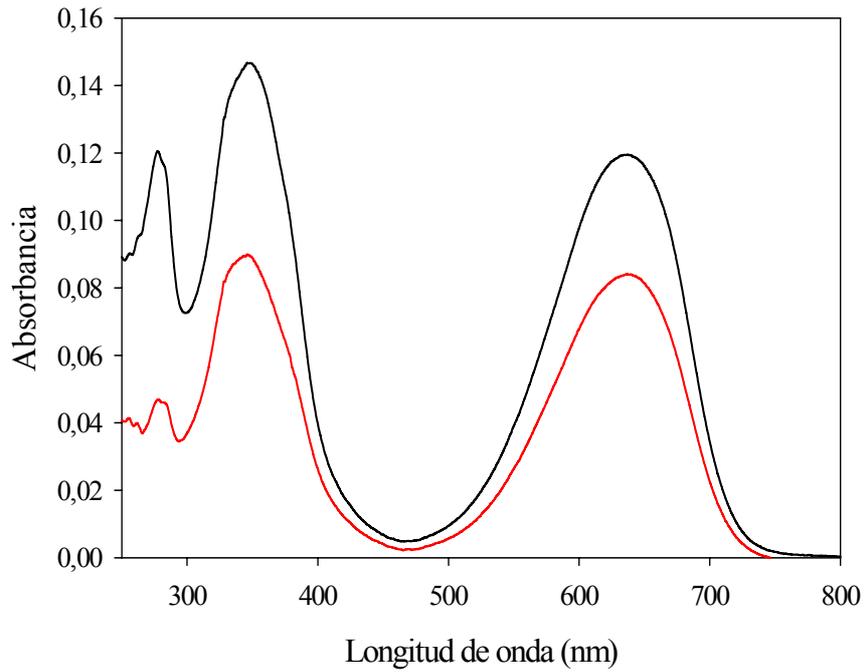


Figura 4.76

Espectro de absorción uv-visible de las subunidades α (—) y β (—) de C-PC procedente de *Anabaena marina* en medio acetonitrilo:agua

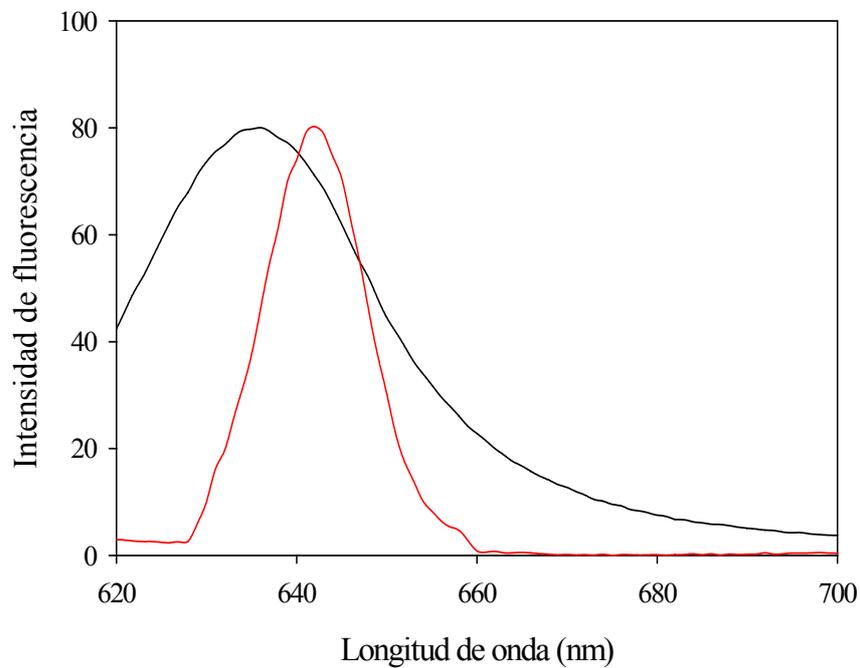


Figura 4.77

Espectro de emisión de fluorescencia en estado estacionario de las subunidades α (—) y β (—) de C-PC procedente de *Anabaena marina* en medio acetonitrilo:agua.

($\lambda_{exc}=580$; $\Delta\lambda_{exc}=10$; $\Delta\lambda_{exc}=10$).

4.3.2.2.2.- Caracterización en medio acuoso.

Las Figuras 4.78 y 4.79 muestran los espectros de absorbancia y de fluorescencia de las subunidades α y β de C-PC procedente de *Anabaena marina* purificadas mediante HPLC, liofilizadas y redisueltas en tampón fosfato pH7, 20mM. La subunidad α tiene el máximo de absorción a 621 nm mientras que el máximo de absorción de la subunidad β se encuentra en 604 nm. En el caso de la fluorescencia en medio acuoso, los máximos de los espectros de cada subunidad se encuentran en 635 nm para la subunidad α y en 630 nm para la subunidad β .

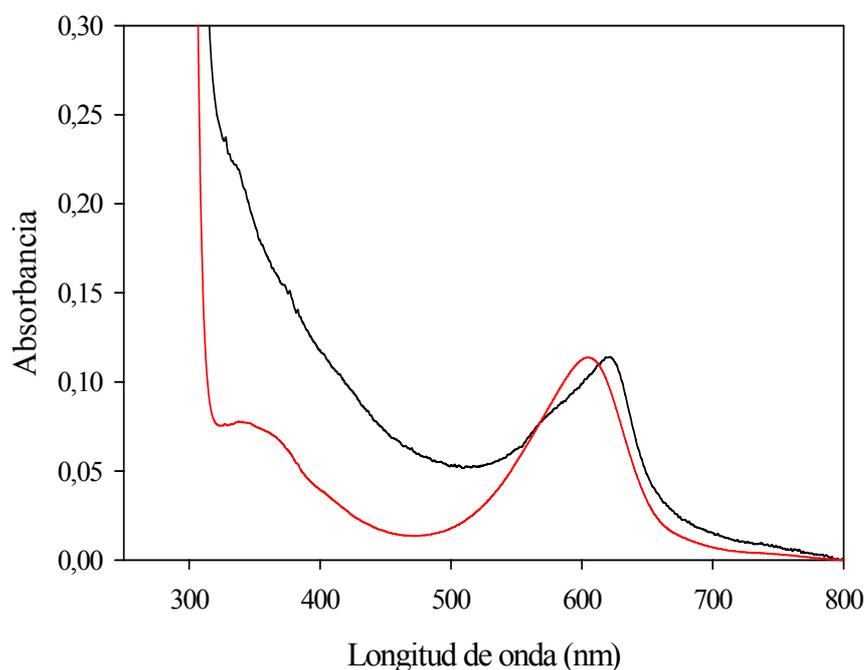


Figura 4.78

Espectro de absorción uv-visible de las subunidades α (—) y β (—) de C-PC procedente de *Anabaena marina* en medio tampón fosfato pH 7, 20mM.

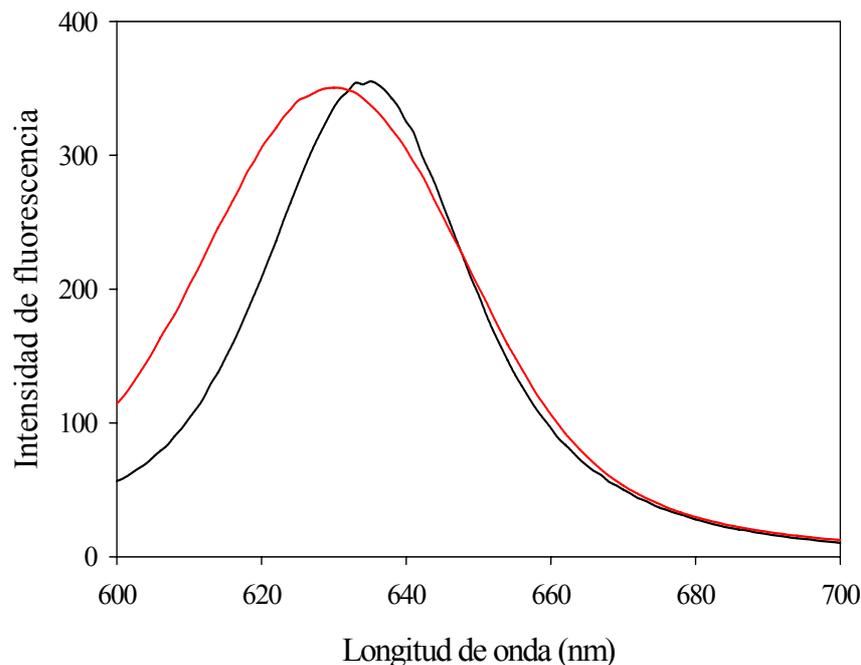


Figura 4.79

Espectro de emisión de fluorescencia en estado estacionario de las subunidades α (—) y β (—) de C-PC procedente de *Anabaena marina* en tampón fosfato pH 7 20mM.

($\lambda_{exc}=580$; $\Delta\lambda_{exc}=5$; $\Delta\lambda_{exc}=5$).

4.4.- APLICACIONES DE LAS BILIPROTEINAS COMO COLORANTES NATURALES.

4.4.1.- ENSAYOS DE SOLUBILIZACIÓN EN MEDIOS HIDROCARBONADOS.

Las biliproteínas son macromoléculas hidrosolubles. No obstante, la potencial utilidad de éstas como colorantes naturales en alimentación y cosmética, puede requerir su solubilización en medios hidrofóbicos, por lo que se ha procedido a la solubilización y caracterización espectroscópica de ficocianinas en microemulsiones constituidas por AOT/agua/isooctano.

En este sentido, existe un gran interés en estudios de proteínas en asociación con distintos modelos de interfaces, tales como vesículas lipídicas, micelas y micelas reversas. De estos modelos constituidos por sistemas microheterogéneos, las micelas reversas ofrecen la mayor flexibilidad de manipulación del estado del agua interfacial. Las propiedades físicas y químicas de estos sistemas varían extensamente con la relación molar agua/tensioactivo, w_0

(Luisi y Magid, 1986; Waks, 1986). Así, se han estudiado usando la mayoría de los métodos espectroscópicos, un buen número de macromoléculas disueltas en el interior acuoso de microemulsiones del tipo micelas reversas, en distintos estados de hidratación, siguiendo su comportamiento como una función del parámetro w_0 . Estos estudios han mostrado perturbaciones significativas de conformación y características de las moléculas asociadas, inducidas por la presencia de tensioactivos. La extensión de estas perturbaciones depende del estado de carga de los grupos polares del tensioactivo, del contenido en agua de los núcleos micelares y de la naturaleza de las moléculas utilizadas como sonda (Nicot y col., 1985; Gally y col., 1987; Ferreira y Gratton, 1990; Smogyi, 1993; Bhattacharyya y Basak, 1993; 1995).

De entre los métodos espectroscópicos utilizados, probablemente la fluorescencia ha sido el que más, ya que tanto la fluorescencia intrínseca de proteínas, como la fluorescencia emitida por diversos grupos químicos fijados en ellas (fluoróforos extrínsecos), es muy sensible a los diferentes parámetros ambientales, tales como temperatura, viscosidad, fuerza iónica y pH, a causa de la alteración del comportamiento dinámico de la cercana matriz proteica que interacciona como los grupos fluoróforos. Por lo tanto, las técnicas fluorimétricas se han convertido en poderosas herramientas para obtener información sobre la dinámica y funcionalidad de proteínas en este tipo de ambientes (Marzola y Gratton, 1991; Bhattacharyya y Basak, 1995; Fernández-Velasco y col., 1995; Lenz y col., 1995; Bermejo y col., 2000; 2003b).

La solubilización de las ficocianinas en este tipo de medios, se ha realizado a través de su inclusión en el interior acuoso de micelas reversas siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.5.

4.4.1.1.- **Influencia del tamaño micelar.**

Como se ha indicado en el apartado correspondiente de la metodología (3.2.5), se han preparado microemulsiones de tipo micelar de ficocianinas en medio hidrocarbonado apolar, utilizando la técnica de inyección, en el rango de w_0 comprendido entre 8-50 y se han registrado los correspondientes espectros de absorción uv-visible, de fluorescencia y de anisotropía de estado estacionario. Se han utilizado para estos ensayos, aloficocianina y R-ficocianina, ya que nuestro grupo de investigación ya había publicado con anterioridad los resultados obtenidos utilizando C-PC procedente de *Spirulina platensis* (Bermejo y col., 2000)

Aloficocianina.

Las microemulsiones micelares preparadas presentan espectros de fluorescencia diferentes, en los que la posición del máximo depende de la razón $w_0 = [\text{agua}]/[\text{tensioactivo}]$ (valor estrechamente relacionado con el tamaño de la micela) como puede observarse en la Figura 4.80. El máximo de emisión aumenta desde 632 nm, valor correspondiente a valores de w_0 bajos, hasta 661 nm para valores de $w_0=28$ y se mantiene constante en 659 nm para valores de w_0 mayores de 40.

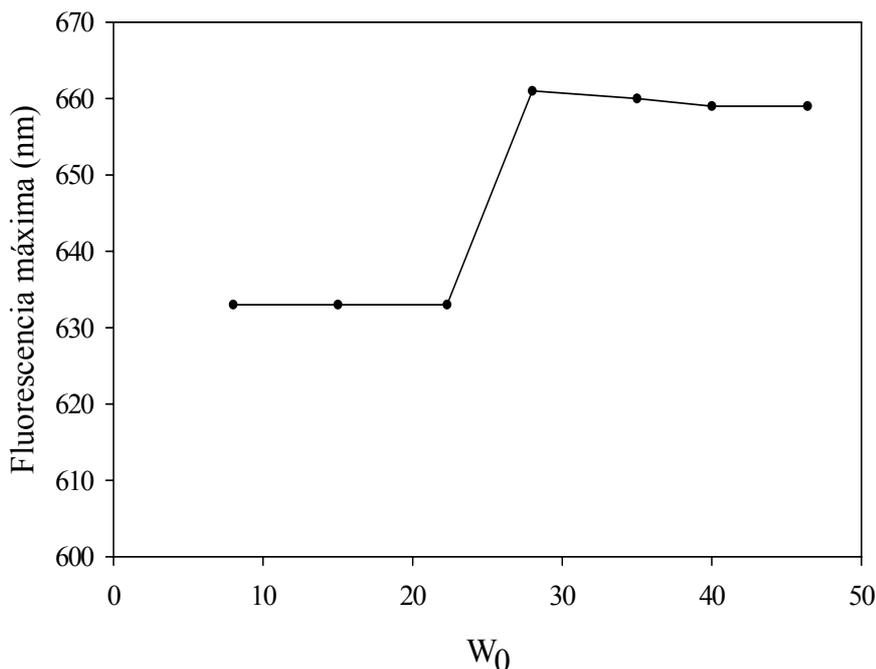


Figura 4.80

Variación de la posición del máximo de intensidad de fluorescencia de APC en microemulsiones micelares de AOT/agua/isoctano en función de la razón molar agua/tensioactivo (w_0).

La Figura 4.81 muestra que la anisotropía de fluorescencia disminuye a medida que aumenta el contenido en agua de las micelas hasta un valor de w_0 próximo a 35, a partir del cual aumenta, permaneciendo prácticamente constante para valores de w_0 mayores o iguales a 40.

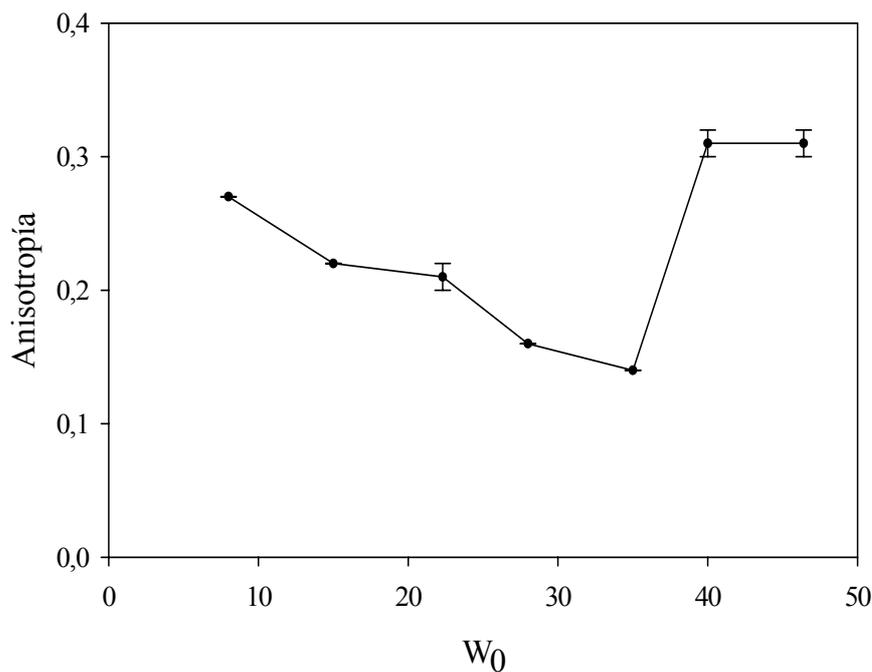


Figura 4.81

Variación de la anisotropía de fluorescencia de APC en microemulsiones micelares de AOT/agua/isooctano en función de la razón molar agua/tensioactivo (w_0). Los valores de anisotropía de fluorescencia son la media de tres determinaciones y las barras de error reflejadas corresponden a la desviación estándar de las mismas. ($\lambda_{exc}=620$; $\lambda_{emi}=660$)

La Figura 4.82 muestra los espectros de emisión de fluorescencia en estado estacionario de la APC en el interior de micelas reversas de diferentes valores de w_0 . En ella se puede observar que los espectros de fluorescencia correspondientes a valores de w_0 por debajo de 28 se muestran distorsionados con respecto a la forma característica de dichos espectros de APC en medios favorables, lo cual no ocurre para valores de w_0 a partir de 28. Sin embargo, los valores de w_0 igual a 28 y 35 presentan un hombro alrededor de 680 nm que desaparece para valores de $w_0 \geq 40$.

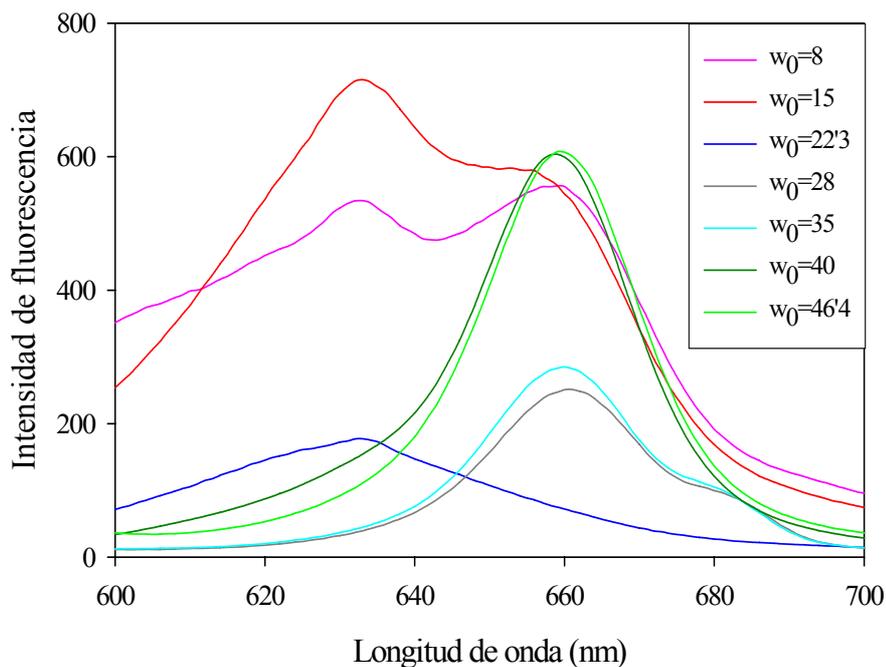


Figura 4.82

Espectros de emisión de fluorescencia de APC en el interior de micelas reversas a diferentes valores de w_0 .

Por tanto de la observación de los espectros de fluorescencia, los valores del máximo de fluorescencia y los correspondientes valores de anisotropía (Figuras 4.80, 4.81 y 4.82) se puede concluir que se necesita como tamaño micelar, al menos correspondiente a $w_0=40$, para la inclusión efectiva de la proteína en el interior de las micelas, lo cual corrobora el valor teórico de w_0 mínimo calculado teniendo en cuenta las dimensiones de la proteína. Así, los parámetros cristalográficos calculados por Brejc y col. son: $a=b=101'9 \text{ \AA}$ y $c=130'6 \text{ \AA}$ (Brejc y col., 1995). Por otro lado, el radio de la micela $r(\text{\AA})=1'75 \cdot w_0$ (Luisi y col., 1988), para un valor de $w_0=37$, sería igual a 65 \AA que genera un diámetro interno aproximado de 130 \AA , que explicaría que APC pudiera estar efectivamente solubilizada para valores de $w_0 \geq 40$.

Las siguientes figuras muestran los espectros de absorción uv-visible y de emisión de fluorescencia (Figuras 4.83 y 4.84) de APC tanto en medio acuoso (disuelta en tampón fosfato pH7, 20mM) como en microemulsiones tipo micelas reversas con un contenido en agua correspondiente a $w_0=46'4$. Para este valor de w_0 , el diámetro interno micelar tiene un valor de 163 \AA , lo que induce a pensar que APC está bien solubilizada, pues el tamaño interior acuoso micelar puede albergar con suficiencia a la proteína.

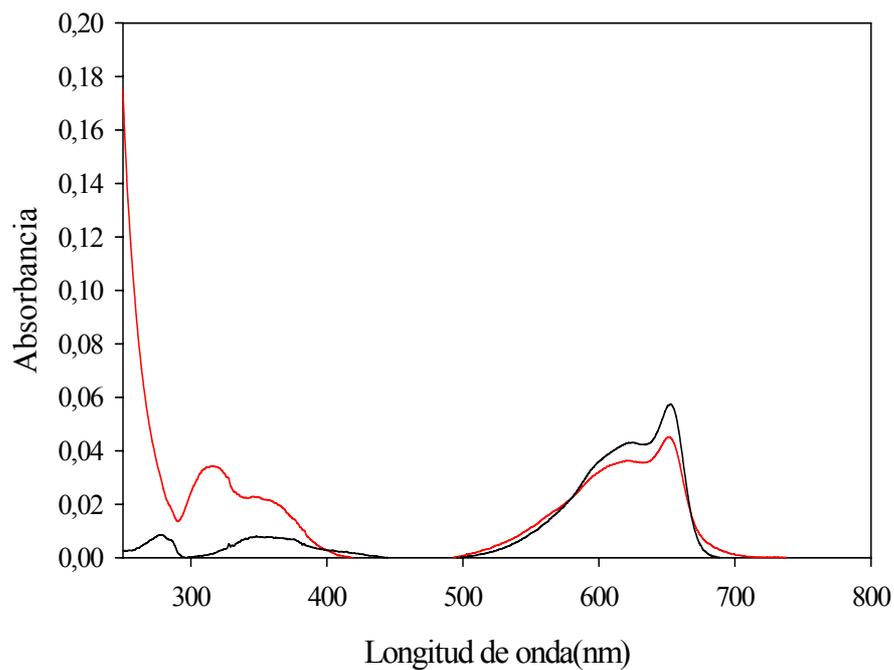


Figura 4.83

Espectros de absorción uv-visible de APC en medios acuoso (—) y micelar (—) ($w_0=46'4$).

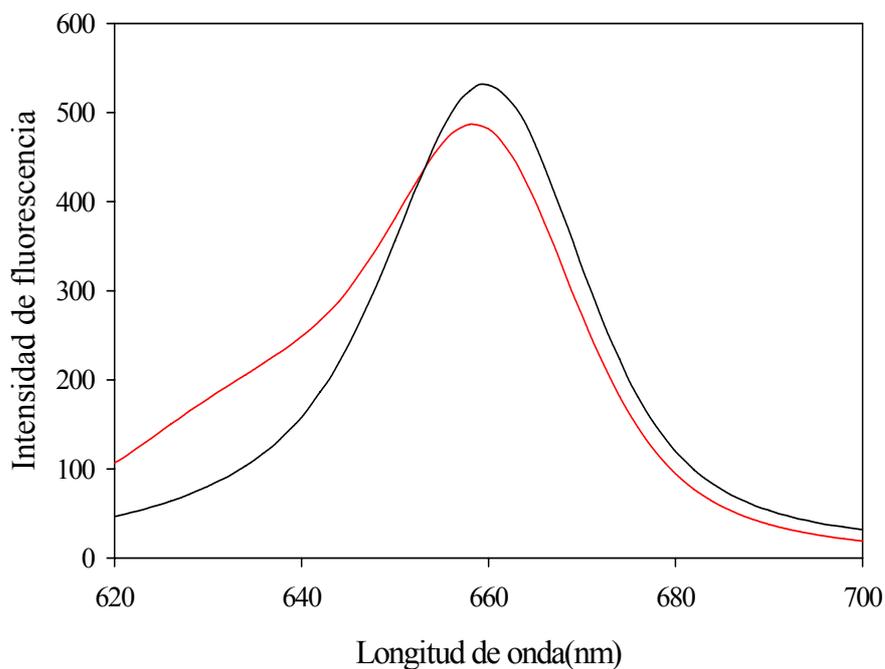


Figura 4.84

Espectros de emisión de fluorescencia de APC en medios acuoso (—) y micelar (—) ($w_0=46'4$). ($\lambda_{exc}=580$; $\Delta\lambda_{exc}=10$; $\Delta\lambda_{exc}=10$).

En términos generales, los espectros correspondientes a la proteína incorporada al interior de las micelas reversas presentan ligeras diferencias con respecto a los que presentan las disoluciones acuosas de APC en estado de agregación trimérico. Así, en micelas reversas desaparece el pico del espectro de absorción en medio acuoso en 280 nm, desplazándose el pico de 350 hacia el azul. Por otro lado, el espectro de emisión de fluorescencia en medio micelar presenta aproximadamente la misma forma que el correspondiente a APC en medio acuoso y el máximo en medio micelar está situado a 658 nm, ligeramente desplazado hacia el azul respecto al obtenido para APC en disolución acuosa libre (660nm).

En la Figura 4.85, se muestran los valores de anisotropía de fluorescencia de la APC en medios acuoso (disuelta en tampón fosfato pH 7, 20mM) y en microemulsiones de tipo micelas reversas con un contenido en agua correspondiente a $w_0=46'4$. Los espectros de anisotropía son interesantes de obtener, ya que los procesos de agregación y desagregación en las proteínas provocan cambios en la anisotropía de fluorescencia según han descrito diferentes autores (Mimuro y col., 1986; Yeh y col., 1986; Bermejo y col., 1997). Por ello, también se han obtenido estos espectros de APC en medio acuoso y micelar, para poder interpretar los posibles cambios en el estado de agregación que APC pudiera sufrir en el interior de micelas reversas. Se ha trabajado de tal forma que el valor empleado de longitud de onda de emisión permite que, en las condiciones experimentales empleadas, se puedan obtener los datos de anisotropía que corresponden a las mayores longitudes de onda del espectro de excitación, sin interferencias originadas por la presencia de luz dispersa. Además, esta longitud de onda de emisión corresponde a la zona menos energética del espectro de fluorescencia, lo que permite asegurar que la emisión corresponde al estado excitado de menor energía del cromóforo o cromóforos fluorescentes de la biliproteína.

Como se observa en la Figura 4.85, el espectro de anisotropía de fluorescencia de APC en medio micelar, se asemeja bastante en forma y extensión con el de su disolución en fosfato pH 7, 20 mM, aunque se aprecia un aumento importante en los valores de anisotropía.

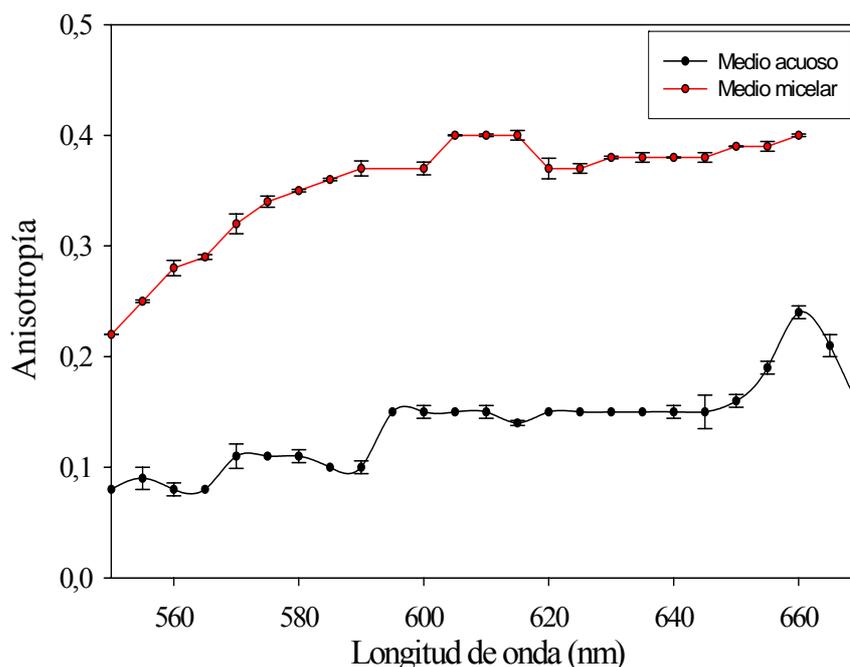


Figura 4.85

Espectros de anisotropía de APC en medios acuoso y micelar. ($w_0=46'4$)

R-ficocianina.

Análogamente se ha trabajado con R-ficocianina y las microemulsiones micelares preparadas presentan espectros de fluorescencia diferentes, en los que la posición del máximo depende de la razón $w_0 = [\text{agua}]/[\text{tensioactivo}]$ como puede observarse en la Figura 4.86. El máximo de emisión va aumentando (desde 557 nm, valor inicial para $w_0 = 8$) a medida que lo hace el contenido en agua del núcleo acuoso de la micela y este efecto cesa a un valor de w_0 cercano a 40 donde la posición del máximo se estabiliza en 565 nm aproximadamente.

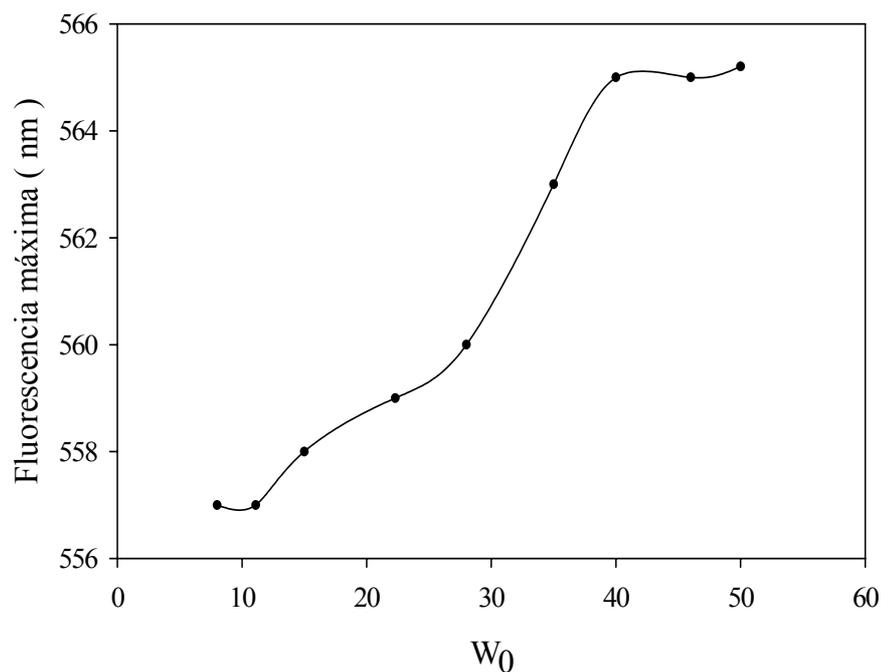


Figura 4.86

Variación de la posición del máximo de intensidad de fluorescencia de R-PC en microemulsiones micelares de AOT/agua/isooctano en función de la razón molar agua/tensioactivo (w_0).

De la misma forma, la Figura 4.87 muestra que la anisotropía de fluorescencia disminuye a medida que aumenta el contenido en agua de las micelas hasta un valor de w_0 próximo a 35 y entonces permanece prácticamente constante para valores de w_0 mayores o iguales a 40.

La Figura 4.88 muestra los espectros de emisión de fluorescencia en estado estacionario de R-PC en el interior de micelas reversas de diferentes valores de w_0 .

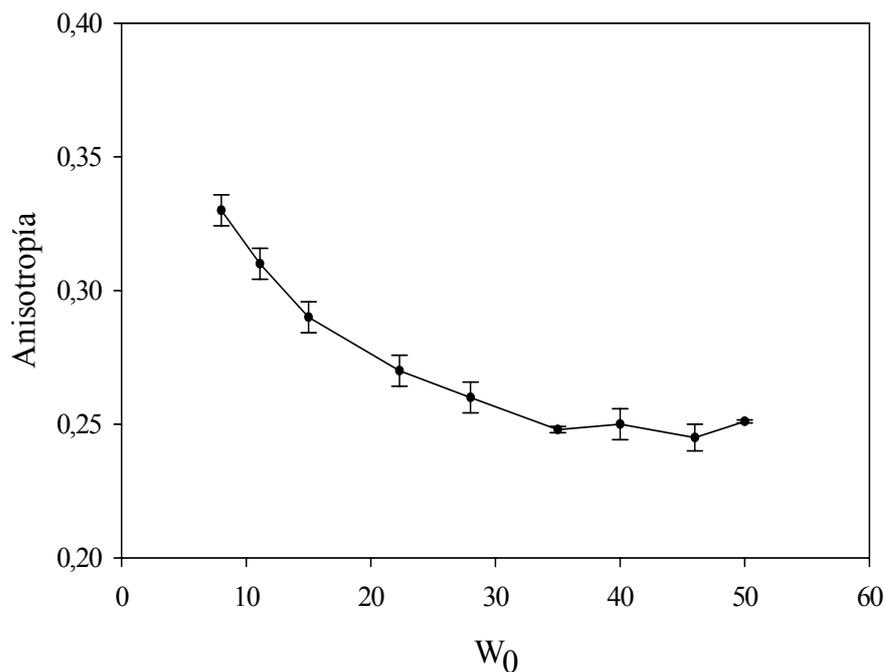


Figura 4.87

Variación de la anisotropía de fluorescencia de R-PC en microemulsiones micelares de AOT/agua/isooctano en función de la razón molar agua/tensioactivo (w_0). Los valores de anisotropía de fluorescencia son la media de tres determinaciones y las barras de error reflejadas corresponden a la desviación estándar de las mismas. ($w_0=8-35, \lambda_{exc}=550; \lambda_{emi}=632$); ($w_0=40-50, \lambda_{exc}=510; \lambda_{emi}=565$)

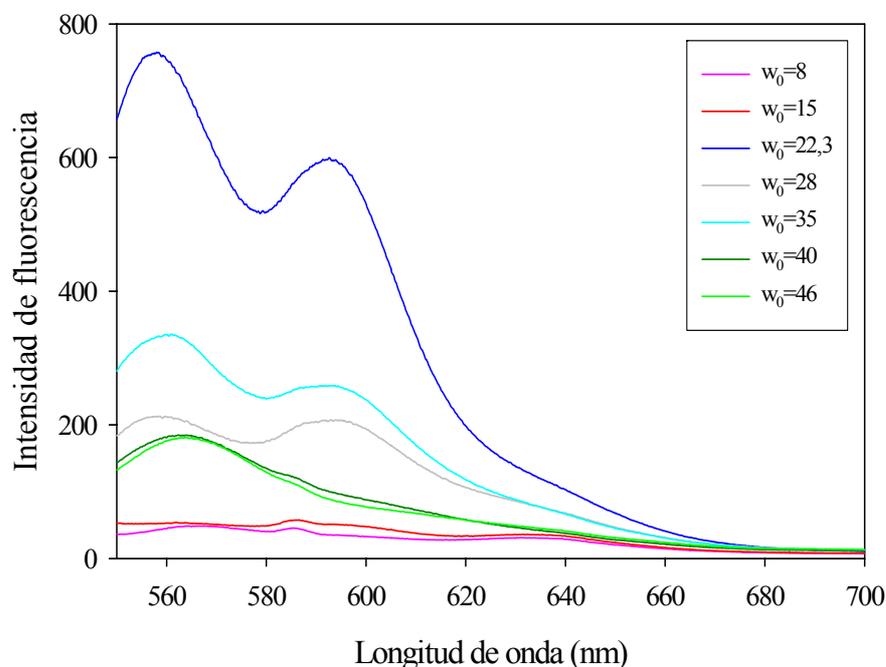


Figura 4.88

Espectros de emisión de fluorescencia de R-PC en el interior de micelas reversas a diferentes valores de w_0 .

En la figura anterior se puede observar que los espectros de fluorescencia correspondientes a valores de w_0 por debajo de 40 se muestran distorsionados con respecto a la forma característica de dichos espectros de R-PC en medios favorables, lo cual no ocurre para valores de w_0 a partir de 40. A partir de este valor, el espectro posee una banda centrada en los 563 nm. Puede decirse que se necesita un tamaño micelar al menos correspondiente a $w_0=40$, para la buena inclusión de la proteína en el interior de las micelas.

Las Figuras 4.89, 4.90 y 4.91 muestran los espectros de absorción uv-visible, de emisión de fluorescencia y los espectros de anisotropía de R-PC disuelta en fosfato pH 7, 20mM y R-PC en microemulsiones tipo micelas reversas con un contenido en agua correspondiente a $w_0 = 46$. Como se ha comentado anteriormente, los espectros de anisotropía son interesantes de obtener, ya que los procesos de agregación y desagregación en las proteínas provocan cambios en la anisotropía de fluorescencia. Así, se han obtenido estos espectros de R-PC en medio acuoso y micelar, para poder interpretar los posibles cambios en el estado de agregación de R-PC en el interior de micelas reversas.

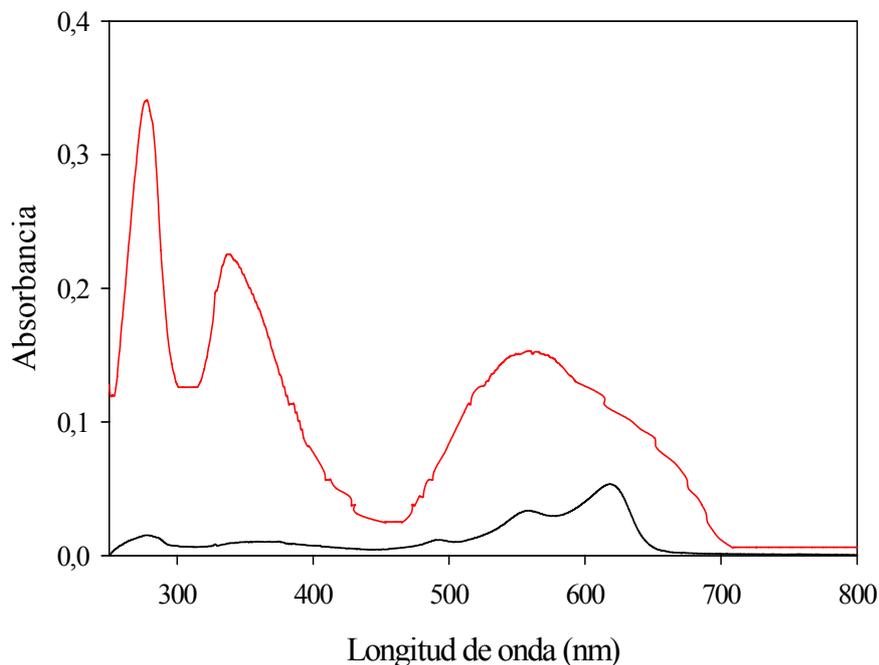


Figura 4.89

Espectros de absorción uv-visible de R-PC en medios acuoso (—) y micelar (—) ($w_0=46$).

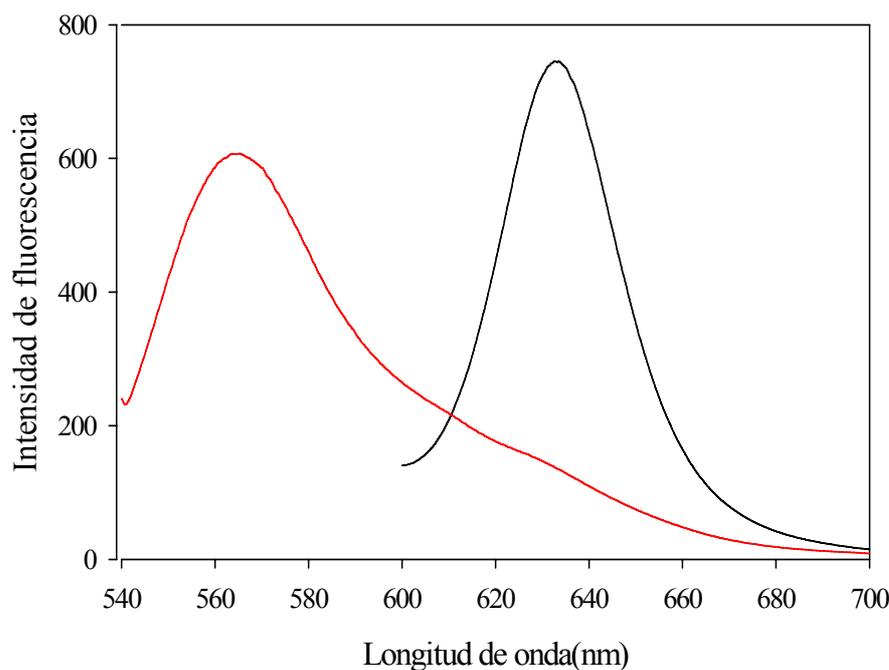


Figura 4.90

Espectros de emisión de fluorescencia de R-PC en medios acuoso (—) y micelar (—) ($w_0=46$).

En términos generales, los espectros correspondientes a la proteína incorporada al interior de las micelas reversas presentan diferencias con respecto a los que presentan las disoluciones de R-PC en estado de agregación trimérico en medio acuoso libre. Así, en micelas reversas R-PC presenta un desplazamiento hacia el azul en el espectro de absorción respecto a disoluciones acuosas, con un máximo a 555 nm y un hombro a 618 nm respectivamente. El espectro de emisión de fluorescencia en medio acuoso presenta un máximo de emisión característico a 632 nm, mientras que el correspondiente a R-PC en medio micelar presenta un desplazamiento al azul con un máximo de fluorescencia en 565 nm y un perfil que denota un aumento notable de la anchura media a mitad de banda. Los valores de anisotropía de R-PC incorporada al interior de micelas reversas son superiores a los de R-PC trimérica (Figura 4.91).

De la observación de la Figura 4.91 se desprende que el espectro de anisotropía de fluorescencia de R-PC en disolución de fosfato 20 mM y pH 7 tiene tres regiones claramente diferenciadas. La primera que corresponde a la de mayor energía comienza a los 500 nm y se extiende hasta los 540 nm aproximadamente. Una segunda zona está comprendida entre 540 y 590 en donde existe un aumento de la anisotropía y la tercera comienza sobre los 590 nm y se extiende hasta el final de los datos obtenidos presentando forma de meseta. En lo que se refiere a R-PC en medio micelar, se siguen observando tres regiones que, de forma aproximada,

coinciden en extensión y longitud de onda con las anteriores, aunque se aprecia un aumento importante en los valores de anisotropía.

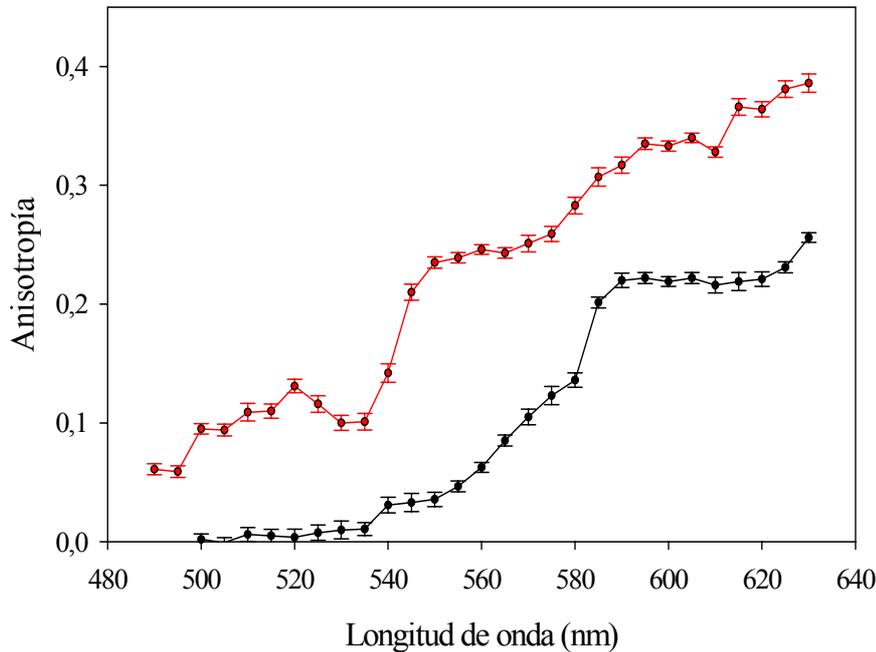


Figura 4.91

Espectros de anisotropía de R-PC en medios acuoso (—) y micelar (—).

En términos generales y a la vista de los resultados obtenidos con las dos biliproteínas ensayadas (APC y R-PC), hemos de tener en cuenta las dimensiones del interior de los núcleos acuosos de las microemulsiones micelares, antes de entrar a discutir aspectos estructurales de las ficocianinas solubilizadas en las mismas. Además de la alta transparencia óptica del sistema formado por AOT/agua/isooctano, otra importante particularidad del mismo es el hecho de que el tamaño del núcleo interno de la micela depende del valor de w_0 . Se han estudiado macromoléculas disueltas en núcleos acuosos de sistemas de este tipo principalmente utilizando métodos espectroscópicos, monitorizando su comportamiento como una función de la razón agua/tensioactivo. Este parámetro también determina el grado de desviación entre las propiedades del agua interna de aquella del medio acuoso libre. El tensioactivo es capaz de formar microemulsiones micelares estables para intervalos de w_0 comprendidos entre 5 y 50. Así, el radio del núcleo acuoso micelar debe estar comprendido entre 10 y 80 Å para esos valores y Zulauf y Eicke (1979) aportan el dato de radio interno igual a 50 Å para micelas formadas por AOT/isooctano para $w_0=30$ a temperatura ambiente. Para sistemas donde interviene el AOT como tensioactivo, se puede considerar que la relación entre w_0 y el radio del

interior micelar es $r(\text{Å})=1,75 \cdot w_0$ (Luisi y col., 1988) y en base a esta relación se han efectuado los cálculos presentados en esta Memoria.

Teniendo en cuenta los parámetros estructurales de APC y R-PC y las consideraciones sobre las dimensiones del interior acuoso micelar, los aspectos sobre los espectros descritos en párrafos anteriores pueden explicarse como siguen. Estas biliproteínas son moléculas con una estructura anfipática que es la responsable de la asociación parcial que presentan en disolución. Estas proteínas se presentan, tras los procesos de purificación, formando complejos triméricos monodispersos. Estos agregados triméricos poseen dimensiones mayores que los interiores de las micelas relativamente pequeñas ($w_0 < 40$), y es razonable asumir que cuando el w_0 es bajo la proteína permanece parcialmente expuesta al disolvente hidrocarbonado. En estas condiciones existen interacciones que tienen lugar entre el agua interna micelar, las porciones hidrofílicas de cadenas de aminoácidos y los grupos sulfonato que constituyen las cabezas polares del AOT, mientras que las porciones hidrofóbicas de la proteína se encuentran directamente expuestas al medio hidrocarbonado o interaccionando con las colas lipofílicas de las moléculas del tensioactivo. Todo este conjunto de interacciones provoca cambios conformacionales y estructurales en la macromolécula (en parte debidos a fenómenos de desplegamiento y disociación parcial), genera una alteración de las rutas de transferencia de energía entre cromóforos y puede conducir a una disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia así como a un importante aumento en la anisotropía. Es importante resaltar, que cuando el tamaño micelar es inferior a $w_0 = 40$, la estabilidad del sistema micelar es bastante reducida y la biliproteína tiende a precipitar al poco tiempo de la agitación inicial, necesaria para la formación del sistema y termina generando un sedimento poco coloreado en el fondo de la microemulsión indicativo de la oxidación de los cromóforos (Scheer, 1981).

Por el contrario el sistema formado por APC y R-PC solubilizadas en AOT/agua/isooctano para valores de w_0 iguales o superiores a 40, posee un color azul bastante atractivo, con una absorbancia máxima a 650 y 555 nm y una emisión de fluorescencia máxima a 660 y 565 nm respectivamente. Además para $w_0 \geq 40$, la posición del máximo de emisión de fluorescencia y los valores de anisotropía permanecen constantes. Estos efectos se pueden explicar asumiendo que existe suficiente agua en el interior micelar y éste es lo suficiente grande para poder albergar solubilizada a APC y R-PC en forma trimérica (Figura 4.92). Por otra parte, los valores constantes del máximo de intensidad de fluorescencia y anisotropía

cuando el sistema posee valores de $w_0 \geq 40$, implican que la presencia de mayor cantidad de agua en el interior micelar no afecta al microambiente que rodea la macromolécula.

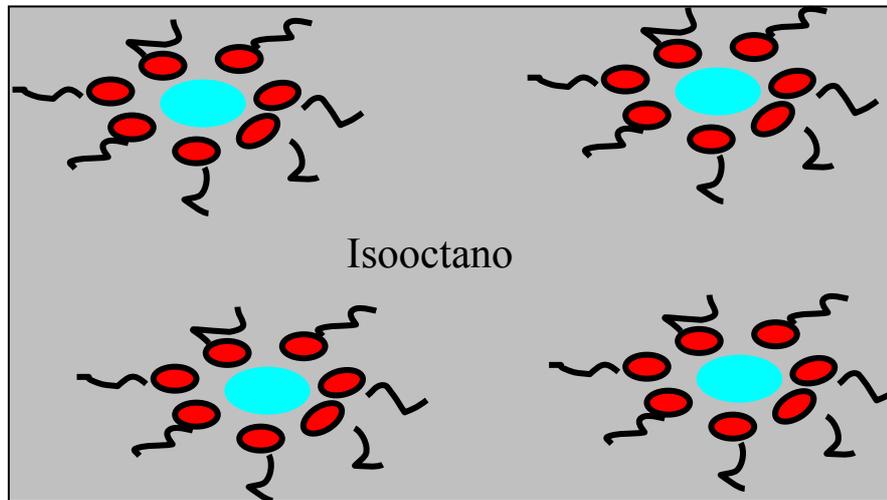


Figura 4.92

Detalle de la posible situación de las biliproteínas incorporadas en micelas reversas para valores de $w_0 \geq 40$. (● proteína)

Es importante resaltar, la importancia de los espectros de anisotropía ya que son altamente sensibles a los procesos de disociación de las biliproteínas, debido a que se produce un desacoplamiento entre los cromóforos que altera las rutas de transferencia de la energía (MacColl y col., 1971; Bermejo y col., 2001). Los espectros que se muestran en las Figuras 4.85 y 4.91 denotan que APC y R-PC solubilizadas en el interior micelar, mantienen su estructura cuaternaria y que no existen cambios conformacionales que alteren el fuerte acoplamiento entre cromóforos que provoca su característica anisotropía de fluorescencia. En este sentido, es bien conocido que las propiedades dinámicas de líquidos confinados en espacios reducidos son bastante diferentes de las de los mismos en el seno de grandes masas (Granick, 1991).

Por esto, las propiedades del medio acuoso interno en las microemulsiones de AOT, incluso a altos contenidos de agua, son diferentes a aquellas del medio acuoso libre (no confinado) y su viscosidad aparente es de 6 a 9 veces mayor que la de la del medio acuoso libre (Andrade y col., 2000). Así, el incremento de los valores de anisotropía con respecto a los de las biliproteínas triméricas en disolución acuosa, significa que la movilidad promedio de la proteína en el interior de la micela está limitada por la alta viscosidad del agua interna, por las interacciones entre los residuos de cadenas de aminoácidos de las biliproteínas con los grupos

sulfonato del AOT o con la capa de agua interfacial estructurada o bien a la combinación de ambos efectos.

4.4.1.2.- **Estabilidad.**

También se ha estudiado la estabilidad de las ficocianinas solubilizadas en el medio micelar, en función de variables tales como el tiempo y la temperatura, monitorizando el proceso mediante medidas de emisión de fluorescencia.

Tiempo.

La estabilidad de las ficocianinas solubilizadas en medios micelares frente al tiempo, se ha determinado monitorizando los valores de la intensidad de fluorescencia en el espectro de emisión en estado estacionario, tanto para el sistema acuoso libre como para el medio micelar. Así, se han registrado los espectros en el instante inicial y a diferentes tiempos, determinándose los porcentajes de disminución de la señal fluorescente respecto del valor inicial.

Aloficocianina.

La Figura 4.93 muestra el seguimiento de la estabilidad de la APC en función del tiempo tanto en medio acuoso como solubilizada en micelas, a través de la medida de intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión. Los resultados denotan que durante los seis primeros días, la estabilidad de la APC es superior cuando se encuentra solubilizada en medio micelar que cuando lo está en disolución acuosa. Aunque en medio acuoso experimenta una pérdida de fluorescencia significativa durante los primeros días (cerca al 30%), a partir del sexto día se produce un ligero descenso hasta el final del periodo de estudio (30 días). Algo similar le ocurre al medio micelar, aunque el % de descenso es inferior al producido en medio acuoso libre al final del periodo de medida.

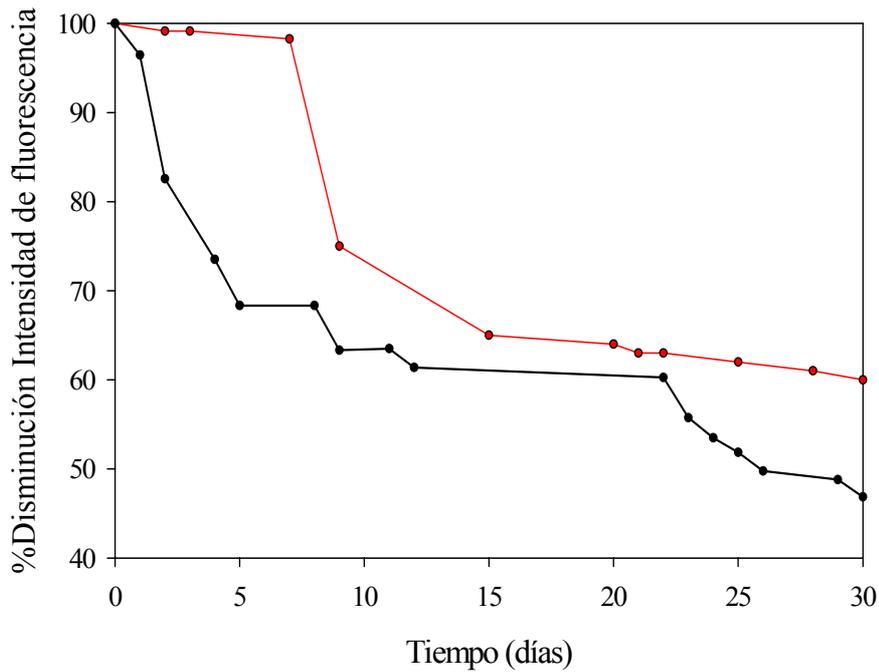


Figura 4.93

Disminución de la fluorescencia de APC en medios acuoso (—) y micelar (—) en función del tiempo.

R-ficocianina.

Análogamente, la Figura 4.94 muestra la estabilidad de R-PC tanto en medio acuoso como solubilizada en micelas ($w_0=46$), a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos denotan que la estabilidad de R-PC es superior cuando se encuentra solubilizada formando microemulsiones a cuando lo está en disolución acuosa. Inicialmente, para el caso de los sistemas micelares, se produce una rápida disminución de la fluorescencia durante los primeros cinco días, a partir de los cuales el sistema parece estabilizarse, manteniendo un porcentaje de fluorescencia sobre la inicial tras preparación del sistema, próximo al 60 %. En el caso de R-PC en medios acuosos libres, los parámetros espectrales permanecen prácticamente constantes durante los primeros tres días y a partir de entonces comienzan a disminuir sus valores de forma progresiva hasta llegar al día 20, donde el descenso parece cesar y la fluorescencia que se aprecia es ya un valor muy pequeño (5 %), respecto del valor inicial del sistema. Como Scheer ha mostrado, los cromóforos PEB y PUB son lábiles cuando se desacoplan de las proteínas y los procesos de fotoblanqueamiento se producen rápidamente en cromóforos desacoplados (Scheer, 1981). Por esto, la mayor estabilidad con el tiempo obtenida a través de la medida de

absorbancia e intensidad de fluorescencia, significan que los cromóforos se encuentran más protegidos de los procesos de fotoblanqueamiento en el interior acuoso micelar, tanto en el caso de R-PC como en el de APC, aunque en ésta última las diferencias no sean tan pronunciadas.

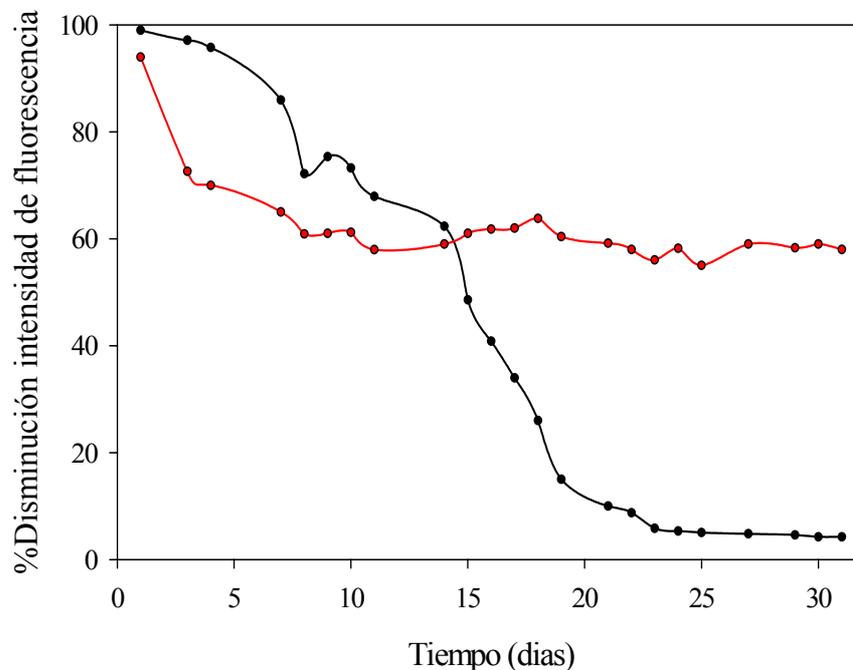


Figura 4.94

Disminución de la fluorescencia de R-PC en medios acuoso (—) y micelar (—) en función del tiempo.

Temperatura.

Se ha utilizado los valores encontrados en el máximo de emisión de fluorescencia para determinar la dependencia de la estabilidad de los parámetros espectroscópicos con la temperatura.

Aloficianina.

La Figura 4.95 muestra la disminución de la fluorescencia de APC en función de la temperatura y del tiempo tanto en medio acuoso como solubilizada en el interior de micelas reversas. Inicialmente, de la observación de la Figura 4.95 podemos deducir que en el caso del medio acuoso, los primeros cinco minutos de exposición de la muestra a cada valor de temperatura, son suficientes para provocar descensos de la fluorescencia inicial de

aproximadamente el 10%(30°C), 20%(40°C), 40%(50°C), 70%(60°C) y 80 %(70°C). En el caso de APC solubilizada en sistemas micelares, la disminución de la intensidad de fluorescencia es menor que en medio acuoso en términos generales.

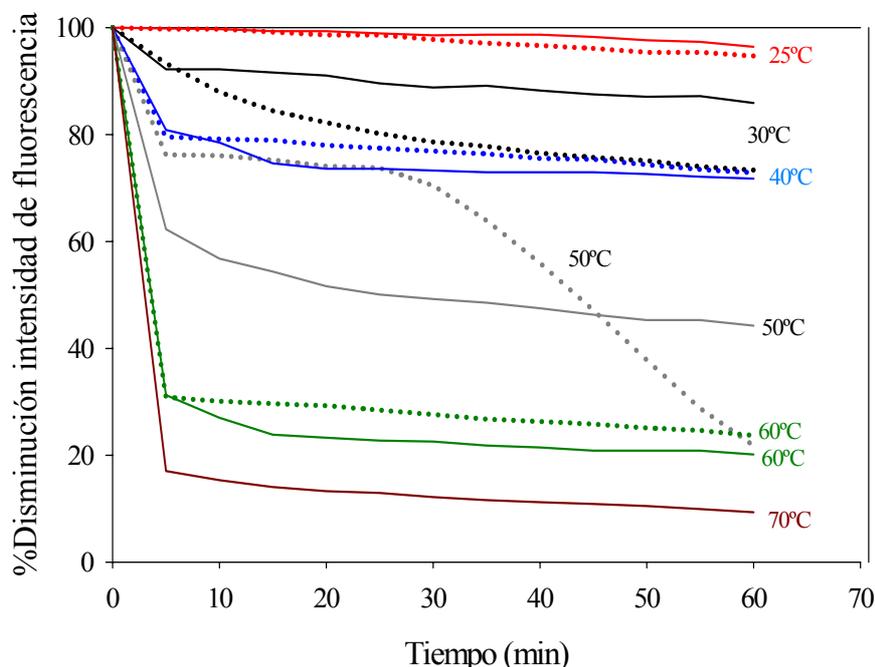


Figura 4.95

Comparación de la disminución de la fluorescencia de APC en medios acuoso (línea continua) y micelar (línea discontinua) en función del tiempo a diferentes temperaturas.

R-ficocianina.

La siguiente figura muestra la comparación del comportamiento de la fluorescencia de R-PC en medios acuoso y micelar en función del tiempo para diferentes temperaturas. Inicialmente, de la observación de la Figura 4.96 podemos deducir que para el caso del medio acuoso, a 30 °C, los espectros permanecen prácticamente inalterados y no sufren cambios reseñables en los sesenta minutos de toma de medidas. Sin embargo, en las restantes temperaturas ensayadas, los primeros cinco minutos de exposición de la muestra a cada valor de temperatura, son suficientes para provocar descensos de la fluorescencia inicial de aproximadamente el 20, 40, 80 y 95 % para 40, 50, 60 y 70 °C respectivamente. En el caso de R-PC solubilizada en sistemas micelares, ya a 30 °C se produce una disminución de la fluorescencia, llegando a perderse al final del tiempo de análisis, hasta 25 % de la fluorescencia inicial. A 40 °C también se puede apreciar que la disminución de fluorescencia en el medio

micelar, es más acusada que en el acuoso, mientras que en los dos últimos valores de temperatura ensayados, 50 y 60 °C, los porcentajes de pérdida de fluorescencia alcanzados se pueden cifrar en el 70 y 80 % respectivamente, valores inferiores a los alcanzados para las mismas temperaturas en medios acuosos libres. Es importante resaltar, que en el caso de los medios micelares, la disminución es de forma gradual a lo largo de los sesenta minutos de análisis y no brusca en los primeros minutos, como ocurre en medios acuosos.

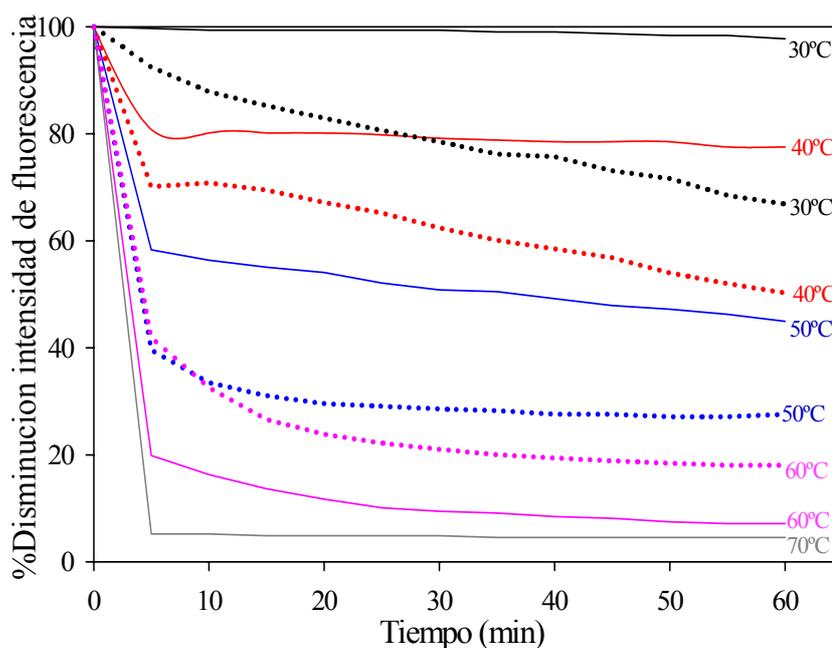


Figura 4.96

Comparación de la disminución de la fluorescencia de R-PC en medios acuoso (línea continua) y micelar (línea discontinua) en función del tiempo a diferentes temperaturas.

En términos generales, para ambas biliproteínas (APC y R-PC), los valores medios de estabilidad espectroscópica obtenidos en disolución acuosa, están en buen acuerdo con los obtenidos para otras biliproteínas procedentes de diferentes microalgas como *Gracilaria longa* y *Palmaria palmata* (D'Agnolo y col., 1994; Galland-Irmouli y col., 2000). Por encima de 60° C los sistemas micelares no son estables y por ello la absorbancia y la intensidad de fluorescencia disminuyen drásticamente. En este sentido, Zulauf y Eicke (1979) propusieron que las solubilidades mutuas de AOT, agua e isooctano aumentan conforme lo hace la temperatura y las moléculas individuales de tensioactivo deben migrar hacia el interior acuoso de los sistemas micelares. Sin embargo, es necesario puntualizar que moléculas grandes pueden alterar la estructura y el tamaño de las microemulsiones y las solubilidades mutuas de los

componentes del sistema. Además, las proteínas parecen crear su propio núcleo acuoso (Menger y Yamada, 1979). Por consiguiente, parece que la presencia de las biliproteínas reduce el efecto de la temperatura y produce un incremento en la estabilidad de la microemulsión frente a la temperatura. Por encima de 70°C, el reagrupamiento de las moléculas que constituyen las micelas para formar agregados mayores, provoca la exposición de algunas moléculas de biliproteína al disolvente hidrocarbonado con la concomitante pérdida de fluorescencia. Otro efecto de la temperatura también descrito previamente (Zulauf y Eicke, 1979) es que, a altas temperaturas (aunque inferiores a 90°C), al agua libre se evapora del interior micelar debido a los cambios estructurales originados por las moléculas de tensioactivo disueltas, y el tensioactivo se reordena para formar núcleos más pequeños dependiendo de la nueva razón agua/tensioactivo (w_0). Esta pérdida de agua puede provocar la pérdida de algunas moléculas de biliproteína y la concomitante exposición al disolvente hidrocarbonado de éstas, produciendo una pérdida de intensidad de fluorescencia.

4.4.2.- APLICACIONES A MUESTRAS REALES

Una vez ensayada la posibilidad de incorporar las ficocianinas en sistemas apolares utilizando el interior de micelas reversas para ello, se ha estudiado la incorporación directa en muestras reales de alimentos y bebidas. Así, utilizando los diferentes extractos ricos en ficocianinas obtenidos previamente por cromatografía de lecho expandido, se han realizado ensayos de coloración de diferentes matrices reales, para determinar las propiedades colorantes de dichos extractos. Además, se ha estudiado su estabilidad y se han calculado los correspondientes factores de tinción.

La metodología utilizada se muestra en el apartado 3.2.3.3. Como sistema de referencia se ha tomado el espacio de color $L^*a^*b^*$. Los extractos obtenidos a partir de las diferentes cianobacterias utilizadas, *Anabaena marina*, *Spirulina platensis* y *Synechocystis aquatilis*, muestran un color azulado transparente. Las respectivas coordenadas de color determinadas para cada uno de los extractos se muestran en la Tabla 4.69.

Tabla 4.69

Coordenadas cromáticas de cada uno de los extractos de ficocianinas utilizados.

Origen	L^*	a^*	b^*
<i>Anabaena marina</i>	16'12	8'57	-43'24
<i>Spirulina platensis</i>	4'66	2'08	-26'33
<i>Synechocystis aquatilis</i>	16'76	13'41	-49'36

4.4.2.1.-Ensayos de coloración.

Los ensayos de coloración se han realizado añadiendo sobre cada matriz, cantidades diferentes de los extractos concentrados de biliproteínas obtenidos a partir de cada microalga, determinándose de esta forma la curva de saturación de color de cada extracto adicionado sobre cada matriz. Asimismo, se han seleccionado productos comerciales (alimentos y bebidas) disponibles en el mercado y se ha caracterizado su color, determinándose el volumen de extracto necesario para alcanzar o aproximarse a dicho color. Las matrices ensayadas han sido: bebidas isotónicas, licores y helados. Estas matrices se han elegido debido a que en el mercado existen variedades de las mismas que poseen tonalidades azuladas y por tanto susceptibles de ser reproducidas por adición de nuestros extractos a las matrices correspondientes.

Los diferentes extractos de cianobacterias se han ajustado a la misma concentración de biliproteínas, de forma que los ensayos fueran más comparativos. Es importante resaltar que dada la dificultad de encontrar productos comerciales de color azul, se han ensayado un número de matrices que podría haber sido más amplio.

4.4.2.1.1.- Bebidas isotónicas.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para bebidas isotónicas, utilizando los diferentes extractos de ficocianinas adicionados sobre una matriz blanco constituida por Powerade incoloro para tratar de reproducir el Powerade azul que se vende en el mercado.

Extracto de *Anabaena marina*.

La Tabla 4.70 y las Figuras 4.97, 4.98 y 4.99 muestran los resultados obtenidos para las muestras coloreadas con extracto rico en ficocianinas obtenido mediante CALE, procedente de *Anabaena marina*.

Tabla 4.70

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de bebidas isotónicas adicionadas con el extracto de *Anabaena marina*.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)									
		L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*ab	
ESTÁNDAR	Powerade Azul	84'88	-24'08	-10'50	26'27	203'56	0	0	0	0	
1	Powerade + 0	99'64	0'13	-0'036	0'135	344'44	14'76	24'21	10'47	30'22	
2	Powerade + 10	98'76	-1'72	-1'68	2'41	224'38	13'88	22'36	8'82	27'75	
3	Powerade + 35	96'31	-5'62	-5'43	7'82	224'03	11'43	18'46	5'07	22'29	
4	Powerade + 60	93'96	-9'38	-8'96	12'97	223'68	9'08	14'70	1'55	17'34	
5	Powerade + 85	91'77	-12'52	-12'14	17'45	224'13	6'89	11'56	-1'64	13'55	
6	Powerade + 110	89'71	-15'58	-15'13	21'72	224'16	4'83	8'50	-4'62	10'81	
7	Powerade + 160	86'13	-20'32	-20'18	28'64	224'79	1'25	3'76	-9'67	10'45	
8	Powerade + 210	83'04	-23'92	-24'51	34'25	225'69	-1'83	0'15	-14'00	14'12	
9	Powerade + 260	80'20	-26'87	-28'25	38'98	226'43	4'68	-2'79	-17'74	18'56	
10	Powerade + 310	77'61	-29'14	-31'47	42'89	227'19	-7'27	-5'06	-20'96	22'76	

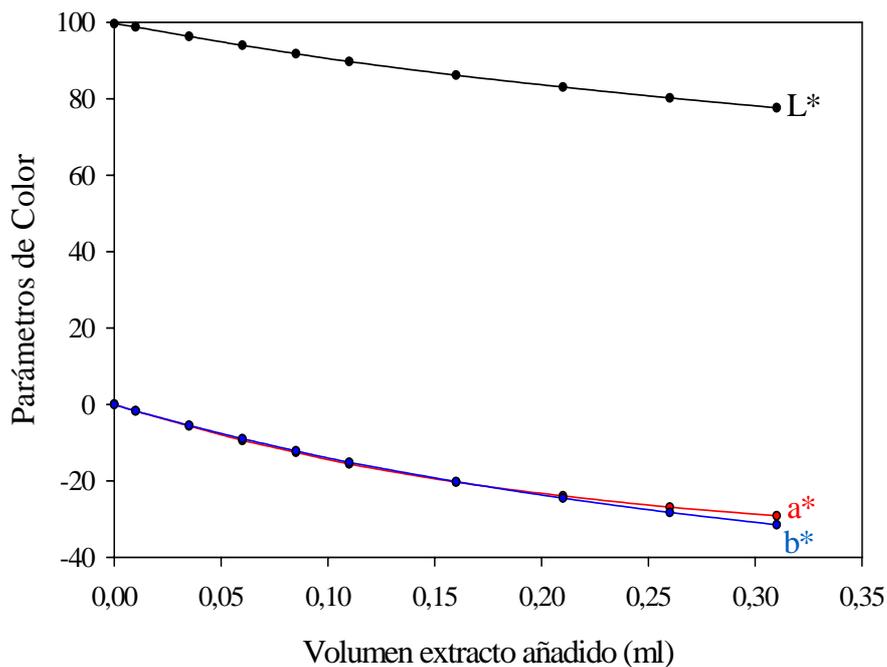


Figura 4.97

Variación de los parámetros del color en función del volumen de extracto de ficocianinas de *Anabaena marina* adicionado sobre bebidas isotónicas.

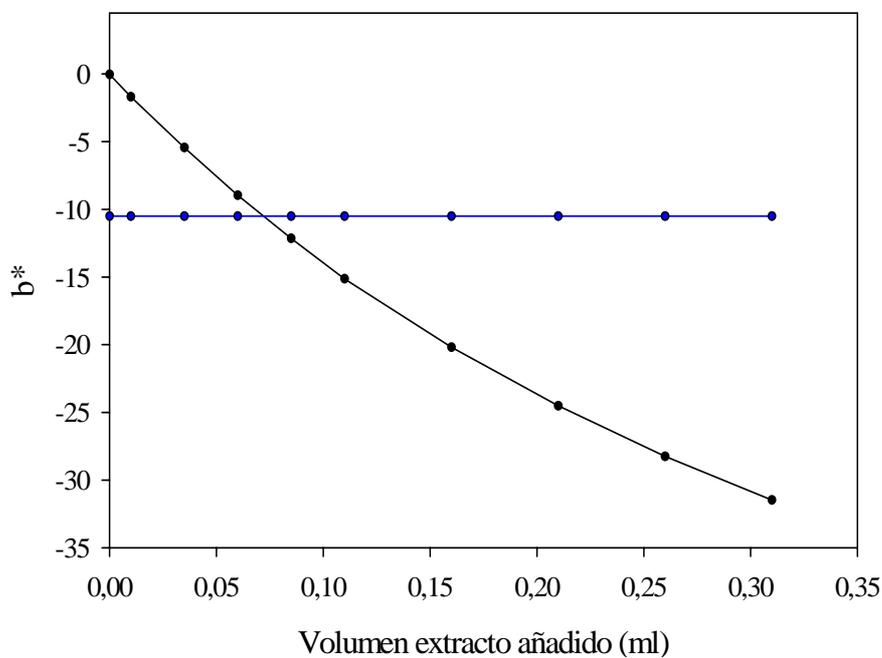


Figura 4.98

Variación del parámetro b^* en función del volumen de extracto de *Anabaena marina* añadido sobre bebida isotónica (—) y valor del parámetro b^* del producto comercial Powerade azul (—).

Es importante resaltar que el color no está configurado por sólo una coordenada cromática, sino que es el conjunto de los tres parámetros (L*a*b*). Para cuantificar la desviación del color obtenido respecto al de los productos comerciales, se utiliza comúnmente el parámetro ΔE^*_{ab} (Ecuación 4.4) (Figura 4.99).

$$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad \text{Ecuación 4.4}$$

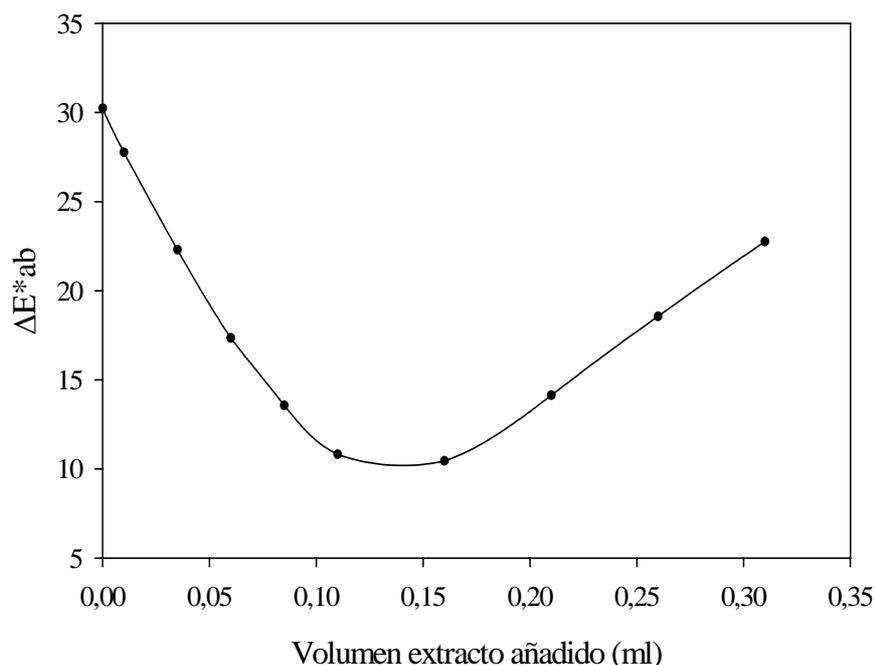


Figura 4.99

Desviación de los parámetros del color (ΔE^*_{ab}) respecto al producto comercial Powerade azul en función del volumen de extracto de *Anabaena marina* añadido sobre bebidas isotónicas.

Como se aprecia en la Figura 4.99, no se llega a conseguir reproducir totalmente el color del producto comercial con la adición de extracto de ficocianinas de *Anabaena marina* a la matriz de isotónica, alcanzándose un valor de ΔE^*_{ab} mínimo, de aproximadamente un 9% cuando se han añadido aproximadamente 0,1 ml del extracto de ficocianinas. Un criterio bastante utilizado, consiste en corroborar que se ha conseguido reproducir un color, cuando la diferencia de color representada por el parámetro ΔE^*_{ab} , es menor o igual al 5%. En este caso, el valor mínimo obtenido es algo superior (9%), pero se consigue una bebida isotónica con un color bastante similar al del producto comercial (Imagen 4.18).



Imagen 4.18

Detalle de la coloración obtenida por adición del extracto de ficocianinas de *Anabaena marina* sobre la matriz de bebida isotónica para intentar reproducir el Powerade azul.

Extracto de *Spirulina platensis*.

Los resultados obtenidos coloreando la matriz de isotónica con extracto de ficocianinas procedente de *Spirulina platensis* se muestran en la Tabla 4.71 y en las Figuras 4.100, 4.101 y 4.102.

Tabla 4.71

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de bebidas isotónicas adicionadas con el extracto de *Spirulina platensis*.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)									
		L*	a*	b*	C*	h	ΔL*	Δa*	Δb*	ΔE*ab	
ESTÁNDAR	Powerade azul	84'89	-23'85	-10'33	25'99	203'40	0	0	0	0	
1	Powerade + 0	99'90	0'063	0'006	0'063	5'774	15'01	23'91	10'33	30'07	
2	Powerade + 10	98'97	-1'42	-1'32	1'94	222'82	14'07	22'42	9'00	27'96	
3	Powerade + 35	96'87	-4'74	-4'28	6'39	222'11	11'97	19'11	6'04	23'34	
4	Powerade + 60	95'01	-7'58	-6'78	10'17	221'84	10'11	16'27	3'53	19'48	
5	Powerade + 85	93'26	-10'13	-9'05	13'59	221'77	8'36	13'72	1'27	16'11	
6	Powerade + 110	91'59	-12'38	-11'06	16'60	221'77	6'69	11'47	-0'73	13'30	
7	Powerade + 160	88'25	-16'92	-14'99	22'60	221'56	3'35	6'93	-4'67	9'01	
8	Powerade + 210	85'21	-20'76	-18'66	27'91	221'95	0'32	3'09	-8'33	8'89	
9	Powerade + 260	82'31	-24'32	-21'91	32'74	222'01	-2'57	-0'46	-11'58	11'88	
10	Powerade + 310	79'67	-27'04	-24'66	36'60	222'36	-5'21	-3'19	-14'33	15'58	

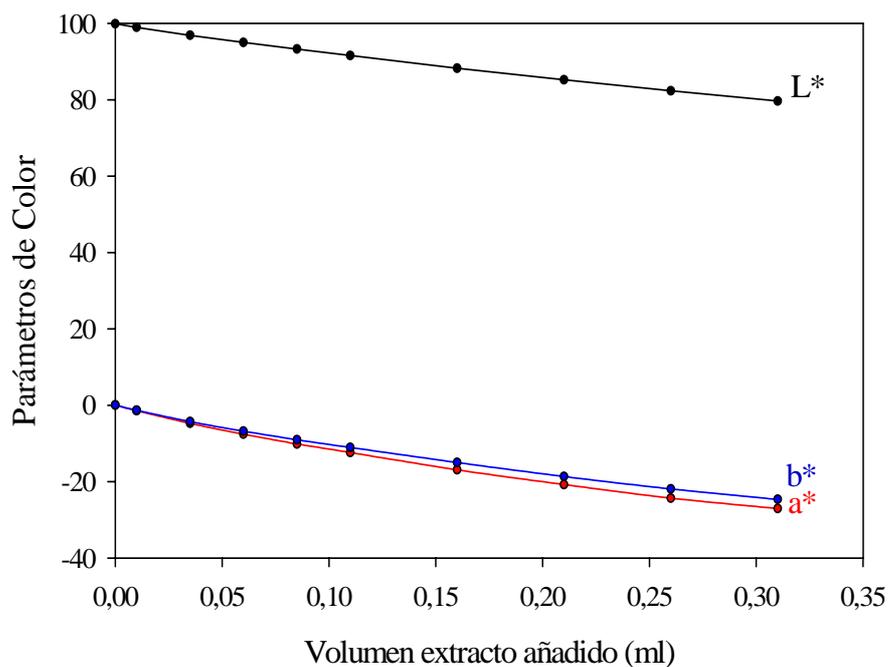


Figura 4.100

Variación de los parámetros del color en función del volumen de extracto de *Spirulina platensis* añadido sobre bebida isotónica.

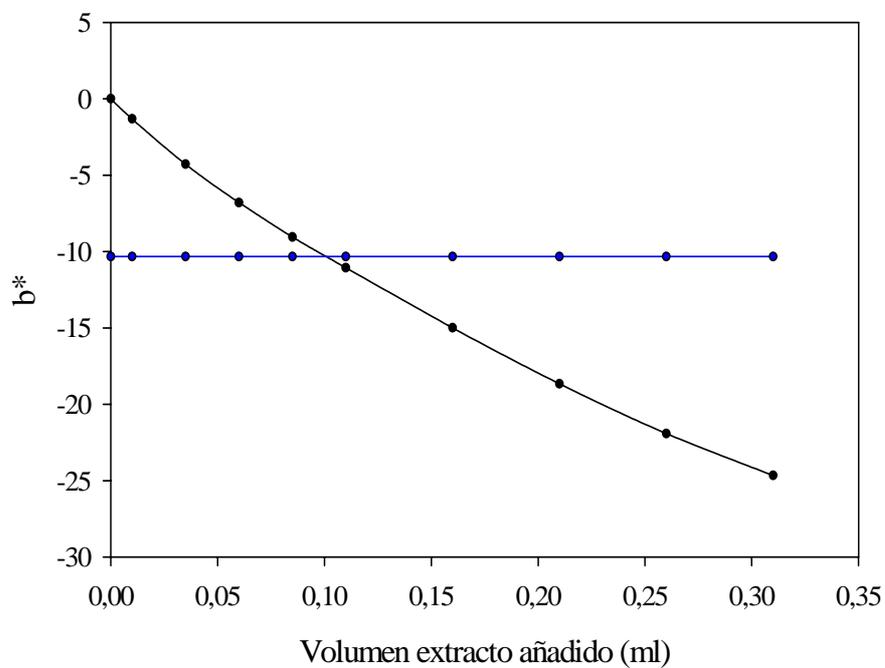


Figura 4.101

Variación del parámetro b^* en función del volumen de extracto de *Spirulina platensis* añadido sobre bebida isotónica (—) y valor del parámetro b^* del producto comercial Powerade azul (—).

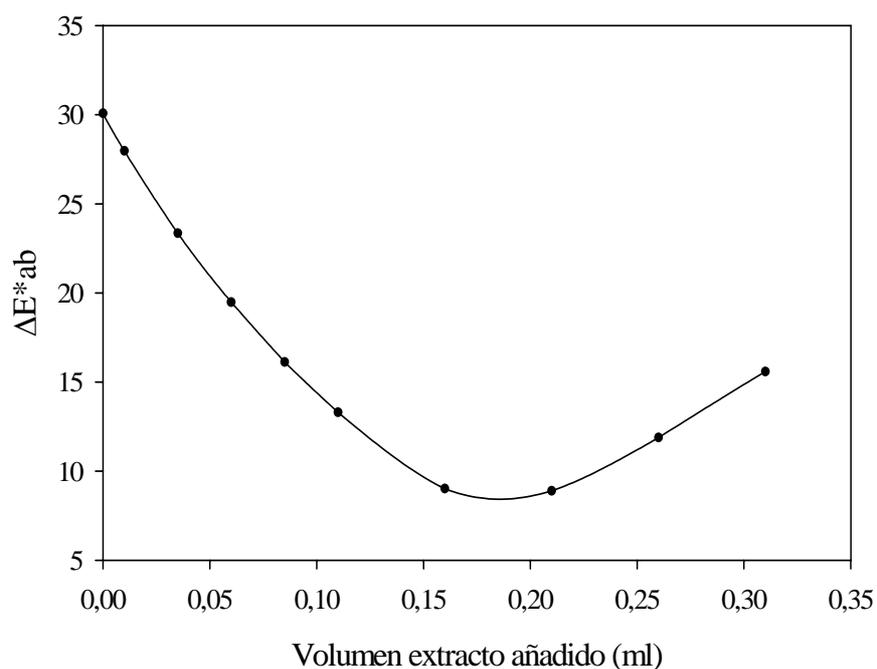


Figura 4.102

Desviación de los parámetros del color respecto al producto comercial Powerade azul en función del volumen de extracto de *Spirulina platensis* añadido sobre bebidas isotónicas.

Extracto de *Synechocystis aquatilis*.

Análogamente, la Tabla 4.72 y las Figuras 4.103, 4.104 y 4.105 muestran los resultados obtenidos coloreando la matriz de bebida isotónica con extracto de ficocianinas procedente de *Synechocystis aquatilis*.

Tabla 4.72

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de bebidas isotónicas adicionadas con el extracto de *Synechocystis aquatilis*.

Muestra n°	Nombre	Volumen		L*	a*	b*	C*	h	AL*	Aa*	Ab*	AE*ab
		Adicionado (ml)										
ESTÁNDAR	Powerade azul			85'01	-23'89	-10'39	26'06	203'51	0	0	0	0
1	Powerade + 0	0		99'80	-0'014	-0'046	0'048	252'57	14'79	23'88	10'35	29'94
2	Powerade + 10	0'01		98'55	-2'22	-2'04	3'023	222'60	13'54	21'67	8'35	26'88
3	Powerade + 35	0'035		95'66	-7'13	-6'56	9'69	222'64	10'65	16'76	3'83	20'23
4	Powerade + 60	0'06		93'38	-10'72	-10'13	14'75	223'36	8'36	13'17	0'266	15'60
5	Powerade + 85	0'085		91'03	-14'61	-13'76	20'07	223'28	6'01	9'28	-3'36	11'56
6	Powerade + 110	0'11		88'90	-17'74	-17'01	24'58	223'80	3'89	6'15	-6'62	9'841
7	Powerade + 160	0'16		85'15	-22'74	-22'65	32'10	224'89	0'14	1'15	-12'26	12'31
8	Powerade + 210	0'21		81'92	-26'45	-27'48	38'14	226'09	-3'08	-2'55	-17'08	17'54
9	Powerade + 260	0'26		79'10	-29'15	-31'47	42'90	227'18	-5'90	-5'25	-21'07	22'51
10	Powerade + 310	0'31		76'63	-31'15	-34'91	46'79	228'26	-8'37	-7'25	-24'52	26'90

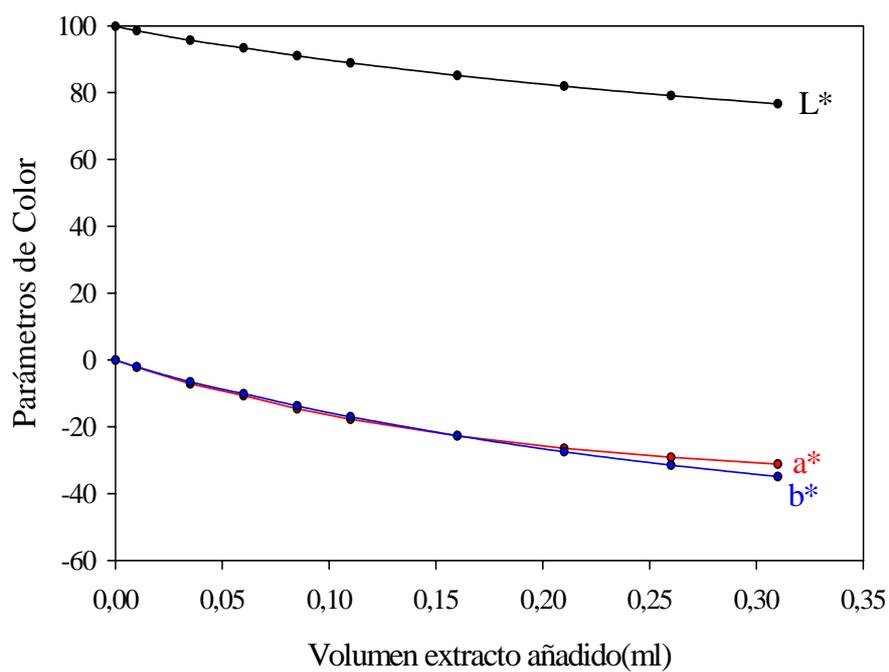


Figura 4.103

Variación de los parámetros del color en función del volumen de extracto de *Synechocystis aquatilis* añadido sobre bebida isotónica.

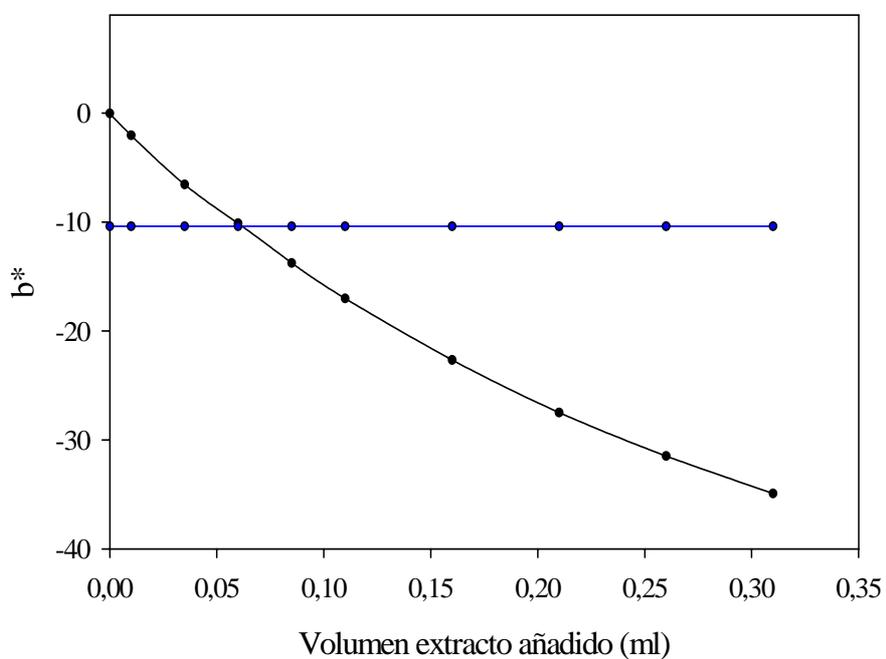


Figura 4.104

Variación del parámetro b^* en función del volumen de extracto de *Synechocystis aquatilis* añadido sobre bebida isotónica (—) y valor del parámetro b^* del producto comercial Powerade azul (—).

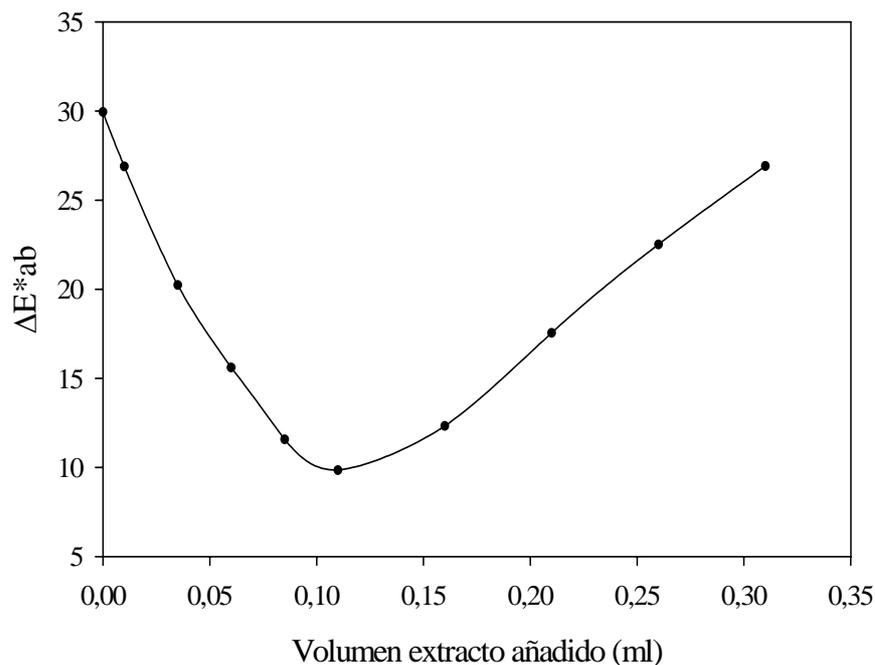


Figura 4.105

Desviación de los parámetros del color respecto al producto comercial Powerade azul en función del volumen de extracto de *Synechocystis aquatilis* añadido sobre bebidas isotónicas.

En términos generales se observa como para los tres extractos ensayados, tanto el parámetro a^* como el b^* descienden al aumentar el volumen de extracto añadido, al igual que desciende el parámetro L^* . Dado que tanto a^* como b^* representan el color de la muestra, y ya que b^* es la coordenada relacionada con la variación del verde al azul, se ha utilizado esta coordenada b^* como variable de comparación. Así, los tres extractos muestran como el parámetro b^* disminuye de forma casi lineal con el volumen de extracto añadido, sin que se observe efecto de saturación. Ello significa que la cantidad de biliproteína requerida para saturar el color en esta coordenada b^* es muy elevada. En cuanto al producto comercial utilizado y para los tres extractos colorantes ensayados, se aprecia que es necesario un volumen cercano a 0'07 ml para alcanzar el valor de b^* de dicho producto. En cualquier caso, la desviación del color respecto al producto comercial es elevada, siendo el valor de ΔE^*_{ab} mínimo de 9, alcanzado utilizando el extracto procedente de *Spirulina platensis* (Imagen 4.19)

Es importante resaltar que aunque no se consigue reproducir exactamente el color del producto comercial, el color conseguido al adicionar los extractos de ficocianinas a la matriz de bebida isotónica, se puede considerar aceptable y/o atractivo para el consumidor.



Imagen 4.19

Detalle del color alcanzado por adición de extracto de ficocianinas procedente de *Spirulina platensis*, para intentar reproducir el producto comercial Powerade azul.

4.4.2.1.2.- Licores sin alcohol.

A continuación se muestran los resultados obtenidos añadiendo extractos de ficocianinas sobre matrices de licores sin alcohol. Se han utilizado dos productos comerciales (Dama de Baza y Blue Tropic de Rives) y se ha tratado de reproducir su color usando como matriz a la que hay que ir adicionando los diferentes extractos de ficocianinas, licor de manzana, que no presenta color.

Extracto de *Anabaena marina*.

Los resultados obtenidos utilizando extracto de ficocianinas de *Anabaena marina* se muestran en la Tabla 4.73 y en las Figuras 4.106 y 4.107 (Imagen 4.20).

Tabla 4.73

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de licores sin alcohol adicionadas con el extracto de *Anabaena marina*.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL*	Δa*	Δb*	ΔE*ab
ESTÁNDAR	Dama de Baza		50°79	-31°56	-5°02	31°95	189°04				
1	Blue Tropic Rives		65°45	-16°40	2°58	16°61	171°06	0	0	0	0
2	Licor manzana + 0	0'00	99°96	-0°081	0°23	0°24	109°51	34°50	16°32	-2°35	38°24
3	Licor manzana + 10	0'01	99°44	-0°89	-0°40	0°98	204°39	33°98	15°51	-2°98	37°47
4	Licor manzana + 35	0'04	98°32	-2°91	-1°78	3°41	211°46	32°86	13°49	-4°36	35°79
5	Licor manzana + 60	0'06	97°25	-4°79	-3°10	5°71	212°87	31°79	11°61	-5°68	34°32
6	Licor manzana + 85	0'09	96°40	-6°39	-3°94	7°51	211°65	30°94	10°01	-6°52	33°17
7	Licor manzana + 110	0'11	95°36	-8°11	-5°12	9°60	212°26	29°90	8°29	-7°70	31°97
8	Licor manzana + 160	0'16	93°42	-11°41	-7°46	13°63	213°17	27°96	4°99	-10°04	30°12
9	Licor manzana + 210	0'21	91°57	-14°48	-9°45	17°29	213°13	26°11	1°92	-12°03	28°81
10	Licor manzana + 260	0'26	89°89	-17°21	-11°28	20°58	213°25	24°44	-0°80	-13°86	28°11
11	Licor manzana + 310	0'31	88°42	-19°64	-12°64	23°36	212°76	22°96	-3°23	-15°22	27°74
12	Licor manzana + 500	0'50	82°53	-28°58	-19°27	34°47	213°98	17°07	-12°17	-21°85	30°28
13	Licor manzana + 800	0'80	75°66	-37°27	-25°94	45°42	214°82	10°20	-20°86	-28°53	36°79
14	Licor manzana + 1100	1'10	70°63	-42°27	-29°99	51°83	215°35	5°17	-25°86	-32°57	41°91

Nota: En la Tabla aparecen, a título de ejemplo, los parámetros colorimétricos de variación (ΔL*, Δa*, Δb*, ΔE*ab), con respecto al producto comercial Blue Tropic.

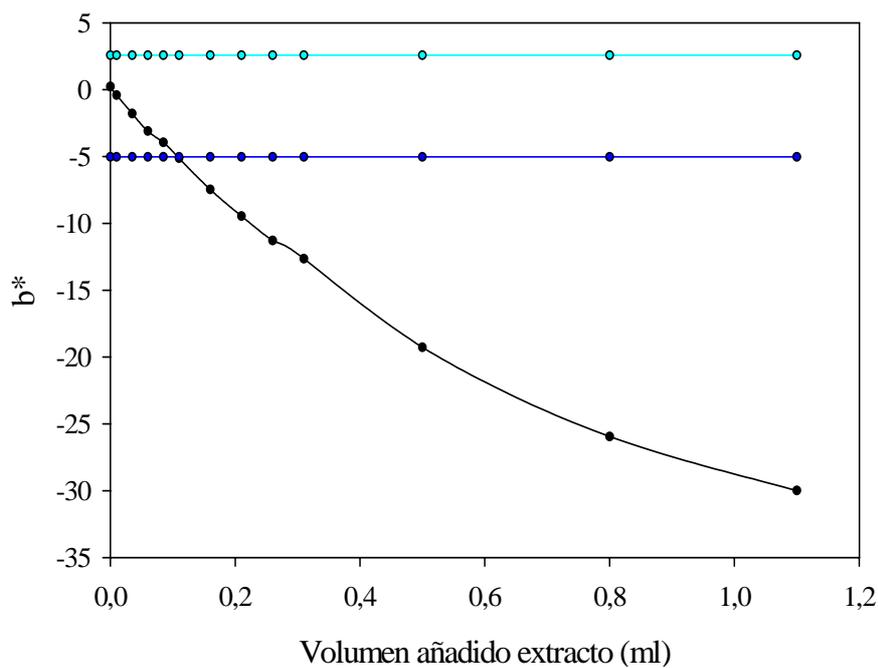


Figura 4.106

Variación del parámetro b^* en función del volumen de extracto de *Anabaena marina* añadido sobre matriz de licor sin alcohol (—) y parámetro b^* de los licores sin alcohol Dama de Baza (—) y Blue Tropic de Rives (—).

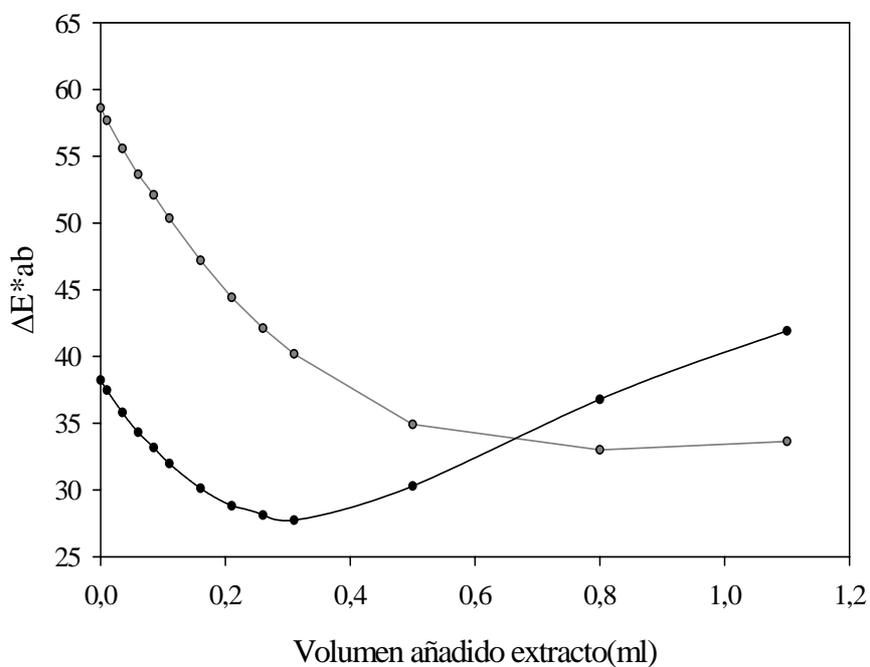


Figura 4.107

Desviación de los parámetros del color respecto al de los licores de marcas Dama de Baza (—) y Blue Tropic de Rives (—) en función del volumen de extracto de *Anabaena marina* añadido sobre matriz de licor sin alcohol.

Extracto de *Spirulina platensis*.

La Tabla 4.74 y las Figuras 4.108 y 4.109 muestran los resultados obtenidos al añadir extracto de ficocianinas de *Spirulina platensis* a una matriz de licor sin alcohol (Imagen 4.20).

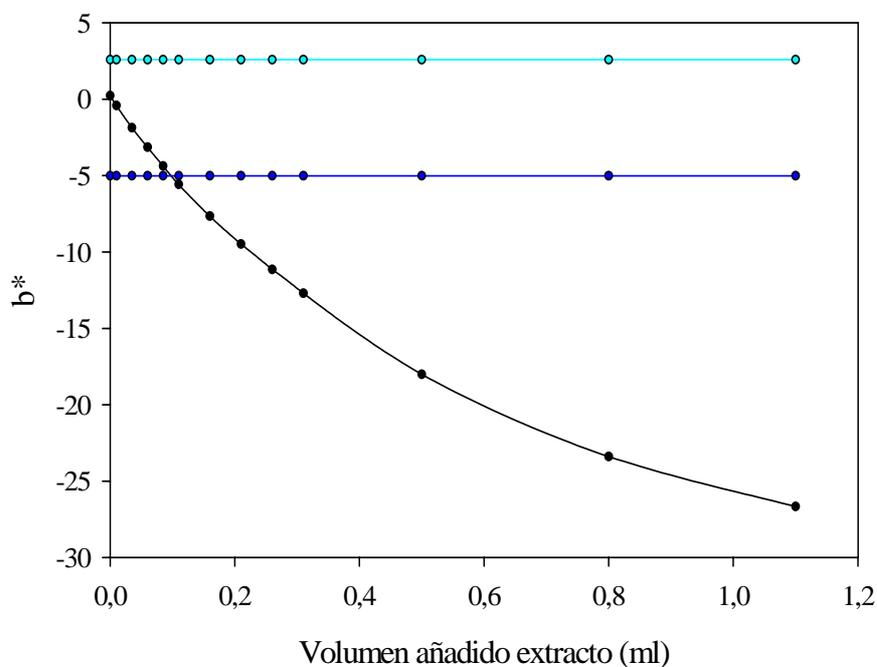


Figura 4.108

Variación del parámetro b^* en función del volumen de extracto de *Spirulina platensis* añadido sobre matriz de licor sin alcohol (—) y parámetro b^* de los licores sin alcohol Dama de Baza (—) y Blue Tropic de Rives (—).

Tabla 4.74

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de licores sin alcohol adicionadas con el extracto de *Spirulina platensis*.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*_{ab}
ESTÁNDAR	Dama de Baza		50'79	-31'56	-5'025	31'95	189'04				
1	Blue Tropic Rives		65'45	-16'40	2'581	16'61	171'06	0	0	0	0
2	Licor manzana + 0	0	99'96	-0'0817	0'230	0'244	109'51	34'50	16'32	-2'35	38'24
3	Licor manzana + 10	0'01	99'44	-0'984	-0'416	1'069	202'92	33'99	15'42	-2'99	37'44
4	Licor manzana + 35	0'035	98'25	-3'086	-1'867	3'606	211'17	32'79	13'32	-4'44	35'67
5	Licor manzana + 60	0'06	97'15	-4'997	-3'154	5'902	212'26	31'69	11'41	-5'73	34'17
6	Licor manzana + 85	0'085	96'08	-6'877	-4'384	8'155	212'51	30'62	9'53	-6'96	32'82
7	Licor manzana + 110	0'11	95'00	-8'719	-5'587	10'35	212'65	29'54	7'69	-8'16	31'60
8	Licor manzana + 160	0'16	93'08	-11'86	-7'664	14'12	212'86	27'62	4'54	-10'24	29'85
9	Licor manzana + 210	0'21	91'30	-14'69	-9'481	17'48	212'83	25'84	1'719	-12'06	28'57
10	Licor manzana + 260	0'26	89'62	-17'37	-11'14	20'64	212'67	24'16	-0'969	-13'72	27'81
11	Licor manzana + 310	0'31	88'05	-19'83	-12'70	23'55	212'66	22'59	-3'423	-15'28	27'49
12	Licor manzana + 500	0'5	82'51	-27'92	-18'01	33'23	212'82	17'05	-11'51	-20'59	29'11
13	Licor manzana + 800	0'8	75'71	-36'42	-23'39	43'28	212'71	10'26	-20'01	-25'97	34'35
14	Licor manzana + 1100	1'1	70'22	-41'72	-26'65	49'51	212'57	4'766	-25'31	-29'24	38'96

Nota: En la Tabla aparecen, a título de ejemplo, los parámetros colorimétricos de variación (ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE^*_{ab}), con respecto al producto comercial Blue Tropic.

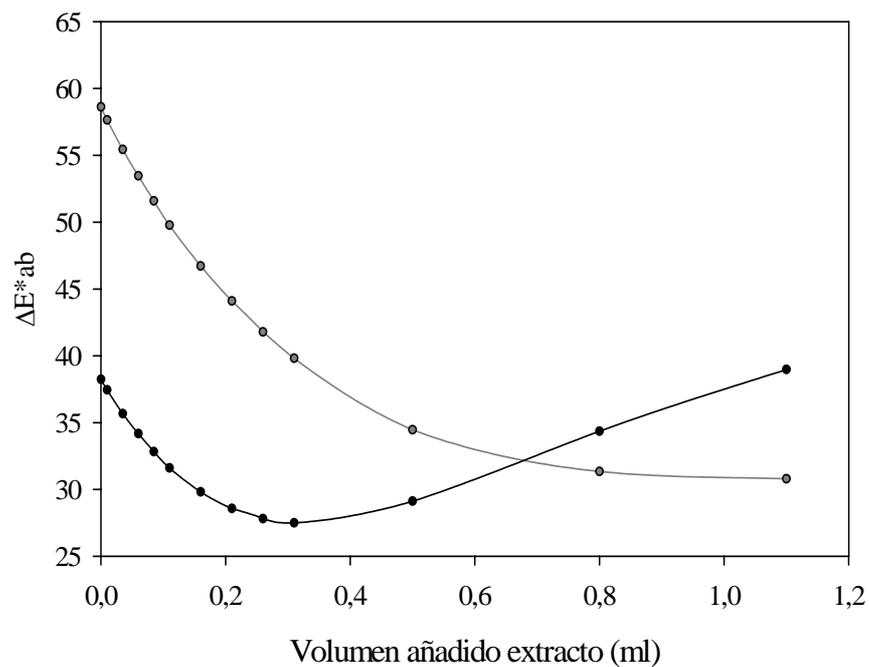


Figura 4.109

Desviación de los parámetros del color respecto al de los licores Dama de Baza (—○—) y Blue Tropic de Rives (—●—) en función del volumen de extracto de *Spirulina platensis* añadido sobre matriz de licor sin alcohol.

Extracto de *Synechocystis aquatilis*.

Los resultados obtenidos utilizando extracto de ficocianinas de *Synechocystis aquatilis* para teñir una matriz de licor sin alcohol se muestran en la Tabla 4.75 y en las Figuras 4.110 y 4.111 (Imagen 4.20).

Tabla 4.75

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de licores sin alcohol adicionadas con el extracto de *Synechocystis aquatilis*.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*ab
ESTÁNDAR	Dama de Baza		50'79	-31'56	-5'021	31'95	189'04				
1	Blue Tropic Rives		65'45	-16'40	2'581	16'61	171'06	0	0	0	0
2	Licor manzana + 0	0	99'96	-0'081	0'2303	0'244	109'51	34'50	16'32	-2'35	38'24
3	Licor manzana + 10	0'01	99'31	-1'173	-0'580	1'309	206'32	33'85	15'236	-3'16	37'26
4	Licor manzana + 35	0'035	97'82	-4'048	-2'772	4'906	214'39	32'36	12'361	-5'35	35'05
5	Licor manzana + 60	0'06	96'52	-6'451	-4'501	7'866	214'90	31'06	9'957	-7'08	33'38
6	Licor manzana + 85	0'085	95'34	-8'737	-6'116	10'66	214'99	29'88	7'671	-8'69	32'05
7	Licor manzana + 110	0'11	94'18	-10'89	-7'522	13'24	214'63	28'73	5'512	-10'10	30'95
8	Licor manzana + 160	0'16	91'85	-15'11	-10'61	18'46	215'08	26'39	1'297	-13'19	29'53
9	Licor manzana + 210	0'21	89'64	-19'01	-13'58	23'37	215'54	24'19	-2'606	-16'16	29'21
10	Licor manzana + 260	0'26	87'68	-22'37	-16'07	27'54	215'69	22'22	-5'9636	-18'65	29'62
11	Licor manzana + 310	0'31	85'95	-25'37	-18'06	31'14	215'44	20'49	-8'964	-20'64	30'44
12	Licor manzana + 500	0'5	79'37	-34'80	-26'40	43'68	217'18	13'91	-18'394	-28'98	37'04
13	Licor manzana + 800	0'8	72'05	-42'08	-34'64	54'51	219'46	6'59	-25'67	-37'22	45'70
14	Licor manzana + 1100	1'1	66'70	-44'44	-39'86	59'70	221'85	1'24	-28'03	-42'44	50'88

Nota: En la Tabla aparecen, a título de ejemplo, los parámetros colorimétricos de variación (ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE^*ab), con respecto al producto comercial Blue Tropic.

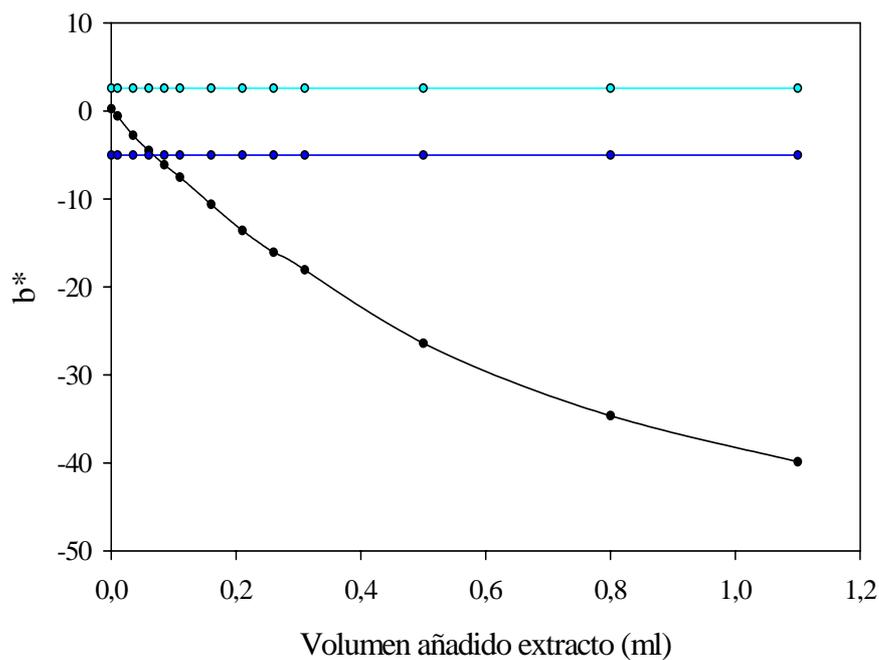


Figura 4.110

Variación del parámetro b^* en función del volumen de extracto de *Synechocystis aquatilis* añadido sobre matriz de licor sin alcohol (—) y parámetro b^* de los licores sin alcohol Dama de Baza (—) y Blue Tropic de Rives (—).

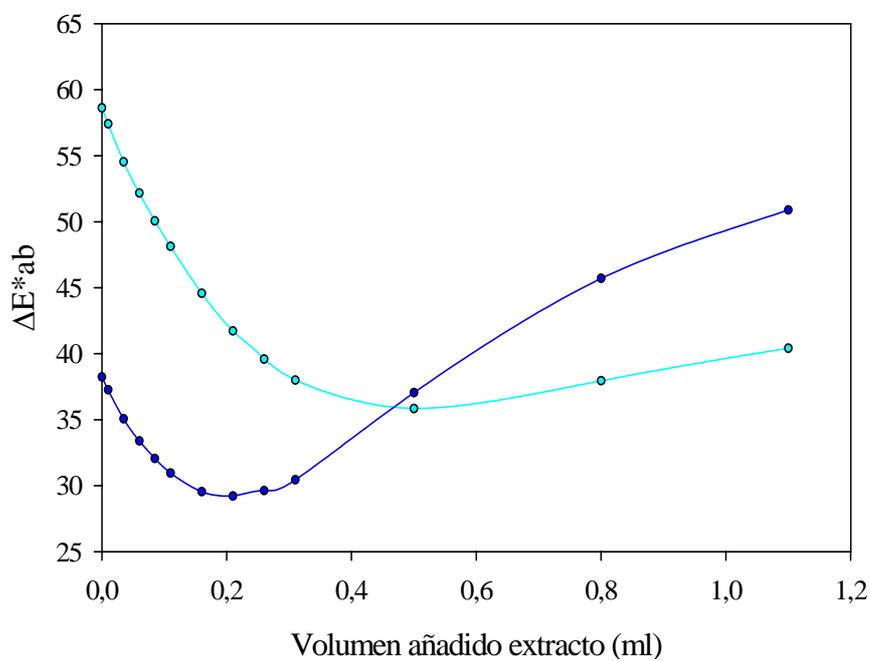


Figura 4.111

Desviación de los parámetros del color respecto al de los licores Dama de Baza (—) y Blue Tropic de Rives (—) en función del volumen de extracto de *Synechocystis aquatilis* añadido sobre matriz de licor sin alcohol.

En los ensayos con licores, el volumen de extracto para aproximar al valor de b^* del producto comercial es también cercano a 0'1 ml, si bien sólo es posible aproximar a uno de los productos comerciales (Dama de Baza), ya que el otro producto (Blue Tropic) presenta valores de b^* (2'58) inalcanzables partiendo de la matriz blanco utilizada. De cualquier forma, en el caso de licores, el valor de ΔE^*_{ab} determinado respecto a los productos comerciales es más elevado que en el caso de bebidas isotónicas, alcanzando valores mínimos de 28. Esto pone de manifiesto la dificultad de alcanzar un color análogo al producto comercial en el caso de licores.



Imagen 4.20

Detalle de los colores alcanzados por adición de extractos de ficocianinas procedente de *Anabaena marina*, *Spirulina platensis* y *Synechocystis aquatilis*, para intentar reproducir los productos comerciales de licores sin alcohol azules.

4.4.2.1.3.- Helados.

A continuación se muestran los resultados obtenidos con helado como matriz. En este caso, se ha utilizado helado de nata de la marca Nestlé como matriz y se ha tratado de conseguir un producto de color azul atractivo para el consumidor adicionando los diferentes extractos de ficocianinas. En estos ensayos no se ha podido comparar el producto obtenido con ningún producto comercial, debido a la dificultad de encontrar helado azul en el mercado. Por esto, las Tablas correspondientes a las caracterizaciones colorimétricas de este apartado, no presentan valores de ΔL^* , Δa^* , Δb^* y ΔE^*_{ab} .

Extracto de *Anabaena marina*.

La Tabla 4.76 y la Figura 4.112 muestran los resultados obtenidos utilizando extracto de ficocianinas procedente de *Anabaena marina*, para los ensayos de coloración de una matriz de helado de nata.

Como cabe esperar, la variación de color no es lineal, como ocurría con las bebidas isotónicas y licores, de forma que inicialmente pequeñas adiciones de extracto modifican el color de forma notable, mientras que cuando el color se aproxima al del extracto puro las variaciones de color disminuyen.

Tabla 4.76

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de helados adicionadas con el extracto de *Anabaena marina*.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h
ESTÁNDAR	Estándar Helado nata Nestlé	0'00	25'26	2'27	37'32	37'39	86'50
1	Helado Anabaena + 10	0'01	21'98	-2'20	31'56	31'64	93'98
2	Helado Anabaena + 35	0'04	16'50	-9'31	22'34	24'20	112'61
3	Helado Anabaena + 85	0'09	8'23	-11'75	10'38	15'68	138'55
4	Helado Anabaena + 185	0'19	3'84	-6'867	3'441	7'681	153'38
5	Helado Anabaena + 285	0'29	2'32	-3'976	1'358	4'203	161'13
6	Helado Anabaena + 485	0'49	1'20	-1'503	0'048	1'509	178'15
7	Helado Anabaena + 685	0'69	0'79	-0'600	-0'197	0'633	198'21
8	Helado Anabaena + 900	0'90	0'55	-0'086	-0'294	0'309	253'66
9	Helado Anabaena + 1150	1'15	0'40	0'150	-0'284	0'321	297'93
10	Helado Anabaena + 1500	1'50	0'28	0'295	-0'165	0'338	330'80
11	Helado Anabaena + 2000	2'00	0'20	0'299	-0'060	0'305	348'63

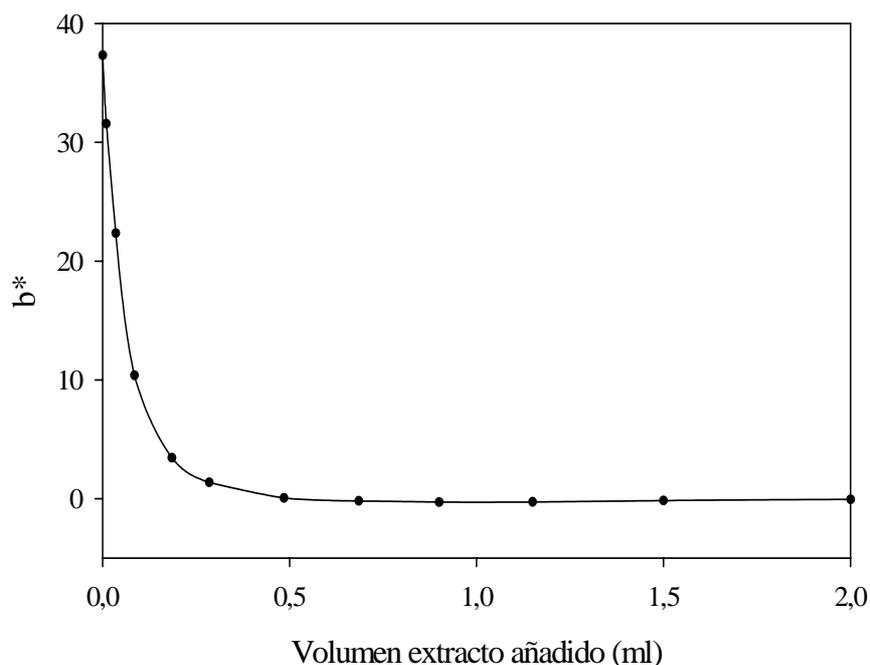


Figura 4.112

Variación del parámetro b^* en función del volumen de extracto de *Anabaena marina* añadido sobre matriz de helado.

Extracto de *Spirulina platensis*.

Análogamente, utilizando el extracto de ficocianinas procedente de la microalga *Spirulina platensis* para los ensayos de coloración de una matriz de helado de nata, se han obtenido los resultados que se muestran en la Tabla 4.77 y en la Figura 4.113.

Tabla 4.77

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de helados adicionadas con el extracto de *Spirulina platensis*.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h
ESTÁNDAR	Estándar Helado de nata	0	25'98	2'080	37'61	37'67	86'83
1	Helado Spirulina + 10	0'01	18'22	-1'707	27'68	27'73	93'53
2	Helado Spirulina + 35	0'035	13'30	-8'045	19'22	20'83	112'71
3	Helado Spirulina + 85	0'085	7'495	-10'79	9'62	14'45	138'28
4	Helado Spirulina + 185	0'185	3'255	-6'291	3'031	6'983	154'27
5	Helado Spirulina + 285	0'285	1'890	-3'748	1'101	3'906	163'61
6	Helado Spirulina + 485	0'485	0'882	-1'568	0'037	1'568	178'61
7	Helado Spirulina + 685	0'685	0'499	-0'661	-0'216	0'695	198'12
8	Helado Spirulina + 900	0'9	0'351	-0'376	-0'194	0'423	207'33
9	Helado Spirulina + 1150	1'15	0'231	-0'165	-0'112	0'200	214'17
10	Helado Spirulina + 1500	1'5	0'165	-0'014	-0'134	0'135	263'81
11	Helado Spirulina + 2000	2	0'125	0'043	-0'124	0'132	289'36

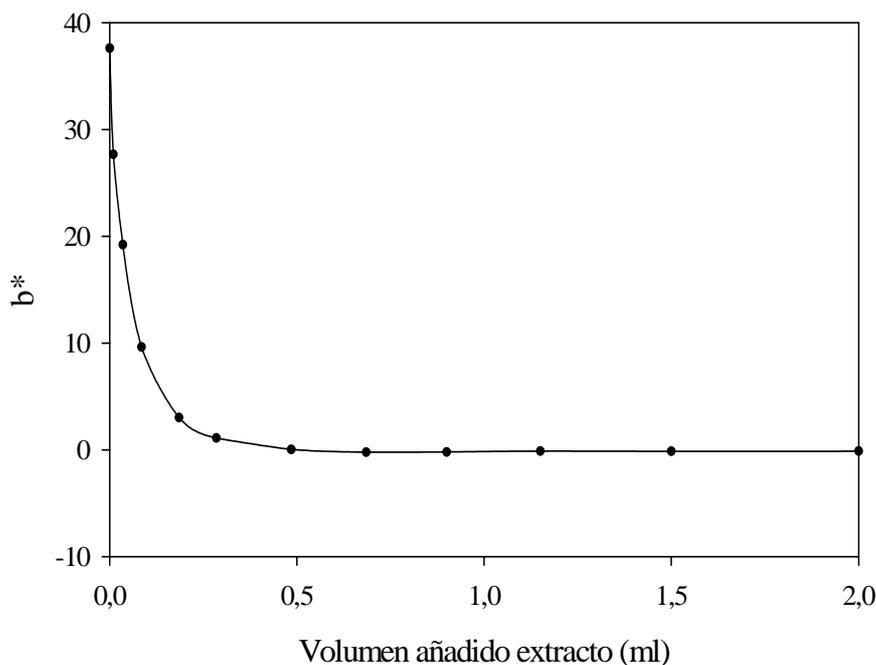


Figura 4.113

Variación del parámetro b^* en función del volumen de extracto de *Spirulina platensis* añadido sobre matriz de helado.

Extracto de *Synechocystis aquatilis*.

La Tabla 4.78 y la Figura 4.114 muestran los resultados obtenidos utilizando extracto enriquecido de ficocianinas procedente de *Synechocystis aquatilis* para colorear matriz de helado.

Tabla 4.78

Parámetros del color de las muestras de helado. Extracto *Synechocystis aquatilis*.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h
ESTÁNDAR	Estándar helado nata nestle	0	25'25	2'285	37'10	37'17	86'47
1	Helado Synechocystis + 10	0'01	19'44	-2'429	28'88	28'98	94'80
2	Helado Synechocystis + 35	0'035	13'52	-9'61	19'11	21'39	116'68
3	Helado Synechocystis + 85	0'085	7'61	-12'167	9'43	15'39	142'21
4	Helado Synechocystis + 185	0'185	3'61	-7'003	3'09	7'65	156'17
5	Helado Synechocystis + 285	0'285	2'29	-4'363	1'106	4'501	165'77
6	Helado Synechocystis + 485	0'485	1'24	-1'906	-0'105	1'909	183'15
7	Helado Synechocystis + 685	0'685	0'84	-0'918	-0'420	1'010	204'61
8	Helado Synechocystis + 900	0'9	0'60	-0'385	-0'508	0'638	232'80
9	Helado Synechocystis + 1150	1'15	0'449	-0'027	-0'521	0'522	266'99
10	Helado Synechocystis + 1500	1'5	0'340	0'102	-0'457	0'468	282'63
11	Helado Synechocystis + 2000	2	0'240	0'236	-0'390	0'456	301'19

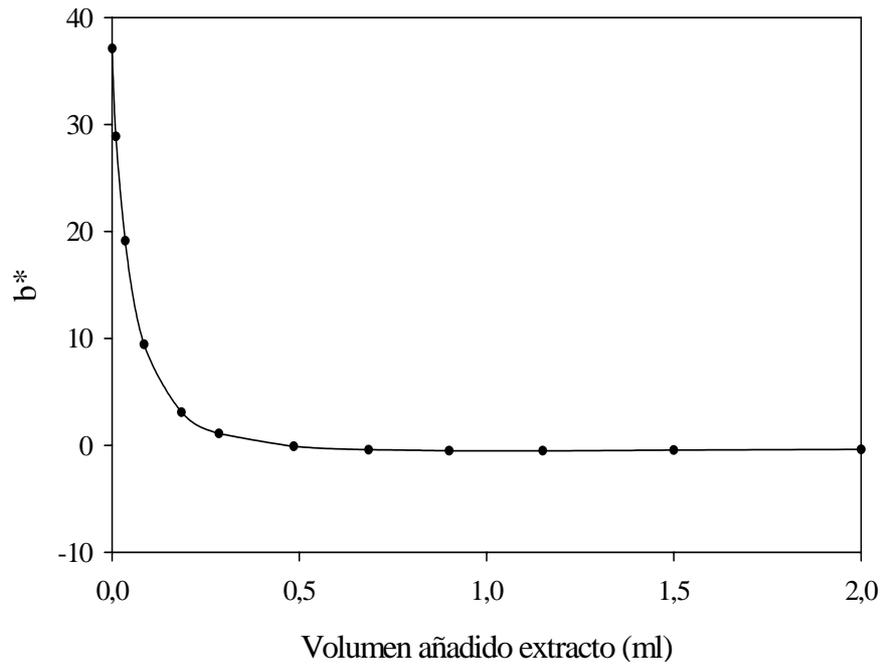


Figura 4.114

Variación del parámetro b^* en función del volumen de extracto de *Synechocystis aquatilis* añadido sobre matriz de helado.

La Imagen 4.21 muestra los productos obtenidos al adicionar sobre la matriz de helado, los diferentes extractos de ficocianinas procedentes de las diferentes microalgas.

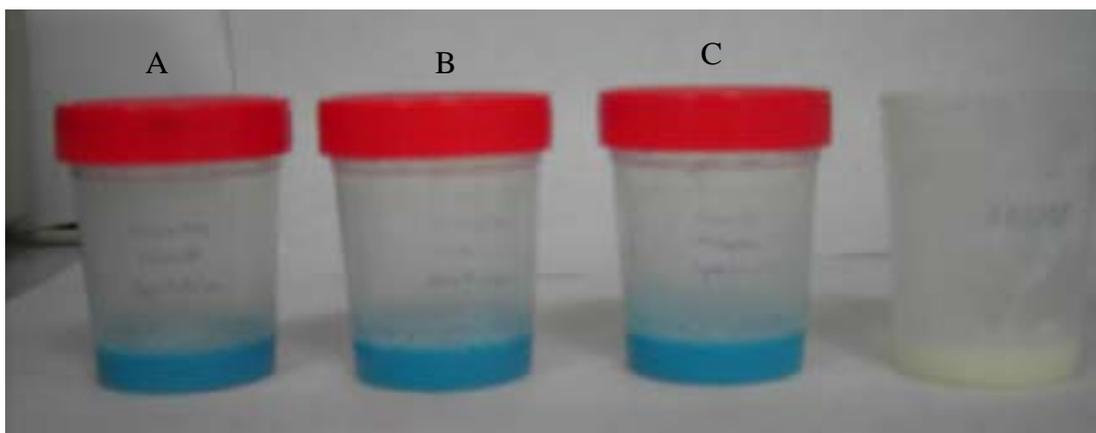


Imagen 4.21

Detalle de los productos obtenidos coloreando matrices de helado de nata con los extractos de ficocianinas procedentes de: A) *Anabaena marina*, B) *Spirulina platensis* y C) *Synechocystis aquatilis*.

En términos generales se puede decir que los resultados obtenidos han demostrado que los extractos concentrados de biliproteínas, producidos mediante cromatografía de adsorción en lecho expandido a partir de diversas microalgas, pueden ser utilizados como colorantes en diferentes matrices reales, generando productos atractivos desde el punto de vista del color. La solubilidad de las biliproteínas en los medios ensayados es buena, modificándose el color de las diversas matrices por adición de pequeñas cantidades de disolución de biliproteínas. Así, la concentración de todos los extractos fue de 6'25 mg/ml, por lo que a partir de los resultados obtenidos, se calcula que son necesarios entre 40 y 120 mg/l de biliproteína para alcanzar valores de los parámetros de control análogos a los de los productos comerciales. La cantidad de biliproteína a añadir depende en primer lugar del color del producto comercial que se quiere alcanzar, ya que como se ha demostrado, productos de similares características presentan colores muy diferentes. Por otro lado, depende de la naturaleza y concentración del extracto, pero sobre todo, es función de la propia matriz, ya que los resultados obtenidos indican que para un mismo extracto, el valor de color alcanzado varía enormemente en función de la matriz utilizada (Figura 4.115).

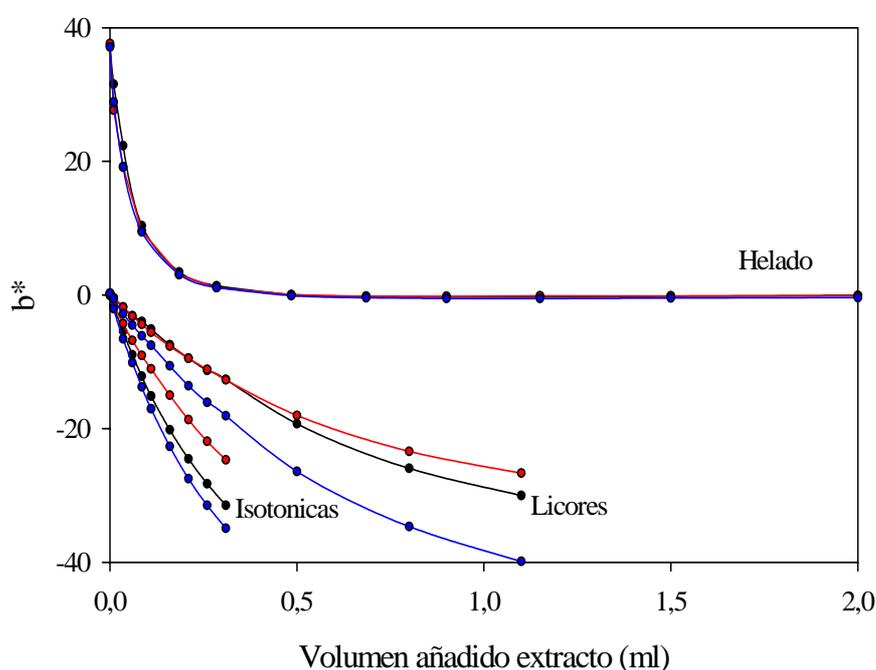


Figura 4.115

Variación del parámetro b^* en función del volumen de extracto de ficocianinas añadido sobre las distintas matrices ensayadas. Extracto de *Anabaena marina* (—), *Spirulina platensis* (—) y *Synechocystis aquatilis* (—).

Los extractos de cianobacterias son ricos en ficocianinas, presentando diferente proporción de C-ficocianina y aloficocianina, por lo que dan lugar a colores diferentes para la misma cantidad de extracto añadida. Los extractos de *Anabaena* y *Synechocystis* son los que presentan un color azul más intenso, con menor valor de b^* , mientras que los extractos de *Spirulina* son los que presentan un color menos azul, con valores de b^* mayores. Respecto a la matriz, las matrices más acuosas permiten alcanzar valores de b^* menores, y por tanto con más aproximación al azul, mientras que el helado muestra una saturación a partir de 0'3 ml de extracto, manteniéndose el valor de b^* próximo a cero de forma constante.

Estos resultados demuestran la importancia, no sólo del agente colorante, sino también de la matriz en el color alcanzado, así como ratifican la posibilidad de utilizar concentrados de biliproteínas de origen microalgal como agentes colorantes naturales en alimentos y bebidas.

4.4.2.2.-**Ensayos de estabilidad.**

Por último, se han llevado a cabo ensayos de estabilidad de color de las diferentes matrices comerciales aditivadas con los diferentes extractos de ficocianinas. En ellos se observa como el color del helado es muy estable para los tres extractos ensayados, produciéndose desviaciones inferiores a 0'4 unidades de ΔE^*_{ab} , mientras que bebidas isotónicas y licores sin alcohol muestran estabilidades menores (Figuras 4.116, 4.117 y 4.118). En estos casos se produce un aumento hiperbólico de la desviación de color con el tiempo que además es distinto para cada extracto ensayado. El extracto de *Synechocystis aquatilis* muestra la mayor estabilidad mientras que el de *Spirulina platensis* muestra la menor, con valores de desviación superiores a 20, a los 20 días. Así, los resultados obtenidos muestran desviaciones de hasta 10 puntos entre los extractos de las diferentes microalgas para el mismo periodo.

De cualquier forma, las desviaciones de color no son solo motivadas por la pérdida de características del colorante, sino también por la desnaturalización de la matriz y oscurecimiento por reacciones de pardeamiento enzimático, ya que se trata de alimentos y bebidas abiertas y conservadas a 4°C. Sólo en el caso del helado, la conservación se realizó bajo cero por lo que la estabilidad fue muy superior para todos los extractos utilizados.

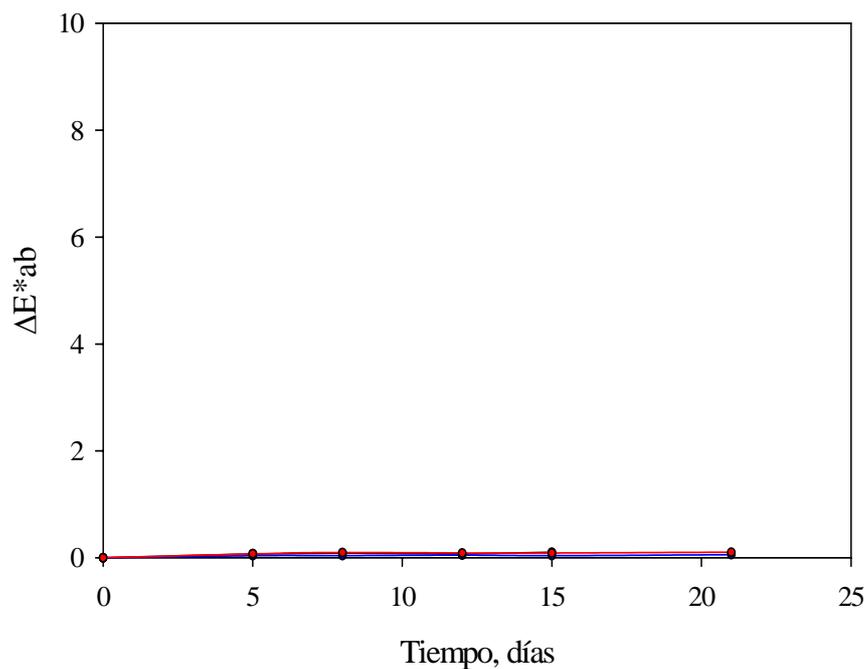


Figura 4.116

Estabilidad del color de las muestras de matriz de helado coloreadas con extractos de ficocianinas de *Anabaena marina* (—), *Spirulina platensis* (—) y *Synechocystis aquatilis* (—) en función del tiempo.

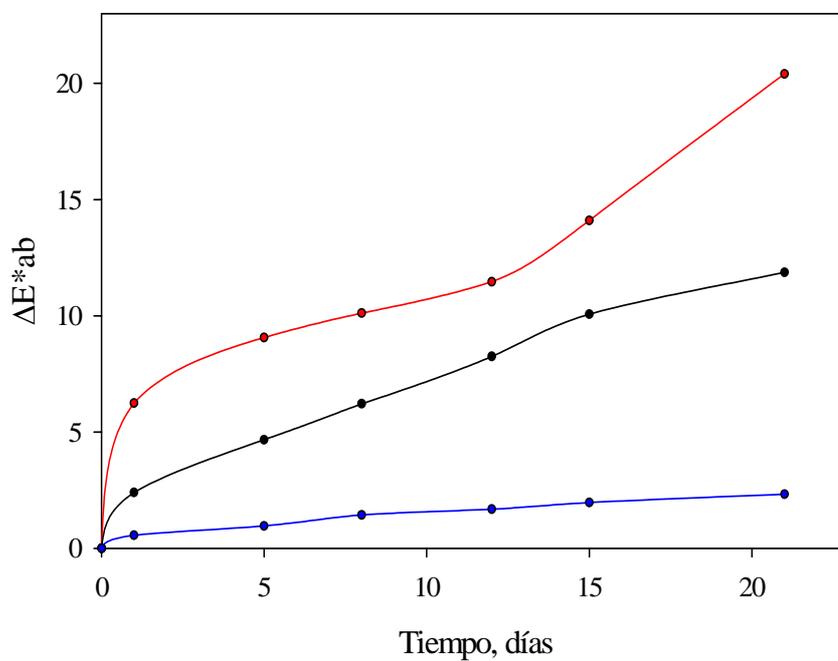


Figura 4.117

Estabilidad del color de las muestras de matriz de bebida isotónica coloreadas con extractos de ficocianinas de *Anabaena marina* (—), *Spirulina platensis* (—) y *Synechocystis aquatilis* (—) en función del tiempo.

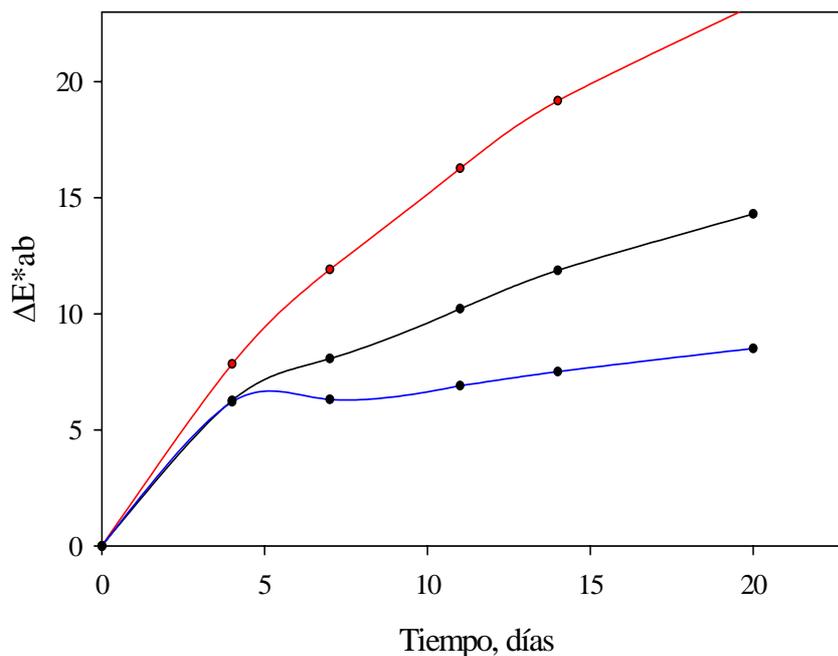


Figura 4.118

Estabilidad del color de las muestras de matriz de licor sin alcohol coloreadas con extractos de ficocianinas de *Anabaena marina* (—), *Spirulina platensis* (—) y *Synechocystis aquatilis* (—) en función del tiempo.

4.4.2.3.-Factores de tinción.

Una vez comprobada la utilidad de los diferentes extractos de ficocianinas como colorantes, se han calculado los factores de tinción necesarios para obtener muestras comerciales atractivas por adiciones de los extractos sobre las matrices reales ensayadas. Así, se han calculado estos factores como la cantidad de ficocianinas, en mg de C-PC por ml de matriz, para lograr alcanzar el mínimo valor posible del parámetro ΔE^*_{ab} (factor de tinción experimental) y como la cantidad necesaria para alcanzar un color atractivo para el consumidor (factor de tinción aceptable).

Hay que resaltar, que los valores del factor de tinción en algunos casos, podrían reducirse considerablemente si se partiera de matrices idénticas a las que conforman el producto comercial, ya que las experiencias de coloración se han realizado partiendo de las matrices más semejantes al producto comercial que existen en el mercado, pero que en algunos casos, como por ejemplo en los licores sin alcohol, diferían en cuanto a su composición y por tanto, ya desde el inicio, se partía de diferentes valores de transparencia

y/o reflectancia, que provocaban que las desviaciones del color fueran mucho mayores, debido a la diferente conjugación de los efectos de transmisión, difusión, absorción y dispersión de la luz.

Tabla 4.79

Factores de tinción para las diferentes matrices ensayadas en función de la procedencia del extracto de C-PC utilizado para teñirla.

MATRIZ	FACTOR DE TINCIÓN	FACTOR DE TINCIÓN
	Experimental (mg C-PC/ml matriz)	Aceptable (mg C-PC/ml matriz)
Isotónica <i>A.marina</i>	0'164	0'058
Isotónica <i>S.Platensis</i>	0'164	0'058
Isotónica <i>S.Aquaticilis</i>	0'11	0'058
Licor <i>A.marina</i>	0'31	0'581
Licor <i>S.Platensis</i>	0'31	0'581
Licor <i>S.Aquaticilis</i>	0'21	0'581
Helado <i>A.marina</i>	-	0'030
Helado <i>S.Platensis</i>	-	0'030
Helado <i>S.Aquaticilis</i>	-	0'030

A la vista de los resultados, puede concluirse que los extractos de ficocianinas procedentes de CALE, podrían considerarse potenciales colorantes para alimentación, cuya utilización sería muy interesante dado el carácter natural de dichas macromoléculas.

5.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos y la discusión realizada, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- 1) Se ha conseguido la puesta a punto de una nueva metodología para la obtención y purificación preparativa de ficocianinas, utilizando un proceso que consta de tres etapas: tratamientos previos, cromatografía de adsorción en lecho expandido y cromatografía en lecho empaquetado o convencional.
- 2) Se ha evaluado el contenido total de biliproteínas en la biomasa microalgal de las especies: *Anabaena marina*, *Spirulina platensis*, *Synechocystis aquatilis* y *Porphyridium cruentum*, siendo éste de 2'26 %, 3'35%, 4'33% y 3'1% respectivamente.
- 3) La etapa de tratamientos previos a que se ha sometido la biomasa microalgal, ha sido optimizada. Se propone como método óptimo de extracción de biliproteínas de la biomasa microalgal, la ruptura de la pared celular por choque osmótico, utilizando tampón fosfato pH 7, 50mM para el caso de las algas verdeazuladas (*Anabaena marina*, *Spirulina platensis* y *Synechocystis aquatilis*) y tampón acetato pH5'5, 50mM para el caso del alga roja *Porphyridium cruentum*.
- 4) Se ha desarrollado, como paso más relevante del proceso de purificación y que dota a la metodología propuesta de verdadera singularidad, una etapa de cromatografía de adsorción en lecho expandido (CALE), utilizando como matriz cromatográfica Streamline DEAE, que se caracteriza por requerir muestra procedente de tratamientos previos y generar un extracto proteico enriquecido en ficocianinas.
- 5) Se han optimizado los parámetros de trabajo en columna de CALE, habiéndose obtenido: grado de expansión óptimo $H/H_0=2$, viscosidad de la muestra: 1'109 mP (extracto de *Anabaena marina*), 1'184mP (extracto de *Spirulina platensis*) y 1'025mP (extracto de *Synechocystis aquatilis*) y relación (carga proteica/ml de adsorbente) igual a 0'9 mg/ml para el extracto procedente de *Anabaena marina*, 0'91 mg/ml para el de *Spirulina platensis* y 4'9 mg/ml para el extracto procedente de *Synechocystis aquatilis*.

6) Se ha realizado el escalado del proceso de purificación de ficocianinas, a través de CALE empleando columnas de diámetros 1'5, 2'5, 4, 6 y 9 cm, obteniéndose rendimientos de recuperación en torno al 86% para el extracto proveniente de *Anabaena marina*, 79% para el extracto proveniente de *Spirulina platensis* y 91% para el extracto proveniente de *Synechocystis aquatilis*. Además, se ha conseguido desarrollar una planta piloto utilizando una columna de 15 cm, pudiendo obtener cantidades de ficocianinas del orden de gramos, lo que permitiría el desarrollo de ciertas aplicaciones a nivel industrial.

7) Se ha conseguido obtener ficocianinas ultrapuras a través de cromatografía de intercambio iónico, utilizando como matriz cromatográfica DE-52, con un rendimiento de recuperación en C-PC del 74%.

8) Los rendimientos de recuperación en ficocianinas del proceso global de purificación, constituido por las tres etapas, han sido de 62%, 59% y 67% respectivamente, para los extractos provenientes de *Anabaena marina*, *Spirulina platensis* y *Synechocystis aquatilis*.

9) Las cantidades que se obtienen de C-PC ultrapura respecto a la cantidad de biomasa microalgal de partida son: 1'1% para *Anabaena marina*, 1'71% para *Spirulina platensis* y 1'82% para el caso de *Synechocystis aquatilis*.

10) Se ha corroborado la pureza de las biliproteínas purificadas, mediante electroforesis tipo SDS-PAGE y a través de su caracterización espectroscópica.

11) Se ha estudiado la estabilidad de las ficocianinas frente al pH, la fuerza iónica, la temperatura y el tiempo.

12) Se han obtenido a nivel preparativo y caracterizado las subunidades α y β constituyentes de C-ficocianina. Así, se ha utilizado HPLC para la obtención y medidas espectroscópicas para la caracterización.

13) Se ha llevado a cabo la solubilización de ficocianinas en medios hidrocarbonados sintéticos como paso previo a su utilización como colorantes naturales en matrices reales. Para ello se han utilizado micelas reversas constituidas por el sistema AOT/agua/isooctano.

14) Por último, se han aplicado extractos de ficocianinas a matrices reales, constituidas por bebidas y helados, evaluándose su capacidad de tinción. Además, se han comparado los parámetros de color alcanzados por adición de los extractos colorantes con los correspondientes a muestras reales existentes en el mercado.

6.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Acién, F.G., García, F., Sánchez, J.A., Fernández-Sevilla, J.M. y Molina, E. (1998). *Biotechnology and Bioengineering*, 58, 605-616.
- Acién, F.G., Brindley, C., García-Malea, M.C., Fernández-Sevilla, J.M., Ibáñez, M.J., Núñez, R. y Molina, E. (2003). *Biomolecular Engineering*, 20, 149-162.
- Adir, N., Dobrovetsky, Y. y Lerner, N. (2001). *Journal of Molecular Biology*, 313, 71-81.
- Algarra, P., Thomas, J y Mousseau, A. (1990). *Plant Physiology*, 92, 570-576.
- Allen, M.B., Dougherty, E.C. y McLaughlin, J.J.A. (1959). *Nature*, 184, 1047-1049.
- Andrade, S.M., Costa, S.M.B. y Pansu, R. (2000). *Photochemistry and Photobiology*, 71, 405-412.
- Apt, K.E. y Behrens, P.W. (1999). *Journal of Phycology*, 35, 215-226.
- Arad, S. y Yaron, A. (1992). *Trends in Food Science and Technology*, 3, 92.
- Aráoz, R., Lebert, M. y Häder, D.P. (1998). *Electrophoresis*, 19, 215-219.
- Arthur, R. (2009). *Journal of Complementary Medicine*, 8, 28-32.
- Artolozaga, M.J., Jonas, R., Schneider, A.L., Furlan, S.A. y Carvalho-Jonas, M.D.F. (1988). *Bioseparation*, 7, 137-143.
- Aslan, S. y Kapdan, I.K. (2006). *Ecological Engineering*, 28, 64-70.
- Ayyagari, M.S., Pande, R., Kanstekar, S., Gao, H., Marx, K.A., Kumar, J., Tripathy, S.K., Akkara, J.A y Kaplan, D.L. (1995). *Biotechnology and Bioengineering*, 45, 116-121.

B

- Balasundaram, B., Harrison, S.T.L., Li, J. y Chase, H.A. (2008). *Biotechnology and Bioengineering*, 99, 614-624.
- Barbarino, E. y Lourenco, S.O. (2005). *Journal of Applied Phycology*, 17, 447-460.
- Barnfield Frej, A.K., Johansson, S. y Hjorth, R. (1992). *Recovery of Biological Products VI, Interlaken, Switzerland*.
- Barnfield Frej, A.K., Johansson, H.J., Johansson, S. y Leijon, P. (1997). *Bioprocess Engineering*, 16, 57-63
- Barthels, C.R., Kleinman, G. y Korzon, N.J. (1958). *Chemical Engineering and Processing*, 54, 49-52.

- Batard, P., Szollosi, J., Luescher, I., Cerottini, J.C., MacDonald, R. y Romero, P. (2002). *Cytometry*, 48, 97-105.
- Batt, B.C., Yabannavar, V.M. y Singh, V. (1995). *Bioseparations*, 5, 41-52.
- Becker, W. (2004). Microalgae in human and animal nutrition. En: Richmond, A. (ed). *Handbook of microalgal culture*. Blackwell, Oxford, 312-351.
- Belter, P.A., Cunningham, F.L. y Chen, J.W. (1973). *Biotechnology and Bioengineering*, 15, 533-549.
- Benedetti, S., Rinalducci, S., Benvenuti, F., Francogli, S., Pagliarani, S., Giorgi, L., Micheloni, M. y Canestrari, F. (2006). *Journal of Chromatography B*, 833, 12-18.
- Benemann, J.R., Weissmann, J.C., Koopman, B.L. y Oswald, W.J. (1977). *Nature*, 268, 19-23.
- Bennet, A. y Bogorad, L. (1971). *Biochemistry*, 10, 3625.
- Bennet, A. y Bogorad, L. (1973). *Journal of Cell Biology*, 58, 419-422.
- Bermejo, P., Piñero, E., Villar, A.M. (2008). *Food Chemistry*, 110, 436-445.
- Bermejo, R. (2008). *Enfasis Alimentación*, 1, 64-68.
- Bermejo, R. (2009). *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 239, 41-45.
- Bermejo, R., Talavera, E.M., Álvarez-Pez, J.M. y Orte, J.C. (1997). *Journal of Chromatography A*, 778, 441-450.
- Bermejo, R., Talavera, E.M., del Valle, C. y Álvarez-Pez, J.M. (2000). *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 18, 51-59.
- Bermejo, R., Talavera, E.M. y Álvarez-Pez, J.M. (2001). *Journal of Chromatography A*, 917, 135-145.
- Bermejo, R., Álvarez-Pez, J.M., Ación-Fernandez, F.G. y Molina, E. (2002a) *Journal of Biotechnology*, 93, 73-85.
- Bermejo, R., Fernández, E. Álvarez-Pez, J.M. y Talavera, E.M. (2002b). *Journal of Luminiscence*, 99, 113-124.
- Bermejo, R., Ación, F.G., Ibañez, M.J., Fernández-Sevilla, J.M., Molina, E. y Álvarez-Pez, J.M. (2003a). *Journal of Chromatography B*, 790, 317-325.
- Bermejo, R., Tobaruela, D., Talavera, E.M., Orte, A. y Álvarez-Pez, J.M. (2003b) *Journal of Colloid and Interface Science*, 263, 616-624.
- Bermejo, R., Felipe, M.A., Talavera, E.M. y Álvarez- Pez J.M. (2006). *Chromatographia*, 63, 59-66.
- Bermejo, R., Ruiz, E., Ación, F.G. (2007). *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 927-933.
- Berns, D.S. y Scott, E. (1966). *Biochemistry*, 5, 1528-1533.

-
- Berns, D.S. y Morgenstem, A. (1968). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 123, 640-642.
- Berns, D.S. y MacColl, R. (1989). *Chemical reviews*, 89, 807-825.
- Bhat, V.B. y Madyastha, K.M. (2000). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275, 20-25.
- Bhattacharyya, K. y Basak, S. (1993). *Biophysical Chemistry*, 47, 21-31.
- Bhattacharyya, K. y Basak, S. (1995). *Photochemistry and Photobiology*, 62, 17-23.
- Blinkova, L.P., Gorobets, O.B. y Baturo, A.P. (2001). *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2, 114-118.
- Borowitzka, M.A. (1988). Vitamins and Fine Chemicals from Microalgae, en *Microalgal Biotechnology*, Borowitzka and Borowitzka (Eds.). Cambridge University Press. Cambridge. 153-196.
- Boussiba y Richmond A.E. (1979). *Microbiology*, 120, 155-159.
- Brejc, K., Ficner, R., Huber, R. y Steinbacher, S. (1995). *Journal of Molecular Biology*, 249, 424-440.
- Brennan, L. y Owende, P. (2010). *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 557-577.
- Brown, M.R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C. y Trenerry, C. (1999). *Journal of Applied Phycology*, 11, 247-255.
- Brune, D.E., Lundquist, T.J. y Benemann, J.R. (2009). *Journal of Environmental Engineering*, 135, 1136-1144.
- Bruton, T., Lyons, H., Lerat, Y., Stanley, M. y Borasmussen, M. (2009). A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in Ireland. Sustainable Energy Ireland.
- Bryant, D.A., Glazer, A.N. y Eiserling, F.A. (1976). *Archives of Microbiology*, 110, 61-75.
- Bryant, D.A., Hixson, G.S. y Glazer, A.N. (1978). *Journal of Biology Chemistry*, 253, 220-225.
- Bryant, D.A., Guglielmi, G., Tandeu de Marsac, N., Castets, A.M. y Cohen Bazire, G. (1979). *Archives of Microbiology*, 123, 113-127.
- Buijs, A. y Wesselingh, J.A. (1980). *Journal of Chromatography*, 201, 319-327.
- Burns, M.A. y Graves, D.J. (1985). *Biotechnology Progress*, 1, 95-103.

C

- Cadoret, J.P. y Bernard, O. (2008). *Journal de la Societe de Biologie*, 202, 201-211.
- Campanella L., Crescentini G., Avino P. y Angiello L. (2000). *Annali di chimica* 90, 153-161.
- Campbell, K.A. y Glatz, C.E. (2010). *Biotechnology Progress*, 26, 488-495.
- Cerón, M.C., Acién, F.G., Fernández-Sevilla, J.M., Bermejo, R. y Molina, E. (2008) "Influence of irradiance and dilution rate on the growth and phycobiliproteins content of the microalga *Porphyridium cruentum*" 11th International Conference on Applied Phycology, Galway, Ireland, 2008.
- Certik, M. y Shimizu, S. (1999). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87, 1-14.
- Chang, E.H. y Yang, S.S. (2003). *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 44, 43-52.
- Chang, Y.K., McCreath, G.E. y Draeger, N.M. (1993). *Chemical Engineering Research and Design*, 71, 299-303.
- Chang, Y.K. y Chase, H.A. (1996). *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 204.
- Chang, Y.K., Chen, Y.H. y Chien, C.H. (1998). *Enzyme and Microbial Technology*, 23, 204-210.
- Chase, H.A., (1994). *Biotechnology Bioengineering*, 49, 204.
- Chase, H.A. y Chang, Y.K. (1993). *European Congress on Biotechnology*, Florence, Italy.
- Chaumont, D. (1993). *Journal of Applied Phycology*, 5, 593-604.
- Chisti, Y. (2007). *Biotechnology*, 25, 294-306.
- Chisti, Y. (2008). *Trends in Biotechnology*, 26, 126-131.
- Chong, F.C., Tan, W.S., Biak, D.R.A., Ling, T.C. y Tey, B.T. (2010). *Journal of Chromatography A*, 1217, 1293-1297.
- Clemmitt, R.H. y Chase, H.A. (2000). *Journal of Chromatography A*, 874, 27-43.
- Cohen, D., Finkel, A. y Sussman, M. (1976). *Aquaculture*, 8, 199-207.
- Cohen, Z., Voushak, A. y Richmond, A. (1988). *Journal of Phycology*, 24, 328-332.
- Cohen-Bazire, G., Beguin, S., Rimon, S., Glazer, A.N. y Brown, M. (1977). *Archives of Microbiology*, 111, 225-238.
- Cole, K.M. y Sneath, R.G. (Eds.), (1990). En: "Biology of the Red Algae". Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Contreras-Martel, C., Matamala, A., Bruna, C., Poo-Caamaño, G., Almonacid, D., Figueroa, M., Martínez-Oyanedel, J. y Bunster, M. (2007). *Biophysical Chemistry*, 125, 388-396.
- Costa, J.A.V. y de Morais, M.G. (2011). *Bioresource Technology*, 102, 2-9.

-Cysewski, G.R. y Todd Lorenz, R. (2004). En: "Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products. Major industrial species. Richmond, A. (ed) Handbook of microalgal culture. Blackwell, Oxford. 281-288.

D

- D'Agnoles, E., Rizzo, R., Paoletti, S. y Murano, E. (1994). *Phytochemistry* 35, 693-696.
- Dainnipon InK y Chemicals Inc. (1979). Jpn Pat., 95770.
- Dainnipon InK y Chemicals Inc. (1987). Jpn Pat., 06691.
- Dale, R.E. y Teale, W.J. (1970). *Photochemistry and Photobiology*, 12, 99-117.
- David, L, Marx, A., Adir, N. (2011). *Journal of Molecular Biology*, 405, 201-213.
- De-Bashan, L.E. y Bashan, Y. (2010). *Bioresource Technology*, 101, 1611-1627.
- Delgado-Vargas, F. y Paredes-López, O. (2003). Natural colorants for food and nutraceutical uses. En: CRC Press.
- Deng, R. y Chow, T.J. (2010). *Cardiovascular Therapeutics*, 28, 33-45.
- Dermoun, D., Chaumont, D., Thebault, J-M. Dauta, A. (1992). *Bioresource Technology*, 42, 113-117.
- Derner, R.B., Ohse, S., Villela, M., DeCarvalho, S.M. y Fett, R. (2006). *Ciencia Rural*, 36, 1959-1967.
- Deutscher, M.P. (1990). *Methods in Enzymology*, 182, 779-780.
- Dolbeare, F.A. y Gray, J.W. (1989). US Pat, 4812394 A, pp. 17.
- Dossena, A., Rizzo, V., Marcheli, R., Gasnati, G. y Luisi, P.L. (1976). *Biochimica and Biophysica Acta*, 446, 493-505.
- Draeger, M.N. y Chase, H.A. (1990). *Institution of Chemical Engineers Symposium Series No. 118* 12.1-12.12
- Draeger, M.N. y Chase, H.A. (1991). *Bioseparations*, 2, 67-80.
- Ducret, A., Sidler, W., Frank, G. y Zuber, H. (1994). *European Journal Biochemistry*, 221, 563-580.
- Duerring, M., Huber, R., Bode, W., Ruembeli, R. y Zuber, H. (1990). *Journal of Molecular Biology*, 211, 633-644.
- Duerring, M., Schmidt, G.B. y Huber, R. (1991). *Journal of Molecular Biology*, 217, 577-592.

- Durand-Chastel, H. (1980). *Algae Biomass*. (G. Shelef y C.J. Soeder, eds.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsteden.
- Duval, J.C., Lichtlè, C. y Lemoine, Y. (1987). *Biochimica et Biophysica Acta*, 894, 76-90.

E

- Eicke, H.F., Shepherd, J.C.W. y Steinemann, A. (1976). *Journal of Colloid and Interface Science*, 56, 168-176.
- European Food Safety Authority, (2009a). *EFSA Journal*, 7, 1328.
- European Food Safety Authority, (2009b). *EFSA Journal*, 7, 1327.
- European Food Safety Authority, (2009c). *EFSA Journal*, 7, 1330.
- European Food Safety Authority, (2009d). *EFSA Journal*, 7, 1332.
- European Food Safety Authority, (2009e). *EFSA Journal*, 7, 1331.
- European Food Safety Authority, (2009f). *EFSA Journal*, 7, 1329.
- European Food Safety Authority, (2010a). *EFSA Journal*, 8, 1851.
- European Food Safety Authority, (2010b). *EFSA Journal*, 8, 1853.
- European Food Safety Authority, (2010c). *EFSA Journal*, 8, 1852.
- European Food Safety Authority, (2010d). *EFSA Journal*, 8, 1679.
- European Food Safety Authority, (2010e). *EFSA Journal*, 8, 1678.
- European Food Safety Authority, (2010f). *EFSA Journal*, 8, 1649.
- European Food Safety Authority, (2010g). *EFSA Journal*, 8, 1586.
- European Food Safety Authority, (2010h). *EFSA Journal*, 8, 1540.
- European Food Safety Authority, (2010i). *EFSA Journal*, 8, 1536.
- European Food Safety Authority, (2010j). *EFSA Journal*, 8, 1535.
- European Food Safety Authority, (2010k). *EFSA Journal*, 8, 1778.

F

- Fendler, J.H. y Fendler, E.J. (1975). "Catalisis in micellar and macromolecular systems", Academic Press New York.
- Fendler, J.H. y Mittal, P. (1982). "Solution behaviour of surfactants", New York Academic Press.

- Fernández-Velasco, A., Sepúlveda-Becerra, M., Gavira, A., Darszon, M. y Gómez-Puyou, A. (1995). *Biochemistry*, 34, 361-369.
- Ferreira, S. y Gratton, E. (1990). *Journal of molecular liquids*, 45, 253-272.
- Ficner, R., Lobeck, K., Schmidt, G. y Huber, R. (1992). *Journal of Molecular Biology*, 228, 935-950.
- Ficner, R. y Huber, R. (1993). *European Journal Biochemistry*, 218, 103-106.
- Flynn, P.F., Simorellis, A.K. y Van Horn, W.D. (2007). *Annual reports on NMR Spectroscopy*, 62, 179-219.
- Fogg, G.E., Stewart, W.D.P., Fay, P. y Walsby, A.E. (1973). En: "The Blue-Green Algae". Academic Press, London.
- Francis, F.J. (1995). *Food Quality and Preference*, 6, 149-155.
- Frick, D. (2003). *Review of Progress in Coloration and Related Topics*, 33, 15-32.

G

- Gailliot, F.P., Gleason, C., Wilson, J.J. y Zwarick, J. (1990). *Biotechnology Progress*, 6, 370-375.
- Galland-Irmouli, A.V., Pons, L., Luçon, M., Villaume, C., Mrabet, N.T., Guéant, J.L. y Fleurence, J. (2000). *Journal of Chromatography B*, 739, 117-123.
- Gallay, J., Vicent, C., Nicot, M. y Waks, M. (1987). *Biochemistry*, 26, 5738-5747.
- Gallay, R. y Van der Klink, J.J. (1987). *Journal of Physics E: Scientific instruments* 20, 927.
- Gantt, E. (1979). Phycobiliproteins of cryptophyceae. En: "Biochemistry and Physiology of Protozoa". (M. Levandowsky, y S.H. Huttner, eds.). Academic Press, New York, Vol. 1, pp. 121-137.
- Gantt, E. (1980). *International Review of Cytology*, 66, 45-80.
- Gantt, E. y Lipschultz, C.A. (1974). *Biochemistry*, 13, 2960-2967.
- Gao, D., Yao S-J. y Lin, D-Q. (2007). *Journal Applied Polymers Science*, 107, 674-682.
- Ghose S. y Chase H.A. (2000a). *Bioseparation*, 9, 21-28.
- Ghose S. y Chase H.A. (2000b). *Bioseparation*, 9, 29-36.
- Gitler, G. y Montal, M. (1972a). *Biochemistry Biophysic Research Communications*, 47, 1486-1491.
- Gitler, G. y Montal, M. (1972b), *FEBS Letters*, 28, 329-332.
- Glazer, A.N., (1976). En: "The biliproteins". (N. Neurath y R.L. Hill, eds.) Academic Press,

- New York, Vol. 11, pp. 1-103.
- Glazer, A.N., (1981) Photosynthetic accessory proteins with bilin prosthetic groups. En: "The biochemistry of Plants". (M.D. Hatch, y N.K. Boardman, eds.). Academic Press, New York, Vol. 8, pp. 51-96.
- Glazer, A.N., (1984). *Biochimica et Biophysica Acta*, 768, 29-51.
- Glazer, A.N., (1985). *Annual Review Biophysics and Biophysical Chemistry*, 14, 47-77.
- Glazer, A.N., (1986). Microbial Energy Transduction, Genetics, Structure and Function of Membrane Proteins. En: "Current Communications in Molecular Biology" (D.C. Daldal y F. Daldal, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 31-36
- Glazer, A.N., (1988a). *Methods Enzymology*, 167, 291-303.
- Glazer, A.N., (1988b). *Methods Enzymology*, 167, 304-312.
- Glazer, A.N., (1989). *Journal of Biological Chemistry*, 264, 1-4.
- Glazer, A.N., (1994). *Journal of Applied Phycology*, 6, 105-112.
- Glazer, A.N., (1999). Phycobiliproteins. En "Chemicals from Microalgae". (Z. Cohen, ed.). T.J. International Ltd, Padstow, UK, pp. 261-275.
- Glazer, A.N. y Cohen-Bazire, G. (1971). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 68, 1398-1401.
- Glazer, A.N. y Fangs, S. (1973). *Journal of Biological Chemistry*, 248, 659-662.
- Glazer, A.N. y Hixson, C.S. (1975). *Journal of Biological Chemistry*, 250, 5487-5495.
- Glazer, A.N. y Hixson, C.S. (1977). *Journal of Biological Chemistry*, 252, 32-42.
- Glazer, A.N., West, J.A. y Chan, C. (1982). *Biochemical Systematic and Ecology*, 10, 203-215.
- Glazer, A.N. y Stryer, L. (1984). *Trends in Biochemical Science*, 9, 423-427.
- Glazer, A.N. y Stryer, L. (1990). *Methods Enzymology*, 184, 188-194.
- Glazer, A.N. y Wedemayer, G.J. (1995). *Photosynthesis Research*, 46, 93-105.
- Gombos, Z., Csizmadia, V. y Csaturday, K. (1984). *Analitycal Biochemistry*, 136, 491-492.
- González, C.V., Acién, F.G., Fernández-Sevilla, J.M., Sánchez, J.F., Cerón, M.C. y Molina, E. (2009). *Bioresource Technology*, 100, 5904-5910.
- González, R., Rodríguez, S., Romay, C., González, A., Armesto, J., Ramirez, D. y Merino, N. (1999). *Pharmacological Research*, 39, 55-59.
- Grabowski, J. y Gantt, E. (1978). *Photochemistry and Photobiology*, 28, 39-45.
- Granick, S. (1991). *Science*, 253, 1374-1379.
- Gudin, C. y Thepenier, C. (1986). *Advances in Biotechnological Processes*, 6, 73-110.

- Guerrero, M.G. y Losada, M. (1989). Producción fotosintética de compuestos de interés práctico por microalgas. En: "Fotosíntesis". Colección Nuevas Tendencias, CSIC, Madrid.
- Gustafson, K. (1989). *Journal of the National Cancer Institute*, 2, 1254.
- Güzeltunc, E. y Ulgen, K.Ö. (2001). *Journal of Chromatography A*, 914, 67-76.
- Guzmán, S., Gato, A. y Calleja, J.M. (2001). *Phytotherapy Research*, 15, 224-230.

H

- Halim, R., Hosikian, A., Lim, S. y Danquah, M.K. (2010). *International Journal of Chemical Engineering*, art.nº 391632.
- Hameed A.M.S. (2007). *Journal of Biotechnology*, 6, 1185-1191.
- Hansson, K.A. (1995). "7th European Congress on Biotechnology", Nice, France.
- Hansson, M., Ståhl, S., Hjorth, R., Uhlén, M. y Moks, T. (1994). *Bio/Technology*, 12, 285-288.
- Hasmann, F.A., Pessoa, J.A. y Roberto, I.C. (2001). *Applied Biochemistry and Biotechnology A*, 91-93, 719-728.
- Haugland, R.P. (1996). En: "Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals". (M.T.Z. Spence, ed.). Molecular Probes Inc., Eugene, Oregón, pp. 19-20.
- Haxo, F.T. y Fork, D.C. (1959). *Nature*, 184, 1051-1052.
- Hedman, P. y Barnfield Frej, A.K. (1992). *Harnessing Biotechnology for de 21st Century*, 271-274.
- Henrikson, R. (1994). En: "Microalga Spirulina". Ediciones Urano, ISBN: 84-7953-047-2.
- Hernández, J.P., De-Bashan, L.E. y Bashan, Y. (2006). *Enzyme Microbial Technology*, 38, 190-198.
- Hilditch, C.M., Smith, A.J., Bolding, P. y Rogers, L.J. (1991). *Phytochemistry*, 30, 3515-3517.
- Hoffman, J.P. (1998). *Journal of Phycology*, 34, 757-763.
- Honsell, E., Kosovel, V. y Talarico, L. (1984). *Botánica Marina* 27, 1-16.
- Hjorth, R., Kämpe, S., y Carlsson, M. (1995). *Bioseparation*, 5, 217-223.
- Hu, H.B., Yao, S.J., Mei, L.H., Zhu, Z.Q. y Hur, B.K. (2000). *Biotechnology Letters*, 22, 1383-1387.

- Huang, B., Wang, G.C., Zeng, C.K. y Li, Z.G. (2002). *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 17, 35-42.
- Huntley, M.E. y Redalje, D.G. (2007). *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 12, 573-608.

I

- Intrarapuk, A., Awakairt, S., Thammapalerd, N., Mahannop, P., Pattanawong, U. y Suppasiri, T. (2001). *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 32, 165-171.

J

- Jägersten, C., Johansson, S., Bonnerjea, J. y Pardon, R. (1996). "Recovery of Biological Products VIII", Tucson, Arizona.
- Jiang, T., Zhang, J.P., Chang, W.R. y Liang, D.C. (2001). *Biophysical Journal*, 81, 1171-1179.
- Johansson, H.J., Shiloach, J. y Jägersten, C. (1995). Pres. En "Prep Tech '95" Rutherford, New Jersey (USA).
- Johansson, H.J., Jägersten, C. y Shiloach, J. (1996). *Journal of Biotechnology*, 48, 9-14.
- Johansson, B.U. y Wnukowski, P. (1992). Pres. at AICHE Annual Meeting, Florida.
- Johansson, S., Lindgren, A. y Nyström, L.-E. (1993). "6th European Congress on Biotechnology, Florence, Italy.
- Johnson, I. (1998). *Histochemical Journal*, 30, 123-140.
- Jong-Yuh, C. y Mei-Fen, S. (2005). *Life Sciences*, 77, 980-990.
- Jung, T.M. y Dailey, M.O., (1989). *Journal of Immunological Methods*, 121, 9-18.

K

- Kämpe, S., Horth, R. y Nyström, L.E. (1993). 6th European Congress on Biotechnology, Florence, Italy.)
- Kanazawa, A., Teshima, S.I. y Sakamoto, M. (1985). *Aquaculture*, 50, 39-49.

- Karau, A., Benken, C., Thömmes, J. y Kula, M.R. (1997). *Biotechnology and Bioengineering* 55, 54-64.
- Klausner, A. (1986). *Biotechnology*, 4, 947-953.
- Knauer, J. y Southgate, P.C. (1999). *Review in Fisheries Science*, 7, 241-280.
- Koho, K.Y. (1982). Jpn Pat, 58, 128, 322, [83, 128.322], pp. 5.
- Koptera, Z.P. (1970). *Microbiologica Zhournal (Kiev)*, 32, 355-360.
- Kotlarchyk, M. (1985). *Physica B: Physics of Condensed Matter & C: Atomic, Molecular and Plasma Physics, Optics*, 136, 274-280.
- Kronick, M.N. y Grossman, P.D. (1983). *Clinical Chemistry*, 29, 1582-1586.

L

- Laemmlli, U.K., (1970). *Nature*, 277, 680-685.
- Lao, K. y Glazer, A.N. (1996). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93, 5258-5263.
- Lavens, P., Sorgeloos, P., Dhert, P. y Devresse, B. (1995). Larval food. En : Bromage, N. y Roberts, R. (eds). *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell Scientific, Oxford, 99, 373-397.
- Lee, E.T. y Bazin, M.J. (1990). *New Phytologist*, 116, 331-335.
- Lemberg, R. y Legge, J.W. (1949). En: "Hematin Compounds and Bile Pigments". Interscience Publishers, New York.
- Lenz, J., Federwish, M., Gattner, H.G., Bradenburg, D., Höcker, U. y Woldmer, A. (1995). *Biochemistry*, 34, 6130-6141.
- Leodidis, E.B. y Hatton, T.A. (1990a). *Journal of Physical Chemistry*, 94, 6400-6411.
- Leodidis, E.B. y Hatton, T.A. (1990b). *Journal of Physical Chemistry*, 94, 6411-6420.
- Li, J. y Chase, H.A. (2009). *Journal of Chromatography A*, 1216, 8759-8770.
- Li, Q., Su, H. y Tan, T. (2007). *Journal of Environmental Management*, 85, 900-907.
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q. y Dubois-Calero, N. (2008). *American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers*. 5.9
- Liang, S., Xueming, L., Chen, F. y Chen, Z. (2004). *Hydrobiologia*, 512, 45-48.
- Lindgren, A., Johansson, S. y Nyström, L.E. (1993) "7th Bioprocess Engineering Symposium" Book No. H00887.
- Liu, J.Y., Jiang, T., Zhang, J.P. y Liang, D.C. (1999). *Journal of Biological Chemistry*, 274, 16945-16952.

- Luisi, P.L., Henninger, F., Joppich, M., Dossena, A. y Gasnati, G. (1977). *Biochemistry Biophysical Research Communications*, 74, 1384-1389.
- Luisi, P.L. y Wolf, R. (1982). "Micellar solubilization of enzymes in hydrocarbons solvents". New York and London Press.
- Luisi, P.L. y Magid, L.J. (1986). *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 20, 409-474.
- Luisi, P.L., Giomini, M., Pileni, M.P., y Robinson, B.H. (1988). *Biochimica et Biophysica Acta*, 947, 209-246.
- Loken, M.R. y Terstappen, L.W.M.M. (1989). European Pat, 347210 A2, pp. 12.
- LØkra, S., Helland, M., Claussen, I.C., Straetkvern, K.O. y Egelanddal, B. (2008). *LWT* 41, 1089-1099.

M

- Ma, S., Wang, G.C., Sun, H.B. y Zeng, C.K. (2003). *Plant Science*, 164, 253-257.
- Ma, Y., Xie, J., Zhang, R., Hu, C. y Zhao, J. (2008). *Photochemical & Photobiological Sciences*, 7, 263-268.
- MacColl, R., Lee, L.J. y Berns, D.S. (1971). *Biochemistry Journal*, 122, 421-426.
- MacColl, R., Csatorday, K., Berns, D.S. y Traeger, E. (1980). *Biochemistry*, 19, 2817-2820.
- MacColl, R., Csatorday, K., Berns, D.S. y Traeger, E. (1981). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 208, 42-48.
- MacColl, R. y Guard-Friar, D. (1987). En: "Phycobiliproteins". CRC Press, Boca Raton, Florida.
- MacCormick, D.K. (1993). *BioTechnology*, 11, 1059.
- Malecha, S. (1983). Commercial seed production of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in Hawaii. En: CRC Handbook of Mariculture. Crustacean Aquaculture, ed. J.P. Mc Vey, pp. 205-230. Boca Raton: CRC Press.
- Mallick, N. (2002). *Biometals*, 15, 377-390.
- Martinek, K., Levashov, A.V., Klyachko, N.C. y Berezin, I.V. (1978). *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 236, 951.
- Marzola, P. y Gratton, E. (1991). *Journal of Physical Chemistry*, 95, 9488-9495.
- Mathies, R.A. y Stryer, L. (1986). Single-molecule fluorescence detection: a feasibility study using phycoerythrin. En: "Applications of fluorescence in Biomedical Sciences". (D.L. Taylor, A.S. Waggoner, F. Lanni, R.F. Murphy y R. Birge, eds.). Alan R. Liss, New York,

- pp. 129-140.
- Matsui, M.S., Muizzuddin, N., Arad, S. y Marenus, K. (2003). *Applied Biochemistry and Biotechnology A*, 104, 13-22.
 - McGregor, A., Klartag, M., David, L. y Adir, N. (2008). *Journal of Molecular Biology*, 354, 406-421.
 - Mendiola, J.A., Rodríguez-Meizoso, I., Señoráns, F.J., Reglero, G., Cifuentes, A. y Ibáñez, E. (2008). *Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry*, 7, 3301-3309.
 - Menger, F.M. y Yamada, K. (1979). *Journal of the American Chemical Society*, 101, 6731-6734.
 - Metting, F.B. (1996). *Journal Industrial Microbiology*, 17, 477-489.
 - Mihova, S.G., Georgiev, D.I., Minkova, K.M. y Tchernov, A.A. (1996). *Journal of Biotechnology*, 48, 251-257.
 - Mimuro, M., Füglistaller, P., Rumbeli, R. y Zuber, H. (1986). *Biochimica et Biophysic Acta* 848, 155-166.
 - Moreno, A., Bermejo, R., Talavera, E.M., Alvarez-Pez, J.M., Sanz-Aparicio, J. y Romero-Garrido, A. (1997). *Acta Crystallographica*, 53, 321-326.
 - Mörschel, E. y Wehrmeyer, W. (1975). *Archives of Microbiology*, 105, 153-158.
 - Mörschel, E. y Wehrmeyer, W. (1977) *Archives of Microbiology*, 113, 83-89.
 - Mörschel, E. y Rhiel, E. (1987). Phycobilisomes and thylakoids: the light-harvesting system of cyanobacteria and red algae. In: "Membraneous Structures". (J.R. Harris y R.W. Horne, eds.). Academic Press, New York, USA pp. 209-254.
 - Mujumdar, S.R., Mujumdar, R.B., Grant, C.M. y Waggoner, A.S. (1996). *Bioconjugate Chemistry*, 7, 356-362.
 - Muller-Feuga, A. (2000). *Journal of Applied Phycology*, 12, 527-534.
 - Murray, J.W., Maghlaoui, K. y Barber, J. (2007). *Acta Crystallographica F*, 63, 998-1002.
 - Myers, J. y Kratz, W.A. (1955). *Journal of General Physiology*, 39, 11-22.

N

- Neufeld, G.J. y Riggs, A. (1969). *Biochimica et Biophysica Acta*, 181, 234-243.
- Nicot, C., Vacher, M., Vincent, M., Gallay, J. y Waks, M. (1985). *Biochemistry*, 24, 7024-7032.

- Nield, J., Rizkallah, P.J., Barber, J. y Chayen, N.E. (2003). *Journal of Structural Biology*, 141, 149-155.
- Niu, J. F., Wang, G.C., Zhou, B.C., Lin, X.Z. y Chen, C.S. (2007). *Journal of Phycology*, 43, 1339-1347.
- Nixon, L., Koval, C.A., Xu, L., Noble, R.D. y Slaff, G.S. (1991). *Bioseparations*, 2, 217-230.

O

- O'Carra, P. (1970). *Biochemical Journal*, 119, 42-43.
- O'Carra, P. y Killilea, S.D. (1971). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 45, 1192-1197.
- Oi, V.T., Glazer, A.N. y Stryer, L. (1982). *Journal of Cell Biology*, 93, 981-986.
- Olaizola, M. (2003). *Biomolecular Engineering*, 20, 459-466.
- Ong, L.J. y Glazer, A.N. (1985). *Physiologie Végétale*, 23, 777-787.
- Ong, L.J. y Glazer, A.N. (1991). *Journal of Biology Chemistry*, 266, 9515-9527.
- Oswald, W.J. y Golueke, C.G. (1960). *Advances in Applied Microbiology*, 2, 223-262.

P

- Padgett, M.P. y Krogman, D.W. (1987). *Photosynthesis Research*, 11, 225-235.
- Padyana, A.K., Bhat, V.B., Madyastha, K.M., Rajashankar, K.R. y Ramakumar, S. (2001). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282, 893-898.
- Parkinson, G. (1987). *Chemical Engineering*, 94, 19-22.
- Paulus, H.P. (1985). WO Pat, 8504811, pp. 37.
- Peck, K., Stryer, L., Glazer, A.N. y Mathies, R.A. (1989). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86, 4087-4091.
- Pittman, J.K., Dean, A.P. y Osudenko, O. (2011). *Bioresource Technology*, 102, 17-25.
- Poulin, F., Jacquemart, R., De Crescenzo, G., Jolicoeur, M. y Legros, R. (2008). *Biotechnology*, 24, 279-282.
- Pruder, G.D. (1983). *Journal of the Institute of Electrical and Electronics Engineers*, 2, 1002-1004.
- Pulz, O. (2001). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 287-293.

R

- Raja, R., Hemaiswarya, S., Kumar, N.A., Sridhar, S. y Rengasamy, R. (2008). *Critical Review in Microbiology*, 34, 77-88.
- Reboloso, M.M., Acien, G.G., Sánchez, J.A. y Guil, J.L. (2000). *Food Chemistry*, 70, 345-353.
- Reijnders, L. (2008). *Trends in Biotechnology*, 26, 349-350.
- Reitan, K.I., Raimuzzo, J.R., Oie, G. y Olsen, Y. (1997). *Aquaculture*, 155, 207-221.
- Remirez, D., González, A., Merino, N., González, R., Ancheta, O., Romay, C. y Rodríguez, S. (1999). *Drug Development Research*, 48, 70-75.
- Richmond, A. (1990). Large scale microalgal culture and applications. In *Progress in phycological Research*, 7, 269-329. Biopress (Round/Chapman, eds.).
- Rimbau, V., Camins, A., Pubill, D., Sureda, F.X., Romay, C., González, R., Jiménez, A. y Pallas, M. (2001). *Archives of Pharmacology*, 364, 96-104.
- Rippka, R. (1988). *Methods in Enzymology*, 167, 28-67.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. y Stanier, R.Y. (1979). *Journal of General Microbiology*, 111. 1-61.
- Romay, C., Ledón, N. y González, R. (1999). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51, 641-642.
- Romay, C. y González, R. (2000). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52, 367-368.
- Rouviere, J., Yaniv, M. y Germond, J.E. (1979). *Cell*, 17, 265-274.
- Roy, I. y Gupta, M.N. (2000). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 32, 81-87.
- Rusckowski, M. y Zilinskas, B.A. (1982). *Journal of Plant Physiology*, 70, 1055-1059.

S

- Saito, T., Iso, N. y Mizumo H. (1974). *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 47, 1375.
- Saxena, A.M. (1988). *Journal of Molecular Biology*, 200, 579-591.
- Schatz, G.H. y Witt, H.T. (1984). *Photobiochemistry and Photobiophysics*, 7, 1-14.
- Scheer, H. (1981). *Angewandte Chemie*, 93, 230.
- Scheer, H. y Kufer, W. (1977). *Zeitschrift fur Naturforschung C*, 32, 513-519.
- Schmidt, C., Berglöf, J.H. y Lindquist, L.O. (1993) *12th Meeting Of European Animal Cell Technology, Würzburg, Germany.*

- Schwartz, A. (1986). UK Pat, 2172104, pp. 15.
- Schwartz, A. (1990). US Pat, 4918004 A, pp. 10.
- Scott, E. y Berns, D.S. (1965). *Biochemistry*, 4, 2597-2606.
- Seefeldt, L.C. (2007). *Industrial Bioprocessing*, 29, 5-6.
- Sharma, K., Cherish, P., Sasidhar, V.K., Krishna, V. (2008). *Protein Expression and Purification*, 60, 7-14.
- Shepard, S.R., Boyd, G.A. y Schrimsher, J.L. (2001). *Bioseparation*, 10, 51-56.
- Sidler, W.A. (1994). Phycobilisome and Phycobiliprotein structures. En: "The Molecular Biology of Cyanobacteria". (D.A. Bryant, ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.139-216.
- Sidler, W., Kumpf, B., Suter, E., Morisset, W., Wehrmeyer, W. y Zuber, H. (1985). *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 366, 233-244.
- Sidler, W., Kumpf, B., Suter, F., Klotz, A.V., Glazer, A.N. y Zuber, H. (1989). *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 370, 115-124.
- Sidler, W., Nutt, H., Kumpf, B., Frank, G., Brenzel, A., Wehrmeyer, W. y Zuber, H. (1990). *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 371, 537-547.
- Siegelman, H.W. y Kycia, J.H. (1978). *Plant Physiology*, 70, 887-897.
- Singh, A.K. y Aruna, R.V. (1995). *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, 89, 247-250.
- Singh, S., Kate, B.N. y Banecjee, U.C. (2005). *Critical Reviews in Biotechnology*, 25, 73-95.
- Sköld, A., Daniels, I. y Barnfield Frej, A.K. (1993). Pres. *6th European Congress on Biotechnology, Florence, Italy*.
- Smogyi, B. (1993). *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 18, 3-16.
- Soini, E. y Hemmitä, I. (1979). *Clinical Chemistry*, 25, 353-361.
- Soper, S.A., Nutter, H.L., Keller, R.A., Davis, L.M. y Shera, E.B. (1993). *Photochemistry and Photobiology*, 57, 972-97.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Durán, E. e Isambert, A. (2006). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 87-96.
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M. y Cohen-Bazire, G. (1971). *Bacteriological Reviews*, 35, 171-205.
- Starr, R.C. (1971). Algal culture-sources and methods of cultivation. En: "Methods in Enzymology". (A. San Pietron, ed.). Academic Press, New York, Vol. 23, pp. 29-53.
- Stephen, E., Ross, I.L., Mussnug, J.H., Wagner, L.D., Borowitzka, M.A., Posten, C., Kruse, O. y Hankamer, B. (2010). *Trends in Plant Science*, 15, 554-564.

- Stewart, D.E. y Farmer, F.H. (1984). *Limnology and Oceanographic*, 29, 392-397.
- Stolz, P. y Obermayer, B. (2005). *Cosmetic Toiletries*, 120, 99-106.
- Straetkvern, K.O., Schwarz, J.G., Wiesenborn, D.P., Zafirakos, E. y Lihme, A. (1999). *Bioseparation*, 7, 333-345.
- Suding, A. y Tomusiak, M. (1993). *205th American Chemical Society National Meeting, Denver, Colorado, USA*.
- Sun, L., Wang, S., Chen, L. y Gong, X. (2003). *IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics*, 9, 177-188.
- Sun, L., Wang, S. y Qiao, Z. (2006). *Journal of Biotechnology*, 121, 563-569.
- Swanson, R. y Glazer, A.N. (1990). *Analytical Biochemistry*, 188, 295-299.

T

- Tamiya, H., (1957). *Annual Review of Plant Physiology*, 8, 309-334.
- Tan, Y.P., Ling, T.C., Tan, W.S., Yusoff, K., Tey, B.T. (2006). *Protein Expression and Purification*, 46, 114-121.
- Tchernov, A.A., Minkova, K.M., Georgiev, D.I. y Houbavenska, N.B. (1993). *Biotechnology Techniques*, 7, 853-858.
- Tchernov, A.A., Minkova K.M, Houbavenska N.B. y Kovacheva N.G. (1999). *Journal of Biotechnology*, 69, 69-73.
- Tel-Or, E., Boussiba, S. y Richmond, E. (1980). Products and chemicals from *Spirulina platensis*. En: "Algae Biomass". (G.Shelef y J. Soeder, eds.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press, pp. 611-617.
- Terstappen, N.W.M.M., Loken, R.M. y Shah, V.O. (1989). European Pat, 347039 A2, pp. 14.
- Thömmes, J. (1995). *Biotechnology and Bioengineering*, 45, 205-211.
- Titchener-Hooker, N.J., Dunnill, P. y Hoare, M. (2008). *Biotechnology and Bioengineering*, 100, 473-487.
- Tjioe, I., Legerton, T., Wegstein, J., Harzenberg, L.A. y Roederer, M. (2001). *Cytometry*, 44, 24-29.
- Todd Lorenz, R. y Cysewski, G.R. (2000). *Trend Biotechnology*, 18, 160-167.
- Triantafilou, K., Triantafilou, M. y Wilson, K.M. (2000). *Cytometry*, 41, 226-234.
- Tsien, R.Y. (1989). *Annual Review of Neuroscience*, 12, 227-253.
- Turro, N.J., Graetzel, M. y Braun, A.M. (1980). *Angewandte Chemie*, 19, 675-696.

V

- Van Beilen, J.B. (2010). *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 4, 41-52.
- Verma, N.M., Mehrotra, S., Shukla, A. y Mishra, B.N. (2010). *African Journal of Biotechnology*, 9, 1402-1411.
- Villafranca, J.J. (1989). *Methods in Enzymology*, 177, 403-413.

W

- Waks, M. (1986). *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 1, 4-15.
- Walker, D.A. (2009). *Journal of Applied Phycology*, 21, 509-517.
- Wang, G.C., Ma, S.Y. y Zeng, C.K. (2004). *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 31, 273-277.
- Wedemayer, G.J., Kidd, D.G. y Glazer, A.N. (1996). *Photosynthesis Research*, 48, 163-170.
- Wells, M.A. (1974). *Biochemistry*, 13, 4937-4942.
- White J.C. y Stryer, L. (1987). *Analytical Biochemistry*, 161, 442-452.
- Wilbanks, S.M. y Glazer, A.N. (1993a). *Journal of Biological Chemistry*, 268, 1226-1235.
- Wilbanks, S.M. y Glazer, A.N. (1993b). *Journal of Biological Chemistry*, 268, 1236-1245.
- Wilson, K.M., Morrison, I.E.G., Smith, P.R., Fernandez, N. y Cherry, R.J. (1996). *Journal of Cell Science*, 109, 2101-2109.
- Wnukowski, P. y Lindgren, A. (1992). Poster at *Recovery of Biological Products VI*.
- Wolfgang, R. y Werner, W. (1988). *Archives of Microbiology*, 150, 534-540.
- Wrolstad, R.E., Acree, T.E., Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, C.F., Smith, D. y Sporns, P. (2005). *Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Component*. John Wiley & Sons, Inc.

X

- Xia, H-F., Lin, D-Q., Yao, S-J. (2007). *Journal of Chromatography A*, 1175, 55-62.

Y

- Yamaguchi, K. (1997). *Journal of Applied Phycology*, 8, 487-502.
- Yamanaka, G., Glazer, A.N. y Williams, R.C. (1980). *Journal of Biological Chemistry*, 255, 11104-11110.
- Yap, W.B., Tey, B.T., Alitheen, N.B.M., Tan, W.S. (2010). *Journal of Chromatography A*, 1217, 3473-3480.
- Yeh, S.W., Glazer, A.N. y Clark, J.R. (1986). *Journal of Physical Chemistry*, 90, 4578-4580.
- Yeh, S.W., Ong, L.J., Clark, J.H. y Glazer, A.N. (1987). *Cytometry*, 8, 91-95.
- Yu, M-H., Glazer, A.N., Spencer, K.G. y West, J.A. (1981). *Plant Physiology*, 68, 482-488.

Z

- Zapata, G., Lindgren, A., Barnfield Frej, A.-K., Leijon, P., Liten, A. y Mayes, T.L. (1996). *“Recovery of Biological Products VIII”*, Tucson, Arizona.
- Zeng, F., Lin, Q., Jiang, L. y Zhu, L. (1992). *Institute Photography Chemistry*, 24, 545-552.
- Zhao, J., Yao, S. y Lin, D. (2009). *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 17, 678-687.
- Zhao, X., Ao, Q., Du, F. y Zhu, Q. (2010). *Food Analytical Methods, in Press*, 1-8.
- Zhou, M., Cai, C., Liu, J., Wang, Q., Wu, W. y He, P. (2010). *Journal of Applied Phycology*, 22, 459-464.
- Zilinskas, B.A., Zimmerman, B.K. y Gantt, E. (1978). *Photochemistry and Photobiology*, 27, 587-595.
- Zola, H., Flego, L. y Sheldon, A. (1992). *Immunobiology*, 185, 350-365.
- Zulauf, M. y Eicke, H.F. (1979). *Journal Physical Chemistry*, 83, 480-486.

7.

ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 4.23

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluídas en las etapas de aplicación y lavado de CALE (columna 1'5 cm) para el extracto de C-PC de *Anabaena marina*.

NºTUBO	VOL.TUBO	VOL.MEDIO	A _{615 co}
0	17'5	8'75	0'005
1	7'6	21'3	0'001
2	7'9	29'05	0
3	8'0	37	0
4	7'9	44'95	0
5	7'9	52'85	0
6	7'9	60'75	0'002
7	7'9	68'65	0'001
8	7'9	76'55	0'008
9	8'0	84'5	0'015
10	7'9	92'45	0'021
11	7'9	100'35	0'025
12	8'0	108'3	0'031
13	8'0	116'3	0'035
14	7'9	124'25	0'038
15	8'0	132'2	0'042
16	8'0	140'2	0'046
17	7'9	148'15	0'048
18	8'0	156'1	0'050
19	7'9	164'05	0'053
20	8'0	172	0'055
21	8'0	180	0'057
22	8'0	188	0'060
23	8'0	196	0'060
24	8'0	204	0'063
25	8'0	212	0'065
26	8'0	220	0'065
27	8'0	228	0'067
28	8'0	236	0'070
29	7'9	243'95	0'069
30	8'0	251'9	0'070
31	8'4	260'1	0'072
32	8'7	268'65	0'073
33	8'2	277'1	0'079
34	8'3	285'35	0'078
35	8'3	293'65	0'068
36	8'2	301'9	0'062
37	8'3	310'15	0'055
38	8'2	318'4	0'049
39	8'2	326'6	0'044

NºTUBO	VOL.TUBO	VOL.MEDIO	A _{615 co}
40	8'3	334'85	0'042
41	8'3	343'15	0'040
42	8'8	351'7	0'035
43	8'3	360'25	0'036
44	8'3	368'55	0'035
45	8'2	376'8	0'035
46	8'3	385'05	0'034
47	8'3	393'35	0'031
48	8'2	401'6	0'031
49	8'2	409'8	0'031
50	8'3	418'05	0'030
51	8'2	426'3	0'030
52	8'2	434'5	0'028
53	8'4	442'8	0'028
54	8'3	451'15	0'026
55	8'2	459'4	0'025
56	3'1	465'05	0'024

Tabla 4.24

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en la etapa de elución de CALE.

(Continuación de la Tabla 4.23)

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
57	0'0128	0'0033	0'0016	0'002	0'012	6'0	1	469'6
58	0'0210	0'0054	0'0019	0'003	0'016	4'8	1	475
59	0'0258	0'0083	0'0040	0'004	0'017	4'7	1	479'75
60	0'025	0'0069	0'0017	0'004	0'019	5'0	1	484'6
61	0'026	0'0054	0'0012	0'004	0'021	5'0	1	489'6
62	0'554	0'0066	0'0025	0'103	0'484	4'7	1	494'45
63	0'710	0'196	0'0036	0'115	0'554	4'8	1	499'2
64	4'800	0'344	0'0070	0'713	3'423	4'8	6	504
65	3'858	0'399	0'0060	0'509	2'541	5'0	6	508'9
66	3'000	0'300	0'0052	0'400	2'081	5'2	6	514
67	4'254	0'220	0'0046	0'678	3'388	5'0	6	519'1
68	1'578	0'305	0'0063	0'213	1'065	5'0	3	524'1
69	1'116	0'219	0'0100	0'148	0'741	5'0	3	529'1
70	2'571	0'149	0'0056	0'440	2'422	5'5	3	534'35
71	0'743	0'358	0'0055	0'107	0'621	5'8	1	540
72	0'628	0'323	0'0150	0'088	0'395	4'5	1	545'15
73	0'628	0'269	0'0040	0'094	0'421	4'5	1	549'65
74	0'481	0'206	0'0037	0'072	0'358	5'0	1	554'4
75	0'387	0'165	0'0039	0'058	0'276	4'8	1	559'3
76	0'311	0'132	0'0029	0'046	0'255	5'5	1	564'45

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
77	0'283	0'123	0'0064	0'042	0'208	5'0	1	569'7
78	0'248	0'109	0'0056	0'036	0'167	4'6	1	574'5
79	0'228	0'098	0'0023	0'034	0'159	4'7	1	579'15
80	0'206	0'090	0'0033	0'030	0'136	4'5	1	583'75
82	0'163	0'070	0'0019	0'024	0'109	4'5	1	588'25
83	0'132	0'057	0'0022	0'019	0'090	4'6	1	592'8
84	0'111	0'047	0'0006	0'017	0'086	5'2	1	597'7
85	0'091	0'040	0'0038	0'013	0'072	5'5	1	603'05
86	0'074	0'033	0'0044	0'010	0'049	4'7	1	608'15
87	0'084	0'047	0'0201	0'010	0'040	4'2	1	612'6
88	0'051	0'022	0'0016	0'007	0'045	6'0	1	617'7
89	0'048	0'021	0'0024	0'007	0'019	2'8	1	622'1
90	0'041	0'017	0'0016	0'006	0'028	4'6	1	625'8
91	0'035	0'015	0'0011	0'005	0'025	4'8	1	630'5
92	0'030	0'012	0'0004	0'005	0'022	4'9	1	635'35
93	0'028	0'011	0'0011	0'004	0'019	4'6	1	640'1
94	0'026	0'010	0'0007	0'004	0'019	5'0	1	644'9
95	0'024	0'012	0'0050	0'003	0'089	31'0	1	662'9
96	0'017	0'001	0'0058	0'002	0'048	27'0	1	691'9
TOTAL					20'54	86'1% (20'54/23'86) · 100		

A_{615co}= Absorbancia corregida utilizando el factor de dilución.

FD= Factor de dilución.

Tabla 4.25

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluídas en las etapas de aplicación y lavado de CALE para el extracto de C-PC de *Spirulina platensis*.

NºTUBO	VOL.TUBO	VOL.MEDIO	A _{615 co.}
1	3	1'5	0
2	3	4'5	0
...			
14	4	50	0'004
16	4	58	0'023
18	4	66	0'049
20	4	74	0'086
22	4	82	0'119
24	4	90	0'141
26	4	98	0'161
28	4	106	0'178
30	4	114	0'171
32	4	122	0'129
34	4	130	0'112
36	4	138	0'099
38	4	146	0'074
40	4	154	0'056
42	4	162	0'045
44	4	170	0'037
46	4	178	0'026
48	4	186	0'022
50	4	194	0'015
52	4	202	0'016
54	4	210	0'013

Tabla 4.26

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluídas en la etapa de elución de CALE.

(Continuación de la Tabla 4.25)

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
69	0'016	0'004	0'0015	0'003	0'016	6'5	1	215'2
70	0'016	0'003	0'0003	0'003	0'017	6'5	1	221'7
71	0'015	0'002	0'0000	0'003	0'017	6'5	1	228'2
72	0'018	0'004	0'0008	0'003	0'025	8'5	1	235'7
73	0'195	0'044	0'0006	0'033	0'065	2'0	1	241
74	1'023	0'255	0'0022	0'169	0'338	2'0	1	243
75	1'862	0'236	0'0063	0'306	0'612	2'0	2	245
76	2'373	0'198	0'0034	0'391	0'782	2'0	3	247
77	2'814	0'235	0'0039	0'464	1'159	2'5	3	249'2
78	3'039	0'256	0'0043	0'500	1'050	2'1	3	251'5

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
79	3'186	0'269	0'0048	0'524	1'048	2'0	3	253'6
80	3'123	0'266	0'0046	0'513	1'026	2'0	3	255'6
81	3'183	0'275	0'0044	0'522	1'044	2'0	3	257'6
82	3'029	0'266	0'0056	0'495	1'040	2'1	3	259'7
83	2'838	0'251	0'0067	0'463	0'926	2'0	3	261'7
84	2'604	0'229	0'0049	0'426	0'894	2'1	3	263'7
85	2'394	0'211	0'0027	0'392	0'784	2'0	3	265'8
86	2'151	0'197	0'0079	0'348	0'662	1'9	3	267'7
87	1'881	0'171	0'0059	0'305	0'611	2'0	3	269'7
88	1'696	0'234	0'0060	0'275	0'550	2'0	2	271'7
89	1'536	0'213	0'0037	0'249	0'499	2'0	2	273'7
90	1'374	0'193	0'0049	0'222	0'445	2'0	2	275'7
91	1'248	0'178	0'0060	0'201	0'402	2'0	2	277'7
92	1'112	0'16	0'0059	0'179	0'358	2'0	2	279'7
93	0'961	0'281	0'0051	0'155	0'309	2'0	1	281'7
94	0'845	0'247	0'0022	0'136	0'273	2'0	1	283'7
95	0'802	0'236	0'0022	0'129	0'258	2'0	1	285'7
96	0'769	0'227	0'0020	0'124	0'248	2'0	1	287'7
97	0'705	0'210	0'0022	0'113	0'227	2'0	1	289'7
98	0'648	0'194	0'0014	0'104	0'208	2'0	1	291'7
99	0'580	0'176	0'0013	0'093	0'186	2'0	1	293'7
100	0'527	0'162	0'0014	0'084	0'169	2'0	1	295'7
102	0'458	0'143	0'0008	0'073	0'270	3'7	1	298'5
104	0'398	0'126	0'0006	0'063	0'254	4'0	1	302'4
106	0'346	0'111	0'0002	0'055	0'220	4'0	1	306'4
108	0'297	0'098	0'0008	0'047	0'188	4'0	1	310'4
110	0'244	0'083	0'0012	0'038	0'153	4'0	1	314'4
112	0'201	0'071	0'0004	0'031	0'126	4'0	1	318'4
114	0'175	0'063	0'0000	0'027	0'109	4'0	1	322'4
116	0'151	0'056	0'0002	0'023	0'093	4'0	1	326'4
118	0'140	0'055	0'0040	0'021	0'086	4'1	1	330'4
120	0'119	0'045	0'0005	0'018	0'075	4'1	1	334'5
122	0'103	0'040	0'0001	0'016	0'065	4'1	1	338'6
124	0'091	0'036	0'0000	0'014	0'058	4'2	1	342'8
126	0'083	0'033	0'0000	0'013	0'052	4'1	1	347
128	0'078	0'031	0'0000	0'012	0'048	4'1	1	351
130	0'072	0'030	0'0011	0'011	0'044	4'1	1	355
132	0'066	0'027	0'0002	0'010	0'040	4'0	1	359
134	0'058	0'024	0'0000	0'009	0'035	4'0	1	363
136	0'054	0'022	0'0000	0'008	0'033	4'1	1	367
138	0'051	0'021	0'0000	0'008	0'000	4'0	1	369
TOTAL					18'2	75'5% (18'2/24'1) · 100		

Tabla 4.27

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluídas en las etapas de aplicación y lavado de CALE para el extracto de C-PC de *Synechocystis aquatilis*.

NºTUBO	VOL.TUBO	VOL.MEDIO	A _{615co}
2	19	38'5	0'010
3	19	57'5	0'240
6	19	114'5	0'530
9	19	171'5	0'687
12	19	228'5	0'787
15	19	285'5	0'866
18	18	342	0'153
21	19	397'5	0'047
24	19	453'5	0'025
27	19	510'5	0'020
29	19	548'5	0'021
32	10	601	0'017

Tabla 4.28

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluídas en la etapa de elución de CALE.

(Continuación de la Tabla 4.27)

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
34	0'015	0'009	0'0060	0'001	0'022	16'0	1	614
35	0'023	0'011	0'0049	0'003	0'019	7'0	1	625'5
36	0'717	0'286	0'0048	0'109	0'543	5'0	1	631'5
37	11'712	0'430	0'0064	1'731	10'389	6'0	12	637
38	17'731	0'511	0'0099	2'540	14'729	5'8	17	642'9
39	17'675	0'353	0'0074	2'515	16'346	6'5	25	649'1
40	14'225	0'280	0'0236	1'990	16'908	8'5	25	656'5
41	10'150	0'197	0'0158	1'428	10'142	7'1	25	664'3
42	7'750	0'182	0'0131	1'105	8'839	8'0	20	671'9
43	6'220	0'286	0'0123	0'901	7'297	8'1	10	679'9
44	4'690	0'217	0'0196	0'668	5'810	8'7	10	688'3
45	3'720	0'175	0'0270	0'516	4'694	9'1	10	697'2
46	2'625	0'389	0'0359	0'378	4'350	11'5	3	707'5
47	2'001	0'294	0'0014	0'297	3'115	10'5	3	718'5
48	1'761	0'260	0'0033	0'260	2'342	9'0	3	728'3
49	1'449	0'215	0'0078	0'212	2'314	10'9	3	738'2
50	1'050	0'230	0'0052	0'155	2'001	12'9	2	750'1
51	0'780	0'171	0'0077	0'114	1'419	12'4	2	762'8
52	0'583	0'253	0'0004	0'087	1'303	15'0	1	776'5
53	0'444	0'191	0'0008	0'066	0'992	15'0	1	791'5
54	0'338	0'142	0'0000	0'051	1'016	20'0	1	809

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
55	0'254	0'107	0'0000	0'038	0'534	14'0	1	826
56	0'194	0'081	0'0000	0'030	0'554	19'0	1	842'5
57	0'153	0'063	0'0000	0'023	0'462	20'0	1	862
58	0'114	0'046	0'0000	0'017	0'346	20'0	1	882
59	0'088	0'035	0'0000	0'013	0'307	23'0	1	903'5
60	0'065	0'025	0'0000	0'010	0'321	32'0	1	931
61	0'038	0'013	0'0000	0'006	0'375	63'0	1	978'5
62	0'021	0'005	0'0000	0'003	0'190	56'0	1	1038
63	0'014	0'003	0'0000	0'002	0'143	62'0	1	1097
64	0'015	0'005	0'0007	0'002	0'074	33'0	1	1144'5
TOTAL					117'90	90'8% (117'9/129'8) · 100		

A_{615co}= Absorbancia corregida utilizando el factor de dilución.

FD= Factor de dilución.

ANEXO 2

Tabla 4.30

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en las etapas de aplicación y lavado de CALE para el extracto de C-PC de *Anabaena marina* para la columna de 2'5 cm de diámetro.

NºTUBO	VOL.TUBO	VOL.MEDIO	A _{615 co}
1	33	103'5	0'001
3	33	168'5	0'001
5	33	233'5	0'034
7	33	298'5	0'045
9	33	363'5	0'063
11	33	428'5	0'072
13	33	493'5	0'081
15	32	558	0'084
17	33	622'5	0'093
19	33	687'5	0'096
21	32	752	0'103
23	32	816	0'088
25	33	880'5	0'062
27	32	946	0'046
30	33	1011'5	0'038
32	33	1077'5	0'030
34	33	1143'5	0'027
36	33	1209'5	0'025
38	34	1276	0'026
40	32	1342	0'023
42	32	1407	0'022

Tabla 4.31

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en la etapa de elución de CALE.

(Continuación de la Tabla 4.30)

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
1	0'017	0'006	0'0030	0'002	0'032	13	1	1396'5
2	0'012	0'001	0'0000	0'002	0'024	11	1	1408'5
3	0'011	0'001	0'0000	0'002	0'022	11	1	1419'5
4	0'012	0'001	0'0000	0'002	0'028	13	1	1431'5
5	0'012	0'001	0'0000	0'002	0'023	11	1	1443'5
6	0'012	0'000	0'0000	0'002	0'026	12	1	1455
7	0'099	0'027	0'0000	0'016	0'211	13	1	1467'5
8	1'782	0'260	0'0113	0'262	3'664	14	3	1481
9	3'156	0'539	0'0059	0'447	5'810	13	3	1494'5
10	3'732	0'505	0'0132	0'516	6'706	13	4	1507'5
11	3'356	0'457	0'0045	0'466	5'590	12	4	1520
12	2'716	0'363	0'0044	0'379	4'929	13	4	1532'5
13	2'166	0'381	0'0038	0'304	3'648	12	3	1545
14	1'713	0'298	0'0099	0'239	3'109	13	3	1557'5
15	1'296	0'222	0'0075	0'182	2'365	13	3	1570'5
16	1'029	0'173	0'0037	0'146	2'043	14	3	1584
17	0'852	0'145	0'0051	0'120	1'437	12	3	1597
18	0'734	0'186	0'0001	0'105	1'362	13	2	1609'5
19	0'613	0'317	0'0000	0'087	1'043	12	1	1622
20	0'534	0'275	0'0007	0'076	0'909	12	1	1634
21	0'463	0'239	0'0002	0'066	0'788	12	1	1646
22	0'391	0'201	0'0000	0'056	0'722	13	1	1658'5
23	0'346	0'178	0'0000	0'049	0'588	12	1	1671
24	0'291	0'149	0'0000	0'041	0'497	12	1	1683
25	0'257	0'132	0'0001	0'036	0'438	12	1	1695
26	0'235	0'121	0'0002	0'033	0'400	12	1	1707
27	0'202	0'103	0'0000	0'029	0'345	12	1	1719
28	0'177	0'091	0'0000	0'025	0'302	12	1	1731
29	0'154	0'078	0'0000	0'022	0'331	15	1	1744'5
30	0'149	0'077	0'0030	0'021	0'250	12	1	1758
31	0'121	0'061	0'0000	0'017	0'208	12	1	1770
32	0'100	0'049	0'0000	0'014	0'187	13	1	1782'5
33	0'084	0'041	0'0000	0'012	0'158	13	1	1795'5
34	0'070	0'033	0'0000	0'010	0'123	12	1	1808
35	0'070	0'033	0'0000	0'010	0'123	12	1	1820
36	0'055	0'025	0'0000	0'008	0'106	13	1	1832'5
37	0'047	0'021	0'0000	0'007	0'084	12	1	1845
38	0'044	0'020	0'0000	0'006	0'078	12	1	1857
39	0'039	0'017	0'0000	0'006	0'075	13	1	1869'5

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
40	0'036	0'016	0'0000	0'005	0'065	12	1	1882
41	0'037	0'016	0'0000	0'005	0'055	10	1	1893
42	0'031	0'013	0'0000	0'005	0'047	10	1	1903
43	0'028	0'012	0'0000	0'004	0'043	10	1	1913
44	0'026	0'011	0'0000	0'004	0'039	10	1	1923
45	0'023	0'009	0'0000	0'004	0'035	10	1	1933
46	0'020	0'006	0'0000	0'003	0'031	10	1	1943
47	0'017	0'004	0'0000	0'003	0'027	10	1	1953
48	0'020	0'008	0'0001	0'003	0'031	10	1	1963
49	0'017	0'035	0'0000	0'000	0'002	13	1	1974'5
50	0'017	0'003	0'0000	0'003	0'029	10	1	1986
51	0'025	0'016	0'0044	0'003	0'029	10	1	1996
52	0'015	0'005	0'0000	0'002	0'028	12	1	2007
53	0'014	0'005	0'0000	0'002	0'022	10	1	2018
54	0'014	0'004	0'0000	0'002	0'022	10	1	2028
55	0'017	0'007	0'0016	0'002	0'023	10	1	2038
56	0'012	0'004	0'0000	0'002	0'020	10	1	2048
57	0'011	0'004	0'0000	0'002	0'018	10	1	2058
58	0'011	0'003	0'0000	0'002	0'017	10	1	2068
59	0'010	0'003	0'0000	0'002	0'017	10	1	2078
60	0'010	0'003	0'0000	0'002	0'016	10	1	2088
61	0'009	0'003	0'0000	0'002	0'015	10	1	2098
62	0'009	0'003	0'0000	0'001	0'018	12	1	2109
63	0'008	0'002	0'0000	0'001	0'014	10	1	2120
64	0'008	0'002	0'0000	0'001	0'013	10	1	2130
65	0'008	0'002	0'0000	0'001	0'013	10	1	2140
66	0'008	0'002	0'0000	0'001	0'013	10	1	2150
67	0'008	0'002	0'0000	0'001	0'013	10	1	2160
68	0'007	0'002	0'0000	0'001	0'011	10	1	2170
TOTAL					54'6	82'8% (54'6/66) · 100		

A_{615co}= Absorbancia corregida utilizando el factor de dilución.

FD= Factor de dilución.

Tabla 4.32

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en las etapas de aplicación y lavado de CALE para el extracto de C-PC de *Spirulina platensis* en columna de 2'5 cm de diámetro.

NºTUBO	VOL.·TUBO	VOL.·MEDIO	A _{615 co}
1	12	6	0'004
4	14	19	0'001
6	10	31	0'001
7	12	42	0'001
9	12	54	0'001
12	15	67'5	0'001
14	15	82'5	0'001
15	15	97'5	0'001
17	8	109	0'001
18	8	117	0'001
19	10	126	0'005
20	8	135	0'016
22	9	143'5	0'054
24	9	152'5	0'100
25	8	161	0'123
26	8	169	0'148
27	8	177	0'160
28	8	185	0'183
29	8	193	0'210
30	8	201	0'238
32	8	217	0'260
34	8	233	0'267
36	8	249	0'270
38	8	265	0'275
40	9	281'5	0'275
42	9	298'5	0'271
44	8	315	0'231
47	8	339	0'186
50	9	363'5	0'199
53	8	388	0'146
56	9	412'5	0'118
59	8	437	0'113
62	8	461	0'095
65	8	485	0'073
68	8	509	0'059
71	8	533	0'061
74	8	557	0'053
77	8	581	0'028
80	8	605	0'024
83	8	629	0'017

NºTUBO	VOL.TUBO	VOL.MEDIO	A _{615 co}
86	8	653	0'014
90	8	677	0'012

Tabla 4.33

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en la etapa de elución de CALE.

(Continuación de la Tabla 4.32)

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
105	0'020	0'003	0'0000	0'004	0'124	35	1	698'5
106	0'020	0'003	0'0000	0'003	0'119	35	1	733'5
107	0'021	0'003	0'0000	0'004	0'069	19	1	760'5
108	0'019	0'003	0'0000	0'003	0'036	11	1	775'5
109	0'019	0'003	0'0000	0'003	0'026	8	1	785
110	0'020	0'003	0'0002	0'003	0'024	7	1	792'5
111	0'042	0'008	0'0006	0'007	0'018	2'5	1	797'25
112	1'000	0'100	0'0010	0'178	0'856	4'8	1	800'9
114	1'329	0'335	0'0032	0'219	0'657	3	1	804'8
115	1'670	0'218	0'0046	0'273	0'711	2'6	2	807'6
116	2'218	0'290	0'0070	0'363	0'944	2'6	2	810'2
117	2'733	0'240	0'0072	0'446	1'160	2'6	3	812'8
118	3'090	0'271	0'0082	0'505	1'312	2'6	3	815'4
119	3'420	0'224	0'0054	0'560	1'455	2'6	4	818
120	3'804	0'254	0'0108	0'619	1'608	2'6	4	820'6
121	3'960	0'260	0'0106	0'646	1'680	2'6	4	823'2
122	4'032	0'265	0'0105	0'658	1'710	2'6	4	825'8
123	4'007	0'263	0'0098	0'654	1'700	2'6	4	828'4
124	3'872	0'254	0'0085	0'632	1'644	2'6	4	831
125	3'360	0'223	0'0062	0'548	2'467	4'5	4	834'55
125	3'116	0'211	0'0091	0'506	2'629	5'2	4	839'4
125	2'804	0'189	0'0044	0'457	1'416	3'1	4	843'55
126	2'668	0'179	0'0028	0'435	1'176	2'7	4	846'45
127	2'528	0'175	0'0080	0'409	1'062	2'6	4	849'1
128	2'312	0'160	0'0059	0'374	0'973	2'6	4	851'7
129	2'100	0'147	0'0064	0'339	0'881	2'6	4	854'3
130	1'952	0'136	0'0049	0'316	0'821	2'6	4	856'9
131	1'874	0'264	0'0079	0'303	0'788	2'6	2	859'5
132	1'796	0'251	0'0053	0'291	0'757	2'6	2	862'1
133	1'746	0'247	0'0078	0'282	0'733	2'6	2	864'7
134	1'696	0'238	0'0063	0'274	0'714	2'6	2	867'3
135	1'646	0'234	0'0063	0'266	0'691	2'6	2	869'9
136	1'588	0'227	0'0067	0'256	0'666	2'6	2	872'5
137	1'486	0'212	0'0053	0'240	0'624	2'6	2	875'1
138	1'400	0'200	0'0055	0'226	0'565	2'5	2	877'65

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
139	1'352	0'195	0'0055	0'218	0'544	2'5	2	880'15
140	1'278	0'185	0'0056	0'206	0'535	2'6	2	882'7
141	1'180	0'173	0'0052	0'189	0'853	4'5	2	886'25
142	1'114	0'326	0'0049	0'179	0'646	3'6	1	890'3
143	1'026	0'292	0'0028	0'166	0'582	3'5	1	893'85
144	0'953	0'273	0'0017	0'154	0'540	3'5	1	897'35
145	0'881	0'253	0'0018	0'143	0'499	3'5	1	900'85
146	0'798	0'231	0'0017	0'129	0'451	3'5	1	904'35
147	0'732	0'215	0'0018	0'118	0'413	3'5	1	907'85
148	0'684	0'203	0'0021	0'110	0'385	3'5	1	911'35
149	0'639	0'191	0'0013	0'103	0'360	3'5	1	914'85
150	0'592	0'179	0'0012	0'095	0'332	3'5	1	918'35
152	0'541	0'167	0'0018	0'086	0'605	7	1	923'6
154	0'472	0'148	0'0018	0'075	0'527	7	1	930'6
156	0'410	0'131	0'0015	0'065	0'456	7	1	937'6
158	0'361	0'118	0'0022	0'057	0'399	7	1	944'6
160	0'322	0'107	0'0008	0'051	0'356	7	1	951'6
162	0'291	0'098	0'0012	0'046	0'389	8'5	1	959'35
164	0'261	0'088	0'0008	0'041	0'337	8'2	1	967'7
167	0'239	0'081	0'0007	0'038	0'451	12	1	977'8
170	0'212	0'073	0'0008	0'033	0'398	12	1	989'8
174	0'171	0'060	0'0003	0'027	0'374	14	1	1002'8
177	0'145	0'052	0'0007	0'023	0'315	14	1	1016'8
178	0'144	0'050	0'0001	0'023	0'406	18	1	1032'8
179	0'142	0'046	0'0005	0'022	0'607	27	1	1055'3
180	0'062	0'022	0'0010	0'010	0'756	79	1	1108'3
TOTAL					49'71	74'2% (49'71/67) · 100		

A_{615co}= Absorbancia corregida utilizando el factor de dilución.

FD= Factor de dilución.

Tabla 4.34

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en las etapas de aplicación y lavado de CALE en columna de 2'5 cm de diámetro para el extracto de C-PC de *Synechocystis aquatilis*.

NºTUBO	VOL.TUBO	VOL.MEDIO	A _{615 co}
1	34	17'0	0'000
3	34	85'0	0'000
5	34	153'0	0'048
7	34	221'0	0'188
9	34	289'0	0'290
11	35	357'5	0'351
13	34	426'0	0'401
15	34	494'0	0'443
17	35	562'5	0'473
19	34	631'0	0'509
21	34	699'0	0'527
23	34	767'0	0'560
25	34	835'0	0'384
27	34	903'0	0'225
29	34	971'0	0'132
31	34	1039'0	0'084
33	34	1107'0	0'055
35	34	1175'0	0'035
37	35	1243'5	0'034
40	34	1312'0	0'029
43	32	1413'0	0'025

Tabla 4.35

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en la etapa de elución de CALE.

(Continuación de la Tabla 4.34)

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
44	0'016	0'008	0'0038	0'002	0'053	29	1	1443'5
45	0'014	0'008	0'0039	0'002	0'047	29	1	1472'5
47	0'018	0'008	0'0031	0'002	0'018	8	1	1491'0
48	0'047	0'019	0'0028	0'007	0'038	5'5	1	1497'8
49	0'123	0'050	0'0029	0'018	0'075	4'1	1	1502'6
50	0'519	0'216	0'0034	0'078	0'366	4'7	1	1507'0
51	2'213	0'295	0'0080	0'334	2'339	7	3	1512'8
52	7'720	0'316	0'0236	1'144	5'378	4'7	10	1518'7
53	11'724	0'160	0'0080	1'748	7'867	4'5	30	1523'3
54	16'200	0'235	0'0145	2'369	10'660	4'5	30	1527'8
55	19'911	0'305	0'0184	2'869	14'343	5	30	1532'5
56	22'512	0'348	0'0055	3'281	15'419	4'7	30	1537'4

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
57	23'490	0'373	0'0061	3'396	18'337	5'4	30	1542'4
58	20'070	0'323	0'0056	2'889	15'889	5'5	30	1547'9
59	22'680	0'378	0'0101	3'219	19'315	6	30	1553'6
60	16'338	0'267	0'0043	2'342	12'645	5'4	30	1559'3
61	18'629	0'305	0'0030	2'674	14'708	5'5	30	1564'8
62	18'630	0'307	0'0120	2'643	17'178	6'5	30	1570'8
63	15'210	0'242	0'0027	2'201	14'309	6'5	30	1577'3
64	15'017	0'236	0'0039	2'178	12'634	5'8	30	1583'4
65	12'300	0'189	0'0034	1'794	11'663	6'5	30	1589'6
66	10'150	0'235	0'0071	1'473	9'424	6'4	20	1596'0
67	9'766	0'454	0'0042	1'425	9'550	6'7	10	1602'6
68	8'310	0'381	0'0050	1'216	8'515	7	10	1609'4
69	7'530	0'340	0'0042	1'107	7'194	6'5	10	1616'2
70	6'516	0'294	0'0079	0'954	6'199	6'5	10	1622'7
71	6'020	0'268	0'0045	0'887	6'210	7	10	1629'4
72	5'850	0'260	0'0025	0'864	15'555	18	10	1641'9
74	4'797	0'211	0'0042	0'708	12'752	18	10	1659'9
76	3'770	0'164	0'0045	0'557	11'144	20	10	1678'9
78	2'907	0'431	0'0069	0'429	8'999	21	3	1699'4
80	2'510	0'373	0'0124	0'368	7'723	21	3	1720'4
82	1'826	0'266	0'0100	0'269	5'374	20	3	1740'9
84	1'524	0'216	0'0046	0'227	5'221	23	3	1762'4
86	1'052	0'151	0'0086	0'155	7'738	50	3	1798'9
88	0'804	0'117	0'0094	0'117	6'665	57	3	1852'4
90	0'504	0'075	0'0114	0'071	6'042	85	3	1923'4
93	0'329	0'137	0'0006	0'049	1'485	30	1	1980'9
95	0'258	0'107	0'0015	0'039	2'090	54	1	2022'9
96	0'192	0'079	0'0005	0'029	0'869	30	1	2064'9
97	0'159	0'065	0'0007	0'024	0'722	30	1	2094'9
98	0'133	0'054	0'0004	0'020	0'626	31	1	2125'4
99	0'115	0'045	0'0005	0'017	0'539	31	1	2156'4
100	0'099	0'039	0'0008	0'015	0'480	32	1	2187'9
101	0'086	0'033	0'0003	0'013	0'408	31	1	2219'4
102	0'068	0'024	0'0007	0'011	1'237	117	1	2293'4
103	0'055	0'019	0'0019	0'009	1'022	120	1	2411'9
104	0'030	0'009	0'0006	0'005	0'575	120	1	2531'9
105	0'026	0'007	0'0007	0'004	0'542	130	1	2656'9
TOTAL					334'45	92'7% (334'45/360'79) · 100		

A_{615co}= Absorbancia corregida utilizando el factor de dilución.

FD= Factor de dilución.

ANEXO 3

Tabla 4.37

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en las etapas de aplicación y lavado de CALE para el extracto de C-PC de *Anabaena marina* para la columna de 4 cm de diámetro.

NºTUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A _{615 co}
1	29	114'5	0'000
2	29	243'5	0'001
3	28	372	0'011
4	30	501	0'021
5	29	630'5	0'030
6	29	759'5	0'045
7	29	888'5	0'049
8	29	1017'5	0'057
9	30	1147	0'061
10	30	1277	0'064
11	30	1407	0'069
12	30	1537	0'071
13	29	1666'5	0'075
14	30	1796	0'080
15	30	1926	0'062
16	30	2056	0'049
17	30	2186	0'037
18	31	2316'5	0'032
19	36	2450	0'029
20	30	2583	0'026
21	30	2713	0'025
22	29	2842'5	0'024
23	29	2971'5	0'023
24	29	3100'5	0'023
25	29	3229'5	0'023
26	30	3359	0'022

Tabla 4.38

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en la etapa de elución de CALE.

(continuación de la Tabla 4.37)

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
29	0'026	0'008	0'0028	0'004	0'062	16	1	3382
30	0'028	0'005	0'0004	0'005	0'077	16	1	3398
31	0'030	0'006	0'0002	0'005	0'086	17	1	3414'5
32	0'031	0'007	0'0014	0'005	0'080	16	1	3431
33	0'029	0'005	0'0000	0'005	0'081	16	1	3447
34	0'031	0'005	0'0000	0'005	0'089	17	1	3463'5
35	0'034	0'008	0'0037	0'005	0'083	16	1	3480
36	0'029	0'005	0'0000	0'005	0'086	17	1	3496'5
37	0'030	0'005	0'0002	0'005	0'082	16	1	3513
38	0'030	0'005	0'0000	0'005	0'082	16	1	3529
39	0'030	0'005	0'0004	0'005	0'087	17	1	3545'5
40	0'067	0'017	0'0003	0'011	0'189	17	1	3562'5
41	1'044	0'089	0'0089	0'161	2'570	16	4	3579
42	4'042	0'454	0'0161	0'591	10'044	17	4	3595'5
43	6'438	0'519	0'0119	0'924	15'716	17	6	3612'5
44	7'156	0'499	0'0167	1'021	16'337	16	7	3629
45	6'848	0'406	0'0067	0'991	15'859	16	8	3645
46	6'000	0'352	0'0090	0'869	13'902	16	8	3661
47	5'152	0'297	0'0076	0'750	11'994	16	8	3677
48	4'456	0'261	0'0184	0'636	9'545	15	8	3692'5
49	3'688	0'208	0'0079	0'538	8'069	15	8	3707'5
50	3'192	0'179	0'0095	0'464	6'964	15	8	3722'5
51	2'598	0'192	0'0076	0'381	5'709	15	6	3737'5
53	1'452	0'160	0'0057	0'213	3'200	15	4	3752'5
54	1'776	0'410	0'0130	0'258	3'611	14	2	3767
55	1'574	0'360	0'0089	0'230	3'215	14	2	3781
56	1'288	0'295	0'0091	0'187	2'624	14	2	3795
57	1'078	0'245	0'0070	0'157	2'046	13	2	3808'5
58	0'944	0'217	0'0076	0'137	1'782	13	2	3821'5
59	0'811	0'379	0'0056	0'118	1'532	13	1	3834'5
60	0'670	0'313	0'0043	0'097	1'462	15	1	3848'5
61	0'545	0'258	0'0040	0'079	1'106	14	1	3863
62	0'455	0'215	0'0050	0'066	0'789	12	1	3876
63	0'385	0'181	0'0031	0'056	0'782	14	1	3889
64	0'336	0'159	0'0033	0'049	0'632	13	1	3902'5
65	0'292	0'138	0'0031	0'042	0'506	12	1	3915
66	0'262	0'123	0'0024	0'038	0'456	12	1	3927
67	0'239	0'113	0'0030	0'035	0'414	12	1	3939
68	0'197	0'093	0'0026	0'028	0'313	11	1	3950'5

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
69	0'168	0'078	0'0014	0'024	0'293	12	1	3962
70	0'153	0'071	0'0012	0'022	0'245	11	1	3973'5
71	0'138	0'064	0'0019	0'020	0'240	12	1	3985
72	0'130	0'060	0'0021	0'019	0'226	12	1	3997
73	0'112	0'052	0'0021	0'016	0'211	13	1	4009'5
74	0'101	0'046	0'0013	0'015	0'176	12	1	4022
75	0'093	0'042	0'0013	0'014	0'176	13	1	4034'5
76	0'084	0'039	0'0018	0'012	0'145	12	1	4047
77	0'078	0'036	0'0019	0'011	0'135	12	1	4059
78	0'070	0'032	0'0012	0'010	0'123	12	1	4071
79	0'068	0'031	0'0013	0'010	0'118	12	1	4083
80	0'059	0'026	0'0021	0'008	0'102	12	1	4095
81	0'053	0'024	0'0015	0'008	0'093	12	1	4107
82	0'050	0'022	0'0015	0'007	0'116	16	1	4121
83	0'048	0'021	0'0022	0'007	0'075	11	1	4134'5
84	0'043	0'019	0'0024	0'006	0'080	13	1	4146'5
85	0'039	0'017	0'0010	0'006	0'074	13	1	4159'5
86	0'038	0'017	0'0019	0'005	0'064	12	1	4172
87	0'033	0'013	0'0006	0'005	0'055	11	1	4183'5
88	0'030	0'012	0'0000	0'005	0'055	12	1	4195
89	0'029	0'010	0'0000	0'004	0'053	12	1	4207
90	0'028	0'010	0'0000	0'004	0'053	12	1	4219
91	0'026	0'009	0'0000	0'004	0'048	12	1	4231
92	0'026	0'010	0'0006	0'004	0'058	15	1	4244'5
93	0'024	0'009	0'0000	0'004	0'034	9	1	4256'5
94	0'026	0'009	0'0005	0'004	0'047	12	1	4267
95	0'027	0'012	0'0034	0'004	0'045	12	1	4279
96	0'021	0'007	0'0002	0'003	0'033	10	1	4290
97	0'021	0'008	0'0016	0'003	0'101	34	1	4312
98	0'017	0'005	0'0000	0'003	0'052	20	1	4339
99	0'016	0'005	0'0000	0'003	0'053	21	1	4359'5
100	0'014	0'005	0'0000	0'002	0'071	31	1	4385'5
TOTAL					145'7	85'9% (145'7/169'6) · 100		

A_{615co}= Absorbancia corregida utilizando el factor de dilución.

FD= Factor de dilución.

Tabla 4.39

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en las etapas de aplicación y lavado de CALE para el extracto de C-PC de *Spirulina platensis* en columna de 4cm de diámetro.

NºTUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A _{615 co}
1	31'5	45'75	0'000
2	30	106'5	0'000
3	30	166'5	0'000
4	30	226'5	0'000
5	30	286'5	0'000
6	30	346'5	0'001
7	30	406'5	0'019
8	31	467	0'050
9	31	528	0'090
10	31	589	0'121
11	31'5	650'25	0'139
12	31'5	711'75	0'155
13	31'5	773'25	0'167
14	31'5	834'75	0'158
15	31'5	896'25	0'137
16	31'5	957'75	0'122
17	31	1019	0'087
18	31	1080	0'069
19	31	1141	0'055
20	31	1202	0'040
21	31	1263	0'030
22	28	1322'5	0'023
24	28	1380'5	0'019
25	28	1438'5	0'017
26	31	1498	0'021
27	30	1558'5	0'019
28	31	1619	0'018
29	30	1679'5	0'016
30	31	1740	0'015
31	30	1800'5	0'013
32	31	1861	0'011
33	30	1921'5	0'010
34	30	1981'5	0'009
35	30	2041'5	0'009
36	30	2101'5	0'009

Tabla 4.40

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluídas en la etapa de elución de CALE.

(Continuación de la Tabla 4.39)

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
38	0'018	0'003	0'0002	0'003	0'055	18	1	2155'5
39	0'019	0'002	0'0000	0'003	0'064	19	1	2174
40	0'018	0'003	0'0000	0'003	0'069	22	1	2194'5
41	0'018	0'002	0'0000	0'003	0'060	19	1	2215
42	0'017	0'003	0'0000	0'003	0'053	18	1	2233'5
43	0'016	0'002	0'0000	0'003	0'047	17	1	2251
44	0'017	0'003	0'0000	0'003	0'047	16	1	2267'5
45	0'020	0'003	0'0000	0'003	0'042	12	1	2281'5
46	0'064	0'011	0'0000	0'011	0'121	11	1	2293
47	0'187	0'037	0'0002	0'032	0'159	5	1	2301
48	0'318	0'068	0'0004	0'054	0'268	5	1	2306
49	0'477	0'109	0'0015	0'080	0'239	3	1	2310
50	0'633	0'150	0'0009	0'105	0'316	3	1	2313
51	0'801	0'196	0'0015	0'133	0'398	3	1	2316
52	0'998	0'252	0'0029	0'164	0'576	3'5	1	2319'25
53	1'308	0'126	0'0162	0'207	1'241	6	3	2324
54	1'683	0'155	0'0079	0'272	1'360	5	3	2329'5
55	2'025	0'184	0'0037	0'330	1'648	5	3	2334'5
56	2'403	0'225	0'0081	0'388	2'523	6'5	3	2340'25
57	2'895	0'275	0'0101	0'467	3'266	7	3	2347
58	3'208	0'232	0'0088	0'516	3'351	6'5	4	2353'75
59	3'476	0'250	0'0055	0'561	3'926	7	4	2360'5
60	3'616	0'261	0'0067	0'583	3'204	5'5	4	2366'75
61	3'660	0'266	0'0074	0'589	2'650	4'5	4	2371'75
62	3'760	0'273	0'0066	0'605	2'724	4'5	4	2376'25
63	3'664	0'268	0'0099	0'588	3'821	6'5	4	2381'75
64	3'600	0'261	0'0089	0'579	3'183	5'5	4	2387'75
65	3'580	0'260	0'0080	0'576	3'454	6	4	2393'5
66	3'444	0'249	0'0059	0'555	2'775	5	4	2399
67	3'404	0'245	0'0056	0'549	3'019	5'5	4	2404'25
69	2'976	0'216	0'0069	0'479	5'264	11	4	2412'5
71	3'044	0'221	0'0082	0'489	7'826	16	4	2426
73	2'716	0'195	0'0063	0'437	5'250	12	4	2440
75	2'480	0'178	0'0072	0'399	5'186	13	4	2452'5
77	2'192	0'157	0'0075	0'352	5'284	15	4	2466'5
79	1'890	0'177	0'0054	0'306	5'195	17	3	2482'5
81	1'629	0'152	0'0054	0'263	4'476	17	3	2499'5
83	1'443	0'138	0'0091	0'231	3'697	16	3	2516
85	1'266	0'179	0'0085	0'204	3'262	16	2	2532

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
87	1'110	0'155	0'0056	0'179	2'872	16	2	2548
88	1'032	0'284	0'0041	0'168	1'846	11	1	2561'5
89	0'966	0'265	0'0024	0'157	1'888	12	1	2573
90	0'917	0'252	0'0025	0'149	1'344	9	1	2583'5
91	0'876	0'241	0'0036	0'142	1'425	10	1	2593
92	0'836	0'230	0'0016	0'136	1'226	9	1	2602'5
93	0'801	0'221	0'0014	0'130	1'565	12	1	2613
94	0'758	0'210	0'0018	0'123	1'356	11	1	2624'5
95	0'705	0'195	0'0016	0'115	1'491	13	1	2636'5
96	0'605	0'181	0'0013	0'097	1'361	14	1	2650
97	0'603	0'168	0'0010	0'098	1'373	14	1	2664
98	0'554	0'154	0'0008	0'090	1'262	14	1	2678
99	0'514	0'144	0'0009	0'084	1'253	15	1	2692'5
100	0'480	0'135	0'0009	0'078	1'169	15	1	2707'5
101	0'444	0'126	0'0004	0'072	1'080	15	1	2722'5
103	0'389	0'114	0'0028	0'063	1'751	28	1	2744
105	0'347	0'105	0'0037	0'055	1'607	29	1	2772'5
107	0'304	0'093	0'0037	0'048	1'598	33	1	2803'5
109	0'264	0'081	0'0027	0'042	1'386	33	1	2836'5
111	0'227	0'069	0'0012	0'036	1'344	37	1	2871'5
113	0'196	0'062	0'0015	0'031	1'214	39	1	2909'5
115	0'170	0'054	0'0024	0'027	1'019	38	1	2948
117	0'149	0'048	0'0008	0'024	0'968	41	1	2987'5
119	0'128	0'043	0'0017	0'020	0'861	43	1	3029'5
121	0'112	0'038	0'0013	0'018	0'823	47	1	3074'5
123	0'146	0'047	0'0005	0'023	1'228	53	1	3124'5
125	0'116	0'040	0'0001	0'018	1'039	57	1	3179'5
127	0'073	0'026	0'0000	0'011	0'673	59	1	3237'5
129	0'061	0'024	0'0027	0'009	0'522	58	1	3296
131	0'048	0'018	0'0000	0'007	0'438	59	1	3354'5
133	0'055	0'020	0'0000	0'009	0'529	62	1	3415
137	0'041	0'017	0'0016	0'006	0'563	92	1	3492
141	0'041	0'015	0'0000	0'006	0'587	92	1	3584
142	0'027	0'011	0'0011	0'004	0'979	248	1	3754
143	0'014	0'006	0'0004	0'002	0'186	90	1	3923
TOTAL					131'22	76'5% (131'22/171'53)·100		

A_{615co}= Absorbancia corregida utilizando el factor de dilución.

FD= Factor de dilución.

Tabla 4.41

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en las etapas de aplicación y lavado de CALE en columna de 4 cm de diámetro para el extracto de C-PC de *Synechocystis aquatilis*.

NºTUBO	VOL.TUBO	VOL.MEDIO	A _{615 co}
1	29	114'5	0'000
2	29	243'5	0'020
3	29	372'5	0'096
4	29	501'5	0'148
5	29	630'5	0'214
6	28	759	0'271
7	29	887'5	0'340
8	30	1017	0'383
9	29	1146'5	0'412
10	29	1275'5	0'482
11	30	1405	0'521
12	30	1535	0'584
13	29	1664'5	0'610
14	33	1795'5	0'637
15	32	1928	0'680
16	33	2060'5	0'363
17	32	2193	0'177
18	32	2325	0'087
19	30	2456	0'044
20	30	2586	0'024
21	30	2716	0'015
22	63	2862'5	0'011
23	63	3025'5	0'008
24	62	3188	0'006
25	92	3365	0'005

Tabla 4.42

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en la etapa de elución de CALE.

(Continuación de la Tabla 4.41)

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
31	0'007	0'002	0'0000	0'001	0'034	29	1	3425'5
32	0'005	0'002	0'0000	0'001	0'024	29	1	3454'5
33	0'005	0'002	0'0000	0'001	0'025	29	1	3483'5
34	0'040	0'020	0'0000	0'006	0'120	21	1	3508'5
35	0'263	0'149	0'0000	0'036	0'405	11'2	1	3524'6
36	0'730	0'418	0'0000	0'100	1'099	11	1	3535'7
37	1'534	0'441	0'0130	0'207	2'133	10'3	2	3546'35
38	2'976	0'545	0'0123	0'410	4'220	10'3	3	3556'65
39	6'188	0'670	0'0044	0'862	8'878	10'3	5	3566'95
40	9'110	0'494	0'0024	1'269	13'323	10'5	10	3577'35
41	15'269	0'560	0'0035	2'115	21'999	10'4	15	3587'8
42	20'060	0'548	0'0017	2'790	29'290	10'5	20	3598'25
43	22'827	0'603	0'0154	3'129	32'854	10'5	21	3608'75
44	26'991	0'492	0'0077	3'732	42'923	11'5	30	3619'75
45	25'680	0'467	0'0136	3'535	44'193	12'5	30	3631'75
46	26'547	0'476	0'0028	3'706	40'769	11	30	3643'5
47	25'098	0'449	0'0028	3'507	38'582	11	30	3654'5
48	23'049	0'412	0'0032	3'220	35'423	11	30	3665'5
49	22'971	0'420	0'0028	3'184	35'028	11	30	3676'5
50	19'650	0'350	0'0031	2'748	54'954	20	30	3692
51	17'175	0'614	0'0033	2'401	60'019	25	15	3714'5
52	14'085	0'498	0'0025	1'977	53'380	27	15	3740'5
53	11'820	0'411	0'0024	1'667	45'021	27	15	3767'5
54	7'845	0'265	0'0051	1'112	31'126	28	15	3795
55	7'470	0'379	0'0026	1'063	31'889	30	10	3824
56	4'838	0'243	0'0073	0'685	20'549	30	10	3854
57	5'150	0'256	0'0021	0'737	25'059	34	10	3886
58	4'270	0'210	0'0012	0'614	17'181	28	10	3917
59	3'540	0'453	0'0067	0'501	15'524	31	4	3946'5
60	2'964	0'504	0'0032	0'421	13'054	31	3	3977'5
61	2'514	0'427	0'0024	0'357	11'439	32	3	4009
62	2'124	0'360	0'0029	0'302	9'360	31	3	4040'5
63	1'806	0'305	0'0014	0'257	8'232	32	3	4072
64	1'489	0'382	0'0030	0'211	6'542	31	2	4103'5
65	1'316	0'338	0'0053	0'186	5'949	32	2	4135
66	1'186	0'304	0'0026	0'168	5'378	32	2	4167
67	1'079	0'277	0'0034	0'153	4'733	31	2	4198'5
68	0'905	0'470	0'0003	0'128	4'099	32	1	4230
69	0'787	0'409	0'0000	0'111	3'676	33	1	4262'5

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
70	0'686	0'355	0'0000	0'097	3'210	33	1	4295'5
71	0'596	0'307	0'0000	0'085	2'707	32	1	4328
72	0'522	0'269	0'0001	0'074	2'296	31	1	4359'5
73	0'460	0'235	0'0000	0'065	2'093	32	1	4391
74	0'405	0'206	0'0000	0'058	1'847	32	1	4423
75	0'361	0'184	0'0000	0'051	1'697	33	1	4455'5
76	0'325	0'165	0'0000	0'046	1'529	33	1	4488'5
77	0'296	0'150	0'0001	0'042	1'390	33	1	4521'5
78	0'266	0'133	0'0000	0'038	1'217	32	1	4554
79	0'247	0'130	0'0046	0'034	2'200	64	1	4602
81	0'200	0'103	0'0006	0'028	1'843	65	1	4666'5
83	0'168	0'085	0'0006	0'024	1'576	66	1	4732
85	0'137	0'068	0'0003	0'020	1'876	96	1	4813
88	0'106	0'053	0'0002	0'015	1'459	96	1	4909
91	0'078	0'037	0'0000	0'011	1'839	162	1	5038
96	0'054	0'024	0'0000	0'008	1'280	160	1	5199
97	0'025	0'012	0'0000	0'004	0'586	160	1	5359
TOTAL					812'7	88% (807'6/923'6)·100		

A_{615co}= Absorbancia corregida utilizando el factor de dilución.

FD= Factor de dilución.

ANEXO 4

Tabla 4.44

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en las etapas de aplicación y lavado de CALE para el extracto de C-PC de *Anabaena marina* para la columna de 6 cm de diámetro.

NºTUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A _{615 co}
1	31	165'5	0'000
2	32	347	0'000
3	32	529	0'000
4	32	711	0'002
5	32	893	0'014
6	32	1075	0'031
7	32	1257	0'043
8	32	1439	0'048
9	32	1621	0'050
10	32	1803	0'055
11	32	1985	0'077
12	32	2167	0'072
13	32	2349	0'082
14	32	2531	0'079
15	32	2713	0'077
16	32	2895	0'080
17	32	3077	0'077
18	32	3259	0'078
19	32	3441	0'082
20	32	3623	0'082
21	32	3805	0'088
22	32	3987	0'093
23	32	4169	0'092
24	32	4351	0'081
25	32	4533	0'061
26	32	4715	0'050
27	32	4897	0'046
28	32	5079	0'036
29	32	5261	0'031
30	32	5443	0'029
31	32	5625	0'028
32	32	5807	0'027
33	32	5989	0'025
34	32	6171	0'025
35	32	6353	0'024
36	32	6535	0'024
37	32	6717	0'024
38	32	6899	0'024
39	32	7081	0'024
40	32	7263	0'023

NºTUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A _{615 co}
41	32	7445	0'023
42	32	7627	0'022
43	32	7809	0'021
44	32	7991	0'019

Tabla 4.45

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en la etapa de elución de CALE.

(continuación de la Tabla 4.44)

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
45	0'031	0'005	0'0003	0'005	0'071	13'4	1	8163'7
46	0'032	0'006	0'0000	0'005	0'049	9	1	8174'9
47	0'031	0'005	0'0000	0'005	0'036	6'8	1	8182'8
48	0'032	0'006	0'0000	0'006	0'078	14	1	8193'2
49	0'033	0'006	0'0000	0'006	0'044	7'8	1	8204'1
50	0'033	0'006	0'0000	0'006	0'047	8'4	1	8212'2
51	0'032	0'005	0'0000	0'006	0'049	8'7	1	8220'75
52	0'032	0'005	0'0000	0'005	0'055	10'1	1	8230'15
53	0'032	0'006	0'0002	0'006	0'059	10'5	1	8240'45
54	0'033	0'006	0'0007	0'006	0'081	14'5	1	8252'95
55	0'032	0'005	0'0002	0'006	0'084	15	1	8267'7
56	0'033	0'005	0'0000	0'006	0'096	17	1	8283'7
57	0'032	0'006	0'0001	0'006	0'073	13'2	1	8298'8
58	0'032	0'006	0'0000	0'006	0'070	12'7	1	8311'75
59	0'033	0'006	0'0006	0'006	0'117	21	1	8328'6
60	0'032	0'006	0'0005	0'006	0'080	14'6	1	8346'4
61	0'032	0'006	0'0002	0'006	0'090	16'3	1	8361'85
62	0'032	0'005	0'0000	0'005	0'076	14	1	8377
63	0'032	0'006	0'0006	0'005	0'123	22'5	1	8395'25
64	0'032	0'006	0'0004	0'005	0'081	14'8	1	8413'9
65	0'033	0'007	0'0007	0'006	0'082	14'5	1	8428'55
66	0'035	0'007	0'0008	0'006	0'092	15'8	1	8443'7
67	0'054	0'013	0'0010	0'009	0'170	19	1	8461'1
68	0'142	0'041	0'0018	0'023	0'160	7	1	8474'1
69	0'256	0'077	0'0020	0'041	0'209	5'1	1	8480'15
70	0'503	0'159	0'0049	0'080	0'582	7'3	1	8486'35
71	0'925	0'303	0'0048	0'146	0'950	6'5	1	8493'25
72	1'714	0'297	0'0071	0'267	2'406	9	2	8501
73	2'764	0'265	0'0061	0'422	3'881	9'2	4	8510'1
74	4'248	0'469	0'0066	0'628	6'907	11	4	8520'2
75	5'460	0'433	0'0121	0'787	5'113	6'5	6	8528'95
76	6'014	0'495	0'0099	0'859	6'099	7'1	6	8535'75
77	6'450	0'541	0'0090	0'917	5'593	6'1	6	8542'35

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
78	6'786	0'577	0'0098	0'961	6'628	6'9	6	8548'85
79	7'120	0'455	0'0102	1'005	8'542	8'5	8	8556'55
80	7'232	0'462	0'0109	1'020	7'755	7'6	8	8564'6
81	7'208	0'456	0'0063	1'024	6'757	6'6	8	8571'7
82	7'024	0'444	0'0094	0'995	7'564	7'6	8	8578'8
83	7'192	0'451	0'0062	1'024	7'170	7	8	8586'1
84	6'968	0'434	0'0082	0'993	7'545	7'6	8	8593'4
85	6'544	0'403	0'0065	0'937	5'807	6'2	8	8600'3
86	6'416	0'394	0'0116	0'915	7'688	8'4	8	8607'6
87	6'208	0'374	0'0076	0'893	6'609	7'4	8	8615'5
88	6'008	0'363	0'0119	0'860	6'796	7'9	8	8623'15
89	5'824	0'347	0'0086	0'840	6'212	7'4	8	8630'8
90	5'504	0'326	0'0106	0'793	5'866	7'4	8	8638'2
91	5'496	0'435	0'0121	0'792	5'546	7	6	8645'4
92	5'298	0'412	0'0035	0'772	5'794	7'5	6	8652'65
93	5'046	0'393	0'0081	0'733	5'128	7	6	8659'9
94	4'902	0'378	0'0091	0'713	5'777	8'1	6	8667'45
95	4'656	0'356	0'0063	0'680	4'829	7'1	6	8675'05
96	3'942	0'332	0'0050	0'560	3'919	7	6	8682'1
97	4'344	0'326	0'0027	0'640	4'478	7	6	8689'1
98	4'236	0'317	0'0058	0'622	4'979	8	6	8696'6
99	4'062	0'304	0'0075	0'596	4'349	7'3	6	8704'25
100	3'918	0'290	0'0062	0'577	4'153	7'2	6	8711'5
101	3'732	0'275	0'0045	0'551	3'747	6'8	6	8718'5
102	3'492	0'390	0'0047	0'515	4'067	7'9	4	8725'85
103	3'424	0'383	0'0065	0'504	4'030	8	4	8733'8
104	3'316	0'370	0'0081	0'487	4'290	8'8	4	8742'2
105	3'204	0'354	0'0048	0'473	3'788	8	4	8750'6
106	3'044	0'335	0'0079	0'449	3'726	8'3	4	8758'75
107	2'864	0'312	0'0031	0'425	3'615	8'5	4	8767'15
108	2'832	0'310	0'0080	0'418	3'512	8'4	4	8775'6
109	2'696	0'293	0'0070	0'399	3'471	8'7	4	8784'15
110	2'58	0'279	0'0056	0'383	3'827	10	4	8793'5
111	2'468	0'269	0'0102	0'363	2'907	8	4	8802'5
113	2'344	0'254	0'0082	0'346	2'771	8	4	8810'5
114	2'240	0'240	0'0065	0'332	2'659	8	4	8818'5
115	2'136	0'228	0'0600	0'296	2'515	8'5	4	8826'75
116	2'048	0'217	0'0034	0'306	2'905	9'5	4	8835'75
117	1'944	0'205	0'0038	0'290	3'339	11'5	4	8846'25
118	1'848	0'195	0'0049	0'276	3'995	14'5	4	8859'25
119	1'708	0'369	0'0055	0'254	3'808	15	2	8874
120	1'584	0'342	0'0060	0'235	3'176	13'5	2	8888'25
121	1'576	0'339	0'0054	0'234	3'867	16'5	2	8903'25

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
122	1'366	0'294	0'0082	0'202	3'340	16'5	2	8919'75
123	1'226	0'263	0'0077	0'182	4'271	23'5	2	8939'75
124	1'094	0'235	0'0092	0'162	4'042	25	2	8964
125	0'948	0'202	0'0060	0'141	3'549	25'2	2	8989'1
126	0'859	0'373	0'0060	0'127	3'186	25	1	9014'2
127	0'758	0'329	0'0051	0'112	3'037	27	1	9040'2
128	0'665	0'288	0'0040	0'099	2'667	27	1	9067'2
129	0'590	0'256	0'0042	0'088	2'451	28	1	9094'7
130	0'524	0'228	0'0038	0'078	2'330	30	1	9123'7
131	0'463	0'202	0'0045	0'068	1'849	27	1	9152'2
132	0'416	0'182	0'0033	0'062	1'539	25	1	9178'2
133	0'382	0'167	0'0029	0'057	1'527	27	1	9204'2
134	0'335	0'147	0'0032	0'049	1'435	29	1	9232'2
135	0'299	0'131	0'0024	0'044	1'150	26	1	9259'7
136	0'271	0'123	0'0085	0'039	1'055	27	1	9286'2
137	0'235	0'104	0'0031	0'035	0'933	27	1	9313'2
138	0'215	0'095	0'0024	0'032	0'888	28	1	9340'7
139	0'193	0'085	0'0022	0'028	0'966	34	1	9371'7
140	0'170	0'075	0'0022	0'025	0'725	29	1	9403'2
141	0'153	0'068	0'0020	0'022	0'652	29	1	9432'2
142	0'140	0'062	0'0018	0'021	0'556	27	1	9460'2
143	0'131	0'058	0'0026	0'019	0'536	28	1	9487'7
144	0'118	0'053	0'0029	0'017	0'463	27	1	9515'2
145	0'106	0'047	0'0012	0'016	0'406	26	1	9541'7
146	0'096	0'042	0'0009	0'014	0'441	31	1	9570'2
147	0'087	0'038	0'0011	0'013	0'349	27	1	9599'2
148	0'080	0'035	0'0009	0'012	0'333	28	1	9626'7
149	0'073	0'031	0'0008	0'011	0'282	26	1	9653'7
150	0'068	0'029	0'0007	0'010	0'342	34	1	9683'7
151	0'060	0'025	0'0014	0'009	0'304	34	1	9717'7
TOTAL					324'44	85% (324'44/381'7)-100		

A_{615co}= Absorbancia corregida utilizando el factor de dilución.

FD= Factor de dilución.

Tabla 4.46

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en las etapas de aplicación y lavado de CALE para el extracto de C-PC de *Spirulina platensis* en columna de 6cm de diámetro.

NºTUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A _{615 co}
1	30	65	0'002
2	30	145	0'000
3	32	226	0'000
4	30	307	0'003
5	32	388	0'009
6	31	469'5	0'016
7	32	551	0'020
8	32	633	0'039
9	31	714'5	0'087
10	32	796	0'109
11	31	877'5	0'135
12	31	958'5	0'163
13	31	1039'5	0'168
14	31	1120'5	0'194
15	30	1201	0'214
16	32	1282	0'223
17	31	1363'5	0'227
18	31	1444'5	0'241
19	31	1525'5	0'239
20	32	1607	0'239
21	32	1689	0'219
22	30	1770	0'206
23	32	1851	0'185
24	30	1932	0'152
25	31	2012'5	0'092
26	30	2093	0'114
27	31	2173'5	0'085
28	31	2254'5	0'086
30	30	2335	0'100
31	31	2415'5	0'084
32	31	2496'5	0'080
33	31	2577'5	0'061
34	31	2658'5	0'057
35	30	2739	0'056
36	33	2820'5	0'057
37	31	2902'5	0'050
38	32	2984	0'046
39	32	3066	0'042
40	33	3148'5	0'037
41	30	3230	0'039

NºTUBO	VOL.TUBO	VOL.MEDIO	A _{615co}
42	31	3310'5	0'036
43	32	3392	0'030
44	32	3474	0'026
45	32	3556	0'022
46	32	3638	0'017
47	31	3719'5	0'017
48	32	3801	0'015
49	30	3882	0'014

Tabla 4.47

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en la etapa de elución de CALE.

(Continuación de la Tabla 4.46)

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
50	0'003	0'001	0'0000	0'001	0'016	32	1	3913
51	0'013	0'001	0'0000	0'002	0'074	32	1	3945
52	0'014	0'000	0'0000	0'003	0'081	32	1	3977
53	0'016	0'000	0'0000	0'003	0'095	33	1	4009'5
54	0'016	0'000	0'0000	0'003	0'103	35	1	4043'5
55	0'015	0'000	0'0000	0'003	0'090	32	1	4077
56	0'016	0'000	0'0000	0'003	0'093	32	1	4109
57	0'016	0'000	0'0000	0'003	0'098	34	1	4142
58	0'016	0'000	0'0000	0'003	0'099	33	1	4175'5
59	0'016	0'000	0'0000	0'003	0'096	33	1	4208'5
60	0'016	0'000	0'0000	0'003	0'096	32	1	4241
61	0'029	0'002	0'0000	0'005	0'151	29	1	4271'5
62	0'116	0'017	0'0000	0'020	0'303	15	1	4293'5
63	0'266	0'048	0'0000	0'046	0'547	12	1	4307
64	0'471	0'097	0'0008	0'080	1'193	15	1	4320'5
65	0'749	0'166	0'0010	0'126	1'507	12	1	4334
66	1'075	0'252	0'0019	0'179	1'789	10	1	4345
67	1'360	0'169	0'0047	0'224	2'465	11	2	4355'5
68	1'714	0'215	0'0040	0'282	3'106	11	2	4366'5
69	2'160	0'277	0'0036	0'355	3'905	11	2	4377'5
70	2'583	0'225	0'0041	0'423	5'500	13	3	4389'5
71	2'910	0'263	0'0087	0'473	5'202	11	3	4401'5
72	3'237	0'287	0'0042	0'529	5'821	11	3	4412'5
73	3'444	0'231	0'0038	0'562	6'183	11	4	4423'5
74	3'708	0'256	0'0163	0'598	7'173	12	4	4435
75	3'784	0'256	0'0037	0'617	6'479	10'5	4	4446'25
76	3'812	0'268	0'0107	0'615	6'460	10'5	4	4456'75
77	3'812	0'263	0'0035	0'615	3'692	6	4	4465
78	3'924	0'270	0'0077	0'637	7'004	11	4	4473'5

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
79	3'864	0'264	0'0052	0'629	8'486	13'5	4	4485'5
80	3'876	0'264	0'0041	0'631	7'575	12	4	4498'5
81	3'812	0'262	0'0061	0'619	8'050	13	4	4511
82	3'812	0'261	0'0048	0'620	7'441	12	4	4523'5
83	3'764	0'260	0'0070	0'611	6'716	11	4	4535
84	3'712	0'255	0'0046	0'604	8'449	14	4	4547'5
85	3'408	0'249	0'0134	0'545	8'178	15	4	4562
86	3'448	0'243	0'0115	0'556	7'778	14	4	4576'5
87	3'328	0'236	0'0107	0'536	6'967	13	4	4590
88	3'112	0'216	0'0043	0'505	6'565	13	4	4603
89	2'961	0'285	0'0118	0'476	5'947	12'5	3	4615'75
90	2'901	0'270	0'0090	0'469	6'805	14'5	3	4629'25
91	2'781	0'258	0'0079	0'450	6'980	15'5	3	4644'25
92	2'622	0'241	0'0047	0'426	7'242	17	3	4660'5
93	2'358	0'223	0'0061	0'381	6'475	17	3	4677'5
94	2'316	0'217	0'0104	0'373	5'226	14	3	4693
95	1'956	0'188	0'0142	0'312	4'999	16	3	4708
96	2'055	0'189	0'0056	0'333	5'332	16	3	4724
97	1'944	0'179	0'0048	0'315	4'730	15	3	4739'5
98	1'830	0'170	0'0044	0'297	6'229	21	3	4757'5
99	1'689	0'159	0'0068	0'272	5'173	19	3	4777'5
100	1'554	0'216	0'0041	0'252	5'548	22	2	4798
101	1'434	0'204	0'0096	0'231	5'999	26	2	4822
102	1'282	0'181	0'0074	0'207	6'203	30	2	4850
103	1'162	0'166	0'0071	0'187	4'861	26	2	4878
104	1'049	0'292	0'0025	0'170	5'115	30	1	4906
105	0'953	0'266	0'0016	0'155	4'647	30	1	4936
106	0'858	0'241	0'0020	0'139	4'178	30	1	4966
107	0'770	0'218	0'0016	0'125	3'870	31	1	4996'5
108	0'700	0'200	0'0019	0'113	3'172	28	1	5026
109	0'645	0'186	0'0016	0'104	3'232	31	1	5055'5
110	0'589	0'170	0'0008	0'095	2'858	30	1	5086
111	0'539	0'157	0'0012	0'087	2'610	30	1	5116
112	0'499	0'146	0'0006	0'081	2'497	31	1	5146'5
114	0'429	0'128	0'0014	0'069	2'275	33	1	5178'5
115	0'399	0'121	0'0021	0'064	1'980	31	1	5210'5
116	0'366	0'113	0'0015	0'058	1'870	32	1	5242
117	0'363	0'111	0'0002	0'058	1'862	32	1	5274
118	0'475	0'143	0'0004	0'076	2'290	30	1	5305
119	0'415	0'131	0'0026	0'066	2'110	32	1	5336
120	0'338	0'111	0'0021	0'053	1'759	33	1	5368'5
121	0'281	0'094	0'0002	0'044	1'463	33	1	5401'5
122	0'241	0'081	0'0001	0'038	1'292	34	1	5435

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
123	0'273	0'090	0'0000	0'043	1'297	30	1	5467
124	0'337	0'110	0'0000	0'053	1'656	31	1	5497'5
125	0'277	0'095	0'0000	0'044	1'306	30	1	5528
126	0'224	0'079	0'0003	0'035	1'084	31	1	5558'5
127	0'188	0'068	0'0000	0'029	0'906	31	1	5589'5
128	0'162	0'056	0'0003	0'025	0'787	31	1	5620'5
129	0'143	0'052	0'0000	0'022	0'666	30	1	5651
130	0'125	0'046	0'0000	0'019	0'618	32	1	5682
131	0'108	0'040	0'0000	0'017	0'501	30	1	5713
132	0'095	0'036	0'0002	0'015	0'438	30	1	5743
133	0'087	0'033	0'0000	0'013	0'430	32	1	5774
134	0'076	0'030	0'0000	0'012	0'360	31	1	5805'5
135	0'069	0'027	0'0000	0'010	0'325	31	1	5836'5
136	0'065	0'026	0'0000	0'010	0'297	30	1	5867
137	0'082	0'033	0'0000	0'012	0'374	30	1	5897
138	0'082	0'033	0'0000	0'012	0'348	28	1	5926
139	0'072	0'030	0'0000	0'011	0'326	30	1	5955
140	0'063	0'027	0'0000	0'009	0'292	31	1	5985'5
141	0'055	0'024	0'0000	0'008	0'253	31	1	6016'5
142	0'048	0'021	0'0000	0'007	0'213	30	1	6047
143	0'039	0'017	0'0000	0'006	0'708	122	1	6123
TOTAL					296'2	76'8% (296'2/385'9)·100		

A_{615co}= Absorbancia corregida utilizando el factor de dilución.

FD= Factor de dilución.

Tabla 4.48

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en las etapas de aplicación y lavado de CALE en columna de 6 cm de diámetro para el extracto de C-PC de *Synechocystis aquatilis*.

NºTUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A _{615 co}
1	32	91	0'000
2	32	273	0'013
3	32	455	0'052
4	32	637	0'069
5	32	819	0'073
6	32	1001	0'134
7	32	1183	0'151
8	32	1365	0'153
9	32	1547	0'178
10	31	1728'5	0'218
11	32	1910	0'218
12	32	2092	0'269
13	31	2273'5	0'181
14	32	2455	0'272
15	32	2637	0'266
16	32	2819	0'244
17	34	3002	0'265
18	32	3185	0'247
19	31	3366'5	0'379
20	32	3548	0'279
21	31	3729'5	0'290
22	32	3911	0'359
23	32	4093	0'321
24	32	4275	0'281
25	30	4456	0'169
26	30	4636	0'111
27	34	4818	0'075
28	32	5001	0'048
29	30	5182	0'031
30	31	5362'5	0'021
31	31	5543'5	0'018
32	27	5722'5	0'012
33	30	5901	0'011
34	34	6083	0'012
35	30	6265	0'011
36	32	6446	0'010
37	29	6626'5	0'010
38	31	6806'5	0'009

Tabla 4.49

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en la etapa de elución de CALE.

(Continuación de la Tabla 4.48)

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
40	0'271	0'119	0'0015	0'040	1'284	32	1	7202
41	1'122	0'244	0'0048	0'166	4'987	30	2	7233
42	3'474	0'255	0'0061	0'512	16'911	33	6	7264'5
43	6'762	0'445	0'0029	0'990	32'674	33	7	7297'5
44	10'840	0'520	0'0087	1'564	54'731	35	10	7331'5
45	14'790	0'237	0'0066	2'125	72'244	34	30	7366
46	18'354	0'300	0'0037	2'635	89'591	34	30	7400
47	18'990	0'321	0'0081	2'684	91'272	34	30	7434
48	20'850	0'359	0'0044	2'945	97'169	33	30	7467'5
49	19'020	0'330	0'0051	2'675	88'287	33	30	7500'5
50	17'970	0'315	0'0064	2'514	82'974	33	30	7533'5
51	16'500	0'289	0'0069	2'306	76'109	33	30	7566'5
52	15'750	0'275	0'0173	2'172	71'670	33	30	7599'5
53	13'440	0'233	0'0045	1'889	62'350	33	30	7632'5
54	12'390	0'213	0'0046	1'745	59'314	34	30	7666
55	11'220	0'190	0'0049	1'585	52'302	33	30	7699'5
56	6'765	0'228	0'0029	0'962	31'730	33	15	7732'5
57	9'345	0'319	0'0088	1'316	43'420	33	15	7765'5
58	8'820	0'295	0'0053	1'254	41'393	33	15	7798'5
59	7'740	0'256	0'0051	1'104	36'445	33	15	7831'5
60	7'275	0'238	0'0059	1'039	36'378	35	15	7865'5
62	6'480	0'199	0'0040	0'945	61'416	65	15	7915'5
64	3'195	0'102	0'0086	0'451	30'207	67	15	7981'5
66	4'774	0'328	0'0042	0'689	44'798	65	7	8047'5
68	4'227	0'288	0'0077	0'609	40'184	66	7	8113
70	3'667	0'246	0'0054	0'532	54'213	102	7	8197
72	3'122	0'206	0'0082	0'452	45'656	101	7	8298'5
76	2'640	0'414	0'0071	0'383	39'828	104	3	8401
80	2'310	0'357	0'0054	0'337	33'012	98	3	8502
82	2'037	0'314	0'0094	0'296	30'167	102	3	8602
84	1'785	0'274	0'0100	0'259	26'424	102	3	8704
88	1'608	0'241	0'0100	0'234	23'914	102	3	8806
90	1'398	0'206	0'0044	0'206	26'381	128	3	8921
96	1'206	0'270	0'0092	0'177	29'309	166	2	9068
100	0'913	0'197	0'0035	0'136	22'376	165	2	9233'5
104	0'867	0'375	0'0015	0'129	21'309	165	1	9398'5
110	0'750	0'322	0'0014	0'112	18'259	163	1	9562'5
116	0'646	0'275	0'0010	0'097	19'237	199	1	9743'5
120	0'645	0'275	0'0010	0'096	18'332	190	1	9938

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
126	0'694	0'294	0'0016	0'104	20'578	198	1	10132
132	0'559	0'233	0'0011	0'084	19'325	230	1	10346
136	0'374	0'150	0'0002	0'057	13'182	232	1	10577
140	0'310	0'122	0'0004	0'047	13'947	295	1	10840'5
141	0'722	0'304	0'0004	0'108	33'056	305	1	11140'5
143	0'349	0'140	0'0003	0'053	14'829	280	1	11433
144	0'180	0'068	0'0001	0'028	7'894	285	1	11715'5
145	0'135	0'050	0'0004	0'021	5'317	255	1	11985'5
146	0'138	0'051	0'0005	0'021	5'882	275	1	12250'5
147	0'064	0'021	0'0000	0'010	2'793	275	1	12525'5
148	0'048	0'015	0'0000	0'008	3'472	450	1	12888
TOTAL					1869'1	90% (1869'1/2078'2)·100		

A_{615co}= Absorbancia corregida utilizando el factor de dilución.

FD= Factor de dilución.

ANEXO 5

Tabla 4.61

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en las etapas de aplicación y lavado de CALE para el extracto de C-PC de *Spirulina platensis* para la columna de 9 cm de diámetro.

NºTUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A _{615 co}
1	32	66	0'001
2	31	197'5	0'002
3	31	328'5	0'001
4	31	459'5	0'003
5	30	590	0'000
6	31	720'5	0'006
7	29	850'5	0'007
8	32	981	0'060
9	32	1113	0'098
10	30	1244	0'045
11	31	1374'5	0'159
12	31	1505'5	0'187
13	30	1636	0'227
14	33	1767'5	0'250
15	32	1900	0'288
16	31	2031'5	0'351
17	32	2163	0'323
18	31	2294'5	0'381
19	32	2426	0'368
20	31	2557'5	0'365
21	32	2689	0'414
22	34	2822	0'426
23	32	2955	0'419
24	33	3087'5	0'432
25	32	3220	0'466
26	33	3352'5	0'491
27	32	3485	0'525
28	31	3616'5	0'541
29	33	3748'5	0'549
30	32	3881	0'547
31	33	4013'5	0'540
32	31	4145'5	0'487
33	32	4277	0'473
34	33	4409'5	0'452
35	31	4541'5	0'414
36	32	4673	0'388
37	33	4805'5	0'340
38	31	4937'5	0'324
39	32	5069	0'254
40	33	5201'5	0'215

NºTUBO	VOL.TUBO	VOL.MEDIO	A _{615 co}
41	31	5333'5	0'210
42	33	5465'5	0'189
43	33	5598'5	0'185
44	32	5731	0'168
45	32	5863	0'160
46	33	5995'5	0'152
47	32	6128	0'135
48	32	6260	0'113
49	32	6392	0'102
50	33	6524'5	0'085
51	32	6657	0'064
52	30	6788	0'056
53	32	6919	0'048
54	30	7050	0'041
55	32	7181	0'041
56	31	7312'5	0'041
57	31	7443'5	0'037
58	32	7575	0'035
59	31	7706'5	0'031
60	31	7837'5	0'029
61	32	7969	0'026
62	32	8101	0'025
63	31	8232'5	0'024
64	32	8364	0'021
65	31	8495'5	0'020
66	32	8627	0'021
67	31	8758'5	0'020
68	31	8889'5	0'019
69	31	9020'5	0'017
70	32	9152	0'015

Tabla 4.62

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en la etapa de elución de CALE.
(continuación de la Tabla 4.61)

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
71	0'694	0'167	0'0021	0'115	3'22	28	1	9976
72	1'279	0'324	0'0030	0'211	6'32	30	1	10005
73	2'001	0'266	0'0115	0'326	9'77	30	2	10035
74	2'766	0'260	0'0249	0'442	13'70	31	3	10065'5
75	3'324	0'224	0'0118	0'539	16'17	30	4	10096
76	3'815	0'206	0'0112	0'618	17'93	29	5	10125'5
77	3'990	0'178	0'0079	0'648	19'45	30	6	10155
78	4'110	0'179	0'0047	0'672	19'50	29	6	10184'5
79	4'200	0'185	0'0084	0'684	18'46	27	6	10212'5
80	4'158	0'183	0'0083	0'677	18'96	28	6	10240
81	4'068	0'176	0'0063	0'665	19'29	29	6	10268'5
82	3'990	0'172	0'0044	0'654	18'96	29	6	10297'5
83	3'920	0'209	0'0127	0'636	19'07	30	5	10327
84	3'880	0'204	0'0066	0'634	19'64	31	5	10357'5
85	4'070	0'229	0'0221	0'650	38'38	59	5	10402'5
87	4'015	0'257	0'0521	0'613	34'94	57	5	10460'5
89	3'620	0'206	0'0139	0'580	33'66	58	5	10518
93	3'280	0'185	0'0088	0'528	45'98	87	5	10590'5
96	2'890	0'170	0'0123	0'460	41'43	90	5	10679
99	2'660	0'154	0'0073	0'427	38'41	90	5	10769
102	2'238	0'196	0'0454	0'332	29'55	89	4	10858'5
105	1'748	0'139	0'0156	0'272	26'40	97	4	10951'5
108	1'548	0'137	0'0299	0'230	21'60	94	4	11047
111	1'206	0'191	0'0119	0'190	16'90	89	2	11138'5
114	1'038	0'327	0'0074	0'165	15'66	95	1	11230'5
117	0'894	0'288	0'0065	0'141	13'29	94	1	11325
120	0'752	0'242	0'0035	0'119	10'96	92	1	11418
123	0'647	0'212	0'0031	0'102	9'50	93	1	11510'5
126	0'563	0'188	0'0029	0'089	8'33	94	1	11604
129	0'478	0'163	0'0019	0'075	7'20	96	1	11699
132	0'418	0'146	0'0022	0'065	6'06	93	1	11793'5
135	0'373	0'133	0'0023	0'058	5'50	95	1	11887'5
138	0'331	0'119	0'0020	0'051	4'93	96	1	11983
141	0'290	0'107	0'0019	0'045	4'11	92	1	12077
144	0'291	0'107	0'0016	0'045	4'27	95	1	12170'5
147	0'284	0'106	0'0024	0'044	4'19	96	1	12266
150	0'225	0'087	0'0012	0'034	3'33	97	1	12362'5
153	0'189	0'074	0'0013	0'029	2'65	92	1	12457
156	0'160	0'064	0'0010	0'024	2'30	95	1	12550'5

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
159	0'140	0'057	0'0014	0'021	2'02	96	1	12646
162	0'131	0'054	0'0017	0'020	1'84	94	1	12741
165	0'121	0'050	0'0010	0'018	5'45	300	1	12938
TOTAL					687'6	76'4% (687'6/900)·100		

A_{615co}= Absorbancia corregida utilizando el factor de dilución.

FD= Factor de dilución.

ANEXO 6

Tabla 4.64

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en las etapas de aplicación y lavado de CALE para el extracto de C-PC de *Spirulina platensis* para la planta piloto.

NºTUBO	VOL.TUBO	VOL.MEDIO	A _{615 co}
1	180	9090	0'001
2	180	9520	0'001
3	180	10200	0'001
4	180	10880	0'001
5	180	11560	0'001
6	180	12240	0'001
7	180	12920	0'001
8	180	13600	0'003
9	180	14280	0'009
10	180	14960	0'025
11	180	15640	0'064
12	180	16320	0'097
13	180	17000	0'120
14	180	17680	0'143
15	180	18360	0'151
16	180	19040	0'165
17	180	19720	0'166
18	180	20400	0'163
19	180	21080	0'155
20	180	21760	0'131
21	180	22440	0'121
22	180	23120	0'116
23	180	23800	0'102
24	180	24480	0'090
25	180	25160	0'085
26	180	25840	0'080
27	180	26520	0'071
28	180	27200	0'057
29	180	27880	0'051
30	180	28560	0'044
31	180	29240	0'039
32	180	29920	0'034
33	180	30600	0'029
34	180	31280	0'003
35	180	31960	0'026
36	180	32640	0'022
37	180	33320	0'027
38	180	34000	0'017
39	180	34680	0'014
40	180	35360	0'014

NºTUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A _{615 co}
41	360	36380	0'012
43	360	37740	0'010
45	360	39100	0'009
47	360	40460	0'008
49	360	41820	0'008
51	360	43180	0'007
53	540	44880	0'007
56	540	46920	0'007
59	540	48960	0'007
62	540	51000	0'006
65	540	53040	0'007
68	540	55080	0'006
71	540	57120	0'006
74	540	59160	0'003

Tabla 4.65

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluídas en la etapa de elución de CALE.

(continuación de la Tabla 4.64)

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
75	0'036	0'020	0'0133	0'004	7'74	2130	1	61245
75	0'027	0'011	0'0064	0'003	7'02	2060	1	63340
75	0'028	0'011	0'0061	0'004	7'61	2090	1	65415
75	0'058	0'012	0'0064	0'009	1'85	200	1	66560
76	0'135	0'031	0'0066	0'022	3'94	180	1	66750
77	0'247	0'055	0'0075	0'041	7'32	180	1	66930
78	0'469	0'104	0'0085	0'078	14'01	180	1	67110
79	0'755	0'171	0'0110	0'125	22'55	180	1	67290
80	1'037	0'237	0'0113	0'172	31'00	180	1	67470
81	1'508	0'181	0'0119	0'248	44'67	180	2	67650
82	1'770	0'213	0'0116	0'292	52'50	180	2	67830
83	2'206	0'271	0'0180	0'362	65'14	180	2	68010
84	2'556	0'204	0'0073	0'423	76'07	180	3	68190
85	2'967	0'238	0'0078	0'490	88'28	180	3	68370
86	3'368	0'206	0'0065	0'556	100'01	180	4	68550
87	3'716	0'223	0'0048	0'615	110'78	180	4	68730
88	4'028	0'247	0'0099	0'663	119'42	180	4	68910
89	4'270	0'208	0'0050	0'706	127'01	180	5	69090
90	4'595	0'238	0'0182	0'747	134'41	180	5	69270
91	4'580	0'225	0'0047	0'756	136'14	180	5	69450
92	4'764	0'198	0'0058	0'784	141'18	180	6	69630
93	4'680	0'193	0'0036	0'772	139'02	180	6	69810
94	4'728	0'200	0'0067	0'776	139'64	180	6	69990

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
95	4'542	0'187	0'0042	0'749	134'88	180	6	70170
96	4'608	0'191	0'0038	0'760	136'76	180	6	70350
97	4'500	0'191	0'0058	0'738	132'91	180	6	70530
98	4'350	0'182	0'0039	0'716	128'91	180	6	70710
99	4'404	0'185	0'0020	0'726	130'65	180	6	70890
100	4'248	0'181	0'0035	0'698	125'61	180	6	71070
101	4'164	0'179	0'0035	0'683	122'97	180	6	71250
102	4'040	0'215	0'0098	0'657	118'27	180	5	71430
103	3'930	0'208	0'0061	0'641	115'45	180	5	71610
104	3'820	0'257	0'0105	0'621	111'73	180	4	71790
105	3'796	0'269	0'0227	0'607	109'29	180	4	71970
106	3'636	0'256	0'0175	0'584	105'09	180	4	72150
107	3'536	0'247	0'0114	0'571	102'72	180	4	72330
108	3'444	0'239	0'0078	0'558	100'39	180	4	72510
109	3'303	0'299	0'0019	0'539	97'02	180	3	72690
110	3'270	0'299	0'0000	0'534	96'04	180	3	72870
111	3'108	0'284	0'0000	0'507	91'27	180	3	73050
112	3'033	0'279	0'0000	0'494	88'98	180	3	73230
113	2'916	0'272	0'0000	0'474	85'36	180	3	73410
114	2'880	0'273	0'0036	0'466	83'91	180	3	73590
115	2'802	0'268	0'0029	0'453	81'56	180	3	73770
116	2'688	0'257	0'0011	0'435	78'33	180	3	73950
117	2'664	0'258	0'0039	0'430	77'33	180	3	74130
118	2'508	0'244	0'0028	0'404	72'79	180	3	74310
119	2'436	0'238	0'0027	0'393	70'66	180	3	74490
120	2'283	0'223	0'0020	0'368	66'25	180	3	74670
121	2'235	0'220	0'0016	0'360	64'81	180	3	74850
122	2'172	0'216	0'0039	0'349	62'74	180	3	75030
123	2'031	0'201	0'0017	0'327	58'82	180	3	75210
124	1'938	0'194	0'0295	0'303	54'52	180	3	75390
125	1'809	0'180	0'0016	0'291	52'34	180	3	75570
126	1'755	0'177	0'0033	0'281	50'57	180	3	75750
127	1'656	0'257	0'0064	0'264	47'45	180	2	75930
128	1'620	0'253	0'0090	0'257	46'27	180	2	76110
129	1'534	0'236	0'0035	0'245	44'11	180	2	76290
130	1'480	0'238	0'0157	0'232	41'79	180	2	76470
131	1'404	0'220	0'0047	0'223	40'19	180	2	76650
132	1'352	0'212	0'0045	0'215	38'69	180	2	76830
133	1'270	0'201	0'0077	0'201	36'17	180	2	77010
134	1'220	0'193	0'0047	0'194	34'84	180	2	77190
135	1'178	0'186	0'0028	0'187	33'71	180	2	77370
136	1'126	0'180	0'0045	0'178	32'09	180	2	77550
137	1'076	0'172	0'0020	0'171	30'75	180	2	77730

NºTUBO	A _{615co}	A ₆₅₂	A ₇₃₀	[C-PC]	mg C-PC	V _{Tubo}	FD	V _{medio}
138	1'050	0'173	0'0064	0'165	29'68	180	2	77910
139	1'006	0'163	0'0037	0'159	28'61	180	2	78090
140	0'979	0'319	0'0002	0'155	27'94	180	1	78270
141	0'951	0'310	0'0000	0'151	27'14	180	1	78450
142	0'898	0'295	0'0002	0'142	51'19	360	1	78720
144	0'833	0'277	0'0011	0'132	47'34	360	1	79080
145	0'763	0'255	0'0000	0'120	65'04	540	1	79530
148	0'688	0'232	0'0000	0'108	58'55	540	1	80070
151	0'622	0'214	0'0014	0'098	52'65	540	1	80610
155	0'563	0'195	0'0000	0'088	47'66	540	1	81150
158	0'511	0'179	0'0000	0'080	43'17	540	1	81690
161	0'458	0'162	0'0000	0'072	51'49	720	1	82320
165	0'419	0'152	0'0000	0'065	46'86	720	1	83040
169	0'373	0'135	0'0000	0'058	52'17	900	1	83850
170	0'328	0'120	0'0000	0'051	45'78	900	1	84750
179	0'290	0'108	0'0000	0'045	40'32	900	1	85650
185	0'267	0'102	0'0000	0'041	36'92	900	1	86550
190	0'245	0'096	0'0000	0'037	35'56	950	1	87475
193	0'226	0'091	0'0000	0'034	43'26	1260	1	88580
200	0'204	0'084	0'0000	0'031	27'42	890	1	89655
TOTAL					5871	79% (5871/7410)·100		

A_{615co}= Absorbancia corregida utilizando el factor de dilución.

FD= Factor de dilución.

SUMMARY

Thesis title:

“Isolation and purification of phycocyanins from cyanobacteria algae using expanded bed adsorption chromatography. Scale-up of the process, physico-chemical characterization and application as natural colorants”

Summary of the Thesis.

1.-Introduction.

2.-Materials and methods.

2.1.-Microalgal biomass.

2.2.-Chemicals.

2.3.-Extraction and measurement of phycobiliproteins.

2.4.- Expanded bed adsorption.

2.4.1.-Equilibrium adsorption isotherm and dynamic binding capacity.

2.4.2.-Expanded bed adsorption.

2.4.3.-Small scale optimization.

2.5.-Production of high purity C-phycocyanin.

2.6.-Identification of purified C-phycocyanin.

3.-Results and discussion.

3.1.-Phycocyanins from *Anabaena marina*.

3.1.1.-Extraction

3.1.2.-Expanded bed adsorption chromatography.

3.1.2.1.-Equilibrium and dynamic binding capacities.

3.1.2.2.-Optimization of expanded bed chromatography.

3.1.2.3.-Scale-up of expanded bed chromatography.

3.1.3.-Purification and identification of C-PC

3.2.-Phycocyanins from *Synechocystis aquatilis*.

3.2.1.-Extraction step.

3.2.2.-Expanded bed adsorption chromatography.

3.2.3.-Purification and identification of C-PC.

3.3.-Phycocyanins from *Spirulina platensis*.

3.3.1.-Extraction step.

3.3.2.-EBA chromatography.

3.3.3.-Purification and identification of C-PC.

4.-Conclusions.

1.-INTRODUCTION.

Phycobiliproteins are water soluble proteins that form light-harvesting antenna complexes (phycobilisomes) and act as photosynthetic accessory pigments in cyanobacteria and red algae. These proteins absorb visible light from 450 to 650 nm and are divided into three main classes based on their absorption spectra: phycoerythrins (PEs, λ_{\max} ~540-570 nm), phycocyanins (PCs, λ_{\max} ~610-620 nm) and allophycocyanins (APC, λ_{\max} ~650-655 nm) [1]. The main applications of phycobiliproteins are their use as fluorescent markers of cells and macromolecules in biomedical research, diagnostics, therapeutics and highly sensitive fluorescence techniques [2]. In addition, they have potential as natural colorants for use in food, cosmetics and pharmaceuticals, particularly as substitutes for synthetic dyes, which are generally toxic or otherwise unsafe [3-5]. Particularly, C-PC is of great interest because of its therapeutic value due to their protective effect and anticarcinogenic activity [6,7]. In this sense, C-PC is a blue pigment with strong antioxidative and anti-inflammatory activities [8,9]. Moreover, C-PC has been used for the treatment of Alzheimer's disease and Parkinson's disease [10] and the prevention of experimental oral and skin cancers [11]. Recently, this protein was reported to induce apoptosis in some carcinoma cells [12] and human chronic myeloid leukemia cell [13].

Although phycobiliproteins have many applications, their use is limited by the high cost of the purified macromolecules, mainly related with the cost of extraction and purification. To solve this bottleneck it is necessary to adopt new methodologies that allow recovering phycobiliproteins in large amounts at low cost. The conventional schemes for phycobiliproteins purification propose a sequence of unit operations which recover the product after a combination of different and complex methods as precipitation, centrifugation, dialysis, ion-exchange chromatography, gel filtration and chromatography on hydroxyapatite. In general, conventional methodologies involve two parts: (i) sample pretreatment in order to liberate the intracellular material, obtaining a crude extract, and (ii) purification of phycobiliproteins using conventional chromatography. Sample pretreatment consists of disintegration of the cell-wall, for which different methods have been used: ultrasound, lysozyme, mechanical breakage, treatment with rivanol, treatment with Triton X-100 and mechanical homogenization, ultrasound and extraction with acetone [14-16]. After cell-wall disintegration the phycobiliproteins are precipitated using ammonium sulfate. Centrifugation and dialysis of the samples is usually then necessary to obtain a crude extract. The second step involves one or more chromatographic processes. For C-PC purification, several

chromatographic methods are described in the literature involving adsorption, hydrophobic interaction, gel filtration or ion exchange chromatography [17,18]. A major drawback of these conventional protocols is the large number of steps involved, producing an important decrease in the product yield. Furthermore, the scale-up of these methods is difficult and expensive. Hence, there is a need for efficient and economical large-scale bioseparation methods, which will achieve high purity as well as high yield, while maintaining the biological activity of the molecules.

In the last years, different alternatives to the conventional methodologies are being developed such as aqueous two phase extraction [19] and expanded bed adsorption chromatography, EBAC [20]. EBAC is an alternative bioseparation technique that greatly reduces the number of purification operations for protein adsorption to gel media, capturing proteins from particle-containing feedstock. The use of this technique not only simplifies the clarification step, but also produces concentrated and partially pure product ready for the next purification step, usually chromatography on a packed bed in a single operation. The use of expanded beds simplifies the downstream-processing flow sheets for the recovery of a wide variety of proteins, with concomitant savings in equipment and operating costs [21-23].

In the present Thesis Memory, an expanded-bed methodology for large scale recovery of phycocyanins (PCs) from the microalgae *Anabaena marina*, *Synechocystis aquatilis* and *Spirulina platensis* is developed. First, the extraction of the product from the raw material was optimized. Second, the separation of C-PC from the crude extract was studied at small scale using EBAC and the chromatographic parameters of viscosity and expansion degree were optimized. Next, the EBAC process was scaled up 36 times by increasing the column diameter, the scale-up criteria being verified. Finally, the concentrate obtained from EBAC was loaded into a conventional DEAE-cellulose column where the product was purified by packed bed ion exchange chromatography. Purity of C-PC obtained was confirmed by SDS-PAGE electrophoresis and spectroscopic characterization. Results show that EBAC is a scalable technology that allows obtaining large quantities of C-PC without product loss, while maintaining a high protein recovery while reducing both processing cost and time compared to previous methodologies. In reference with *Spirulina platensis*, the process was developed at pilot scale using a 150 mm I.D. column obtaining a scale-up factor of 100. The phycocyanins purified were subjected to physico chemical characterization and their potential as natural colorants was tested.

2.-MATERIALS AND METHODS.

2.1.-Microalgal biomass.

The blue-green microalgae *Anabaena marina*, *Synechocystis aquatilis* and *Spirulina platensis*, were used as raw material. The biomass was obtained from continuous cultures carried out outdoors in a flat panel photobioreactor. The photobioreactor was 2.6 m wide, 1.6 m high and 0.07 m thick. It was operated at a dilution rate of 0.3 day⁻¹ outdoors in Almeria, Spain, during spring. Arnon medium was used for culture growth. The photobioreactor was aerated at 0.05 v/v/min and pH was controlled at 8.0 by on-demand injection of CO₂. Temperature of the culture was controlled at 20-30°C by passing thermostated water through a heat exchanger located inside the photobioreactor. Biomass was directly collected from the harvest by centrifugation and stabilized by freeze-drying. Dry biomass was then stored at 4°C until processing.

2.2.-Chemicals.

Streamline-DEAE anion-exchanger and materials used for sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) were from Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). Preswollen microgranular DEAE-cellulose DE-52 was from Whatman (Maidstone, UK). Molecular mass standards, dialysis tubing and tubing closures, ammonium sulfate, sodium azide and all other chemicals were from Sigma Diagnostics (St. Louis, MO, USA) and used without further purification.

2.3.-Extraction and measurement of phycobiliproteins.

For extraction of phycobiliproteins, water and buffer solutions were used, all of them with 0.01% sodium azide added. For all experiments, 2 g of biomass powder was mixed with 40 mL of liquid and the slurry was agitated for 30 min at constant speed by a Heidolph RZR1 variable-speed magnetic stirrer (Schwabach, Germany). The resulting slurry was transferred to centrifuge tubes and centrifuged at 12000 rpm for 15 min in a Meditronic BL-S Selecta centrifuge. The blue supernatant (crude extract) was collected, measured and the quantities of biliproteins (C-PC and APC) were determined according to Ec.1 and Ec.2. Absorbance measurements and absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer (Beaconsfield, UK) Lambda-20 UV-Vis spectrophotometer with a 1 cm light path.

$$C - PC(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}) = \frac{A_{615\text{nm}} - A_{730\text{nm}} - 0.47 \cdot (A_{625\text{nm}} - A_{730\text{nm}})}{5.34} \quad \text{Ec. 1}$$

$$APC(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}) = \frac{A_{652\text{nm}} - A_{730\text{nm}} - 0.2087 \cdot (A_{615\text{nm}} - A_{730\text{nm}})}{5.09} \quad \text{Ec. 2}$$

To determine the influence of number of extractions in the recovery of phycobiliproteins the same procedure was repeated by adding another 40 mL of liquid over the pellets obtained after the centrifugation, agitating, centrifuging and measuring again, the phycobiliproteins content in the supernatant using the same procedure. To obtain large volumes of crude extract for the purification steps, the process was repeated using the optimal extraction medium (50mM sodium phosphate buffer pH 7.0). All the supernatants from centrifugation were pooled obtaining a PCs crude extract that was stored at 4°C and utilized for EBAC experiments. The complete purification procedure is shown in Fig.1.

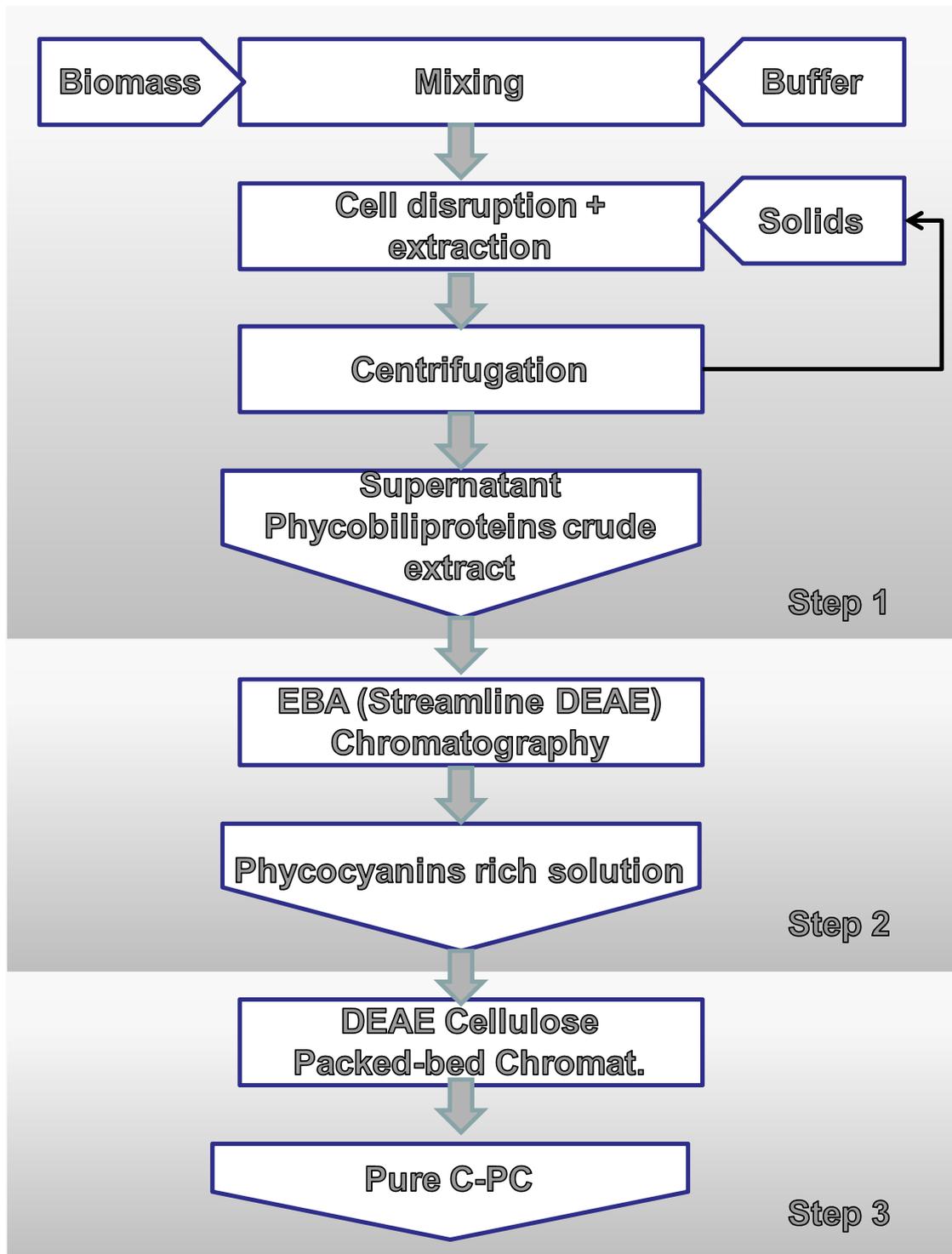


Fig. 1.- Schematic diagram of C-PC purification process.

2.4.-Expanded bed chromatography.

2.4.1.-Equilibrium adsorption isotherm and dynamic binding capacity.

The adsorption isotherm was obtained by shake flasks experiments. The adsorption parameters on the Streamline-DEAE chromatographic matrix were determined using phycocyanin crude extract. For this, 15 mL sealed shake tubes containing dilutions of the crude extract were used. The tubes were placed in a shaking water bath at 26 °C and 2 mL of Streamline-DEAE was added to each tube. After 24 h of equilibration time the content of the tubes was analyzed. The equilibrium concentration of C-PC in the bulk liquid phase was determined spectroscopically and the C-PC bound per mL of the ion-exchanger adsorbent at equilibrium was calculated by a mass balance. The maximum binding capacity was obtained using the linear form of the Langmuir's equation (Ec.3), where Q and C are the adsorbed and aqueous protein concentration in equilibrium, respectively:

$$Q = \frac{Q_{\max} \cdot C}{K_e + C} \quad \text{Ec. 3}$$

The dynamic binding capacity of the adsorbent was determined from the breakthrough profile using the 15 mm internal diameter column with a settled height of 15 cm. For this purpose a crude extract solution of C-PC (0.033 mg/mL) in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 (starting buffer) was used. Initially, starting buffer was pumped upwards through the bed at increasing flow rate until the bed stopped expanding. After this, the C-PC crude extract solution was applied to the expanded bed and the breakthrough curve was calculated as the amount of applied C-PC per ml adsorbent at different C/C_0 , where C_0 corresponds to the C-PC concentration in the crude extract and C the C-PC concentration in the flowthrough. Loading was terminated when C/C_0 rose to 0.4 approximately. The dynamic binding capacity (X_m) (mg of protein per ml of settled adsorbent) can be calculated according to Ec.4, where V_b is the volume at 10% breakthrough (mL), C_0 is the initial concentration or the unclarified feedstock (mg/mL) and V_s is the settled volume of the adsorbent (mL).

$$x_m = \frac{C_0 \cdot V_b}{V_s} \quad \text{Ec. 4}$$

2.4.2.-Expanded bed operation.

For expanded bed operation the columns were filled with the necessary volume of adsorbent to a constant settled height of 15 cm (H_0). Distilled water was then pumped

upwards through the bed until it stopped expanding. A Heidolph PD-5001 peristaltic pump (Schwabach, Germany) was used to regulate the flow-rate. When the bed was stable (after approximately 20-30 minutes) the column was equilibrated with a suitable volume of starting buffer. Next, a solution from the extraction step (PCs crude extract) was used as sample for EBA experiments. The PCs crude extract was applied, and the expanded bed runs were conducted at a constant bed height, maintaining it at the initial degree of expansion by altering the flows accordingly during the run. The PCs crude extract was constantly stirred during application to avoid settling. The upper adaptor of the column can be set 5 cm above the height to which the bed expands. The phycobiliproteins in the extract were captured by the adsorbent, while the cell debris, particles and most contaminant proteins were eluted by the upward flow. After application of the total sample volume, the columns were washed with the starting buffer until the absorbance at 615 nm in the effluent returned to the base line.

After washing in the expanded bed mode, the upward flow was stopped and the bed was allowed to settle in the column. The adaptor was then moved down to the settled bed surface and the phycobiliproteins were recovered using an isocratic elution of 500 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 (PCs rich solution). Fractions of 5-30 ml were collected during elution using a Redifrac fraction collector from GE Healthcare. Phycobiliproteins concentration was determined at 615 nm and the fractions with a blue color were pooled. Subsequently, cleaning-in-place procedure was carried out, the column being washed with three settled bed volumes of 0.5 M NaOH-1 M NaCl solution, three settled bed volumes of distilled water, three settled bed volumes of 25 % (v/v) acetic acid, and three settled bed volumes of distilled water. The column was prepared for a new experiment after equilibration with five settled bed volumes of starting buffer.

2.4.3.-*Small scale optimization.*

For the optimization of the expanded bed methodology on a small scale (15 mm i.d. column) the influence of the degree of expansion and viscosity of the sample in the yield of the process were studied. The degree of expansion was measured as H/H_0 , where H is the expanded bed height and H_0 is the settled bed height. Different degrees of bed expansion were essayed from 1.6 to 2.8, by pumping buffer and sample up into the Streamline-DEAE column at different flow-rates, from 7.8 to 16.1 mL/min (185 to 550 cm/h) In these experiments, a sample volume of 72 mL (0.33 mg C-PC/mL crude extract) and a protein/adsorbent ratio of

0.9 mg C-PC/mL adsorbent were used. Regarding the viscosity, different sample viscosities were assayed. Samples were prepared by C-PC crude extract (0.332 mg C-PC/mL) dilution with a suitable volume of buffer. Viscosity was measured in 100 mL samples using a Series 75 Cannon-Fenske Proton viscosimeter (Cannon Instrument Company, 2139 High Tech Rd., State College, PA 16803) calibrated against distilled water at 25°C.

2.5.-Production of high purity C-phycoyanin.

The PCs rich solution from EBAC step was used to obtain pure C-PC by anion-exchange chromatography. The PCs rich solution from EBAC was dialyzed against a suitable volume of 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0. The dialyzed solution (0.33 mg C-PC/mL) was applied to a column (2.5 x 20 cm) loaded with DEAE-cellulose DE-52 and pre-equilibrated with starting buffer. After washing with one bed volume of this buffer, the column was developed with 290 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0. C-PC was eluted from the column loaded with PCs rich solution and the fractions with an intense blue colour were pooled using a flow rate of 50 mL/h. Next, the column was cleaned and prepared for a new experiment, being washed with one bed volume of 500 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 and equilibrated with starting buffer. C-PC blue tubes were pooled, brought to 70% of saturation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and left to stand overnight in the dark at 4°C before centrifugation. The pellets of purified biliproteins were resuspended in small volumes of 5 mM sodium phosphate buffer, dialyzed overnight at 4°C against the same buffer and freeze-dried for later use.

2.6.-Identification of purified C-phycoyanin.

The content and purity of C-PC purified by anion exchange chromatography was determined by UV-vis absorption spectroscopy, steady-state fluorescence and electrophoresis. Absorbance measurements and absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer (Beaconsfield, UK) Lambda-20 UV-Vis spectrophotometer with a 1 cm light path. Fluorescence emission spectra were recorded on a Jasco FP-6500 spectrofluorometer (Kyoto, Japan). Protein concentrations were chosen so that re-absorption of the emission was negligible. All spectra were recorded at room temperature. The amount of phycobiliproteins was calculated using Ec. 1 and Ec. 2.

Electrophoresis was carried out in a Bio-Rad Miniprotean III vertical slab gel apparatus (Milan, Italy) using Laemmli-buffer system consisting of a 12.5% (w/v)

polyacrylamide slab gel, 0.75 mm thick, containing 0.1% (w/v) SDS with a stacking gel of 4% polyacrylamide. Samples were preincubated with 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 4.5% (v/v) β -mercaptoethanol, 0.025% (w/v) bromophenol blue, and 60 mM Tris-HCl buffer, pH 6.8, for 5 min at 95°C. Gels were run at room temperature and visualized by staining with 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 40% methanol (v/v) with 7% (v/v) acetic acid for 30 min, and destained in dilute acetic acid. The following proteins were used as molecular mass markers (in kDa): phosphorylase b (94.0), albumin (67.0), ovalbumin (43.0), carbonic anhydrase (30.0), trypsin inhibitor (20.0) and α -lactalbumin (14.4).

3.-RESULTS AND DISCUSSION.

3.1.-Phycocyanins from *Anabaena marina*.

3.1.1.-Extraction.

The optimization of the extraction method is a key step for the maximum recovery of any product. The extraction method must be selected considering the nature of the product and raw material but also the next steps downstream, in this case EBAC. Due to the high sensibility of phycobiliproteins to pH and ionic strength changes, water solutions with low ionic strength and neutral pH were selected as extraction phase. For the sake of simplicity and easy execution, a repeated single contact strategy was selected as contact method. The contact is carried out with only a smooth stirring due to the soft nature of raw material.

In this sense, previous test of EBAC performed using Streamline-DEAE showed that in crude extracts from blue-green algae the major fraction of contaminant proteins elutes when a 50 Mm sodium phosphate buffer pH 7.0 was pumped through the column, whereas phycocyanins eluted when 500 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 was circulated [22]. From these data it can be estimated that the optimal conditions for extraction would be those necessary to develop the EBAC step. To optimize the extraction step two variables were studied: (i) the composition of extraction media and (ii) its ionic strength. Results showed as the composition of extraction phase was the main variable determining the yield of process, the use of sodium phosphate buffer pH=7 allowing to obtain the highest value of 40.5% (Fig. 2A). The utilization of water can be also considered although ultrasounds do not enhance greatly the extraction yield. The use of acetate buffer pH 5.0 showed the lowest extraction yield, only of 9.9%. Regarding the ionic strength of the sodium phosphate buffer, results

showed as this variable influenced the recovery of phycobiliproteins, it increasing when the ionic strength decreases except at the lowest ionic strength tested (Fig. 2B). The highest extraction yield in only one step was 63.7%, it being obtained by osmotic shock using 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0. However, according with the next step (EBAC) the most appropriate ionic strength is 50 mM [22]. If 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 is used for extraction the recovery yield only decreases a 4.6%, to 59.1%, thus resulting similar to the highest recovery yield obtained with 0.1 M ionic strength. For this reason the 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 was finally selected as optimal. Anyway, this value can be increased by repeating the extraction procedure. Applying the repeated single contact strategy selected it was observed that the extraction yield can be increased up to 97% in only three steps (Fig. 3). The extraction must be repeated five times for an exhaustive recovery of the phycocyanins from the biomass, since no absorption was observed from phycocyanins in the supernatant from a sixth treatment of the sample.

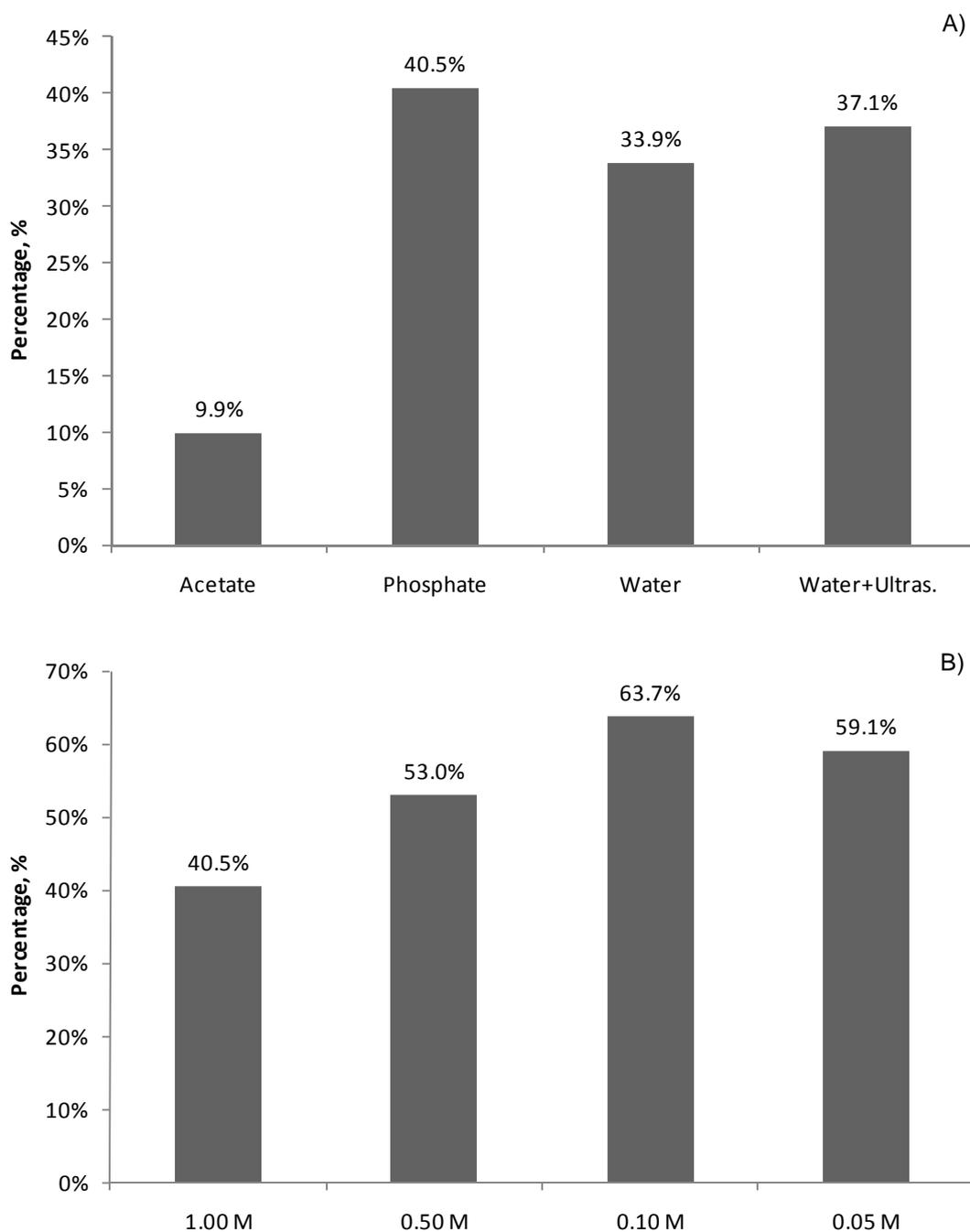


Fig. 2.-Influence of cells disruption methods on the recovery percentage of phycobiliproteins from *Anabaena marina* biomass: (A) acetate $1000 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, phosphate $1000 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, water and water + ultrasound; (B) different ionic strength of phosphate buffer.

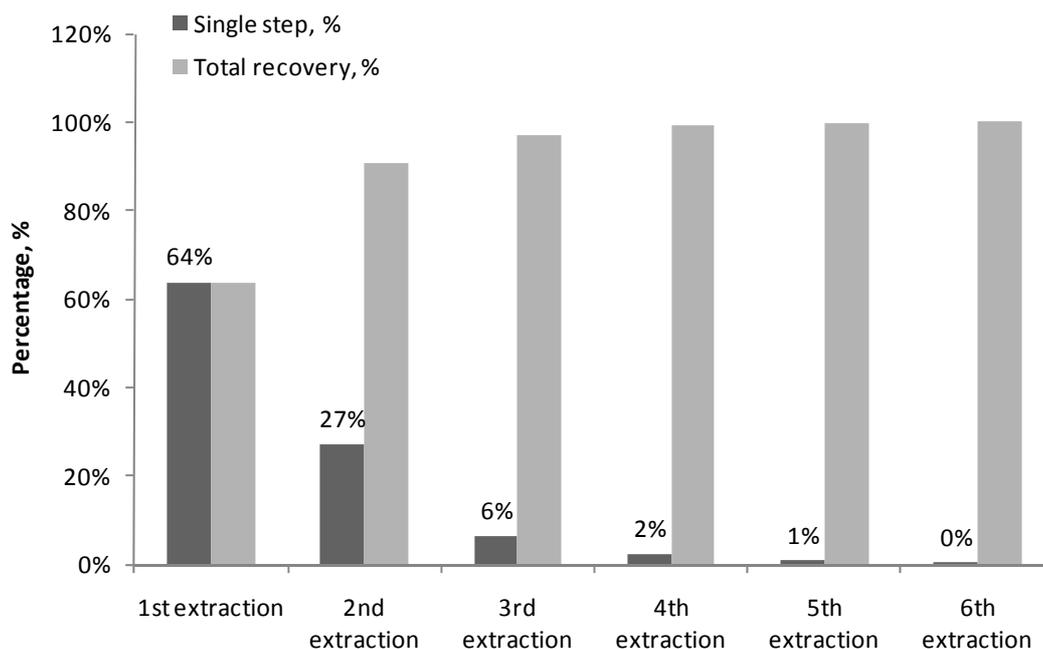


Fig. 3.-Influence of the repeated extraction strategy for cell disruption to maximize phycobiliproteins recovery.

The extract thus obtained was centrifuged to produce the supernatant (PCs crude extract) utilized in EBA chromatography. The absorption spectrum of this extract (Fig. 4) showed maxima absorption corresponding to a mixture of phycocyanins (C-PC and APC). The absorbance at 280 nm was greater than at 615 nm, which indicated the presence of other contaminant proteins besides C-PC. It is widely known that the aggregation state of phycobiliproteins in solution is strongly affected by pH, ionic strength and protein concentration. The extraction method developed provides suitable conditions for maintenance of the C-PC conformation because at neutral pH, moderate ionic strength and moderated protein concentration, the highest possible aggregation state is the trimer where the conformation and spectral properties are well maintained [22]. In addition, it should be emphasized that this extraction method is simpler than others that use ultrasounds, mechanical breakage or the addition of chemical compounds (lysozyme, rivanol, acetone, Triton X-100) [24]. The extraction method developed has been selected because of its simplicity and because it generates a solution in optimal conditions to be applied on EBAC.

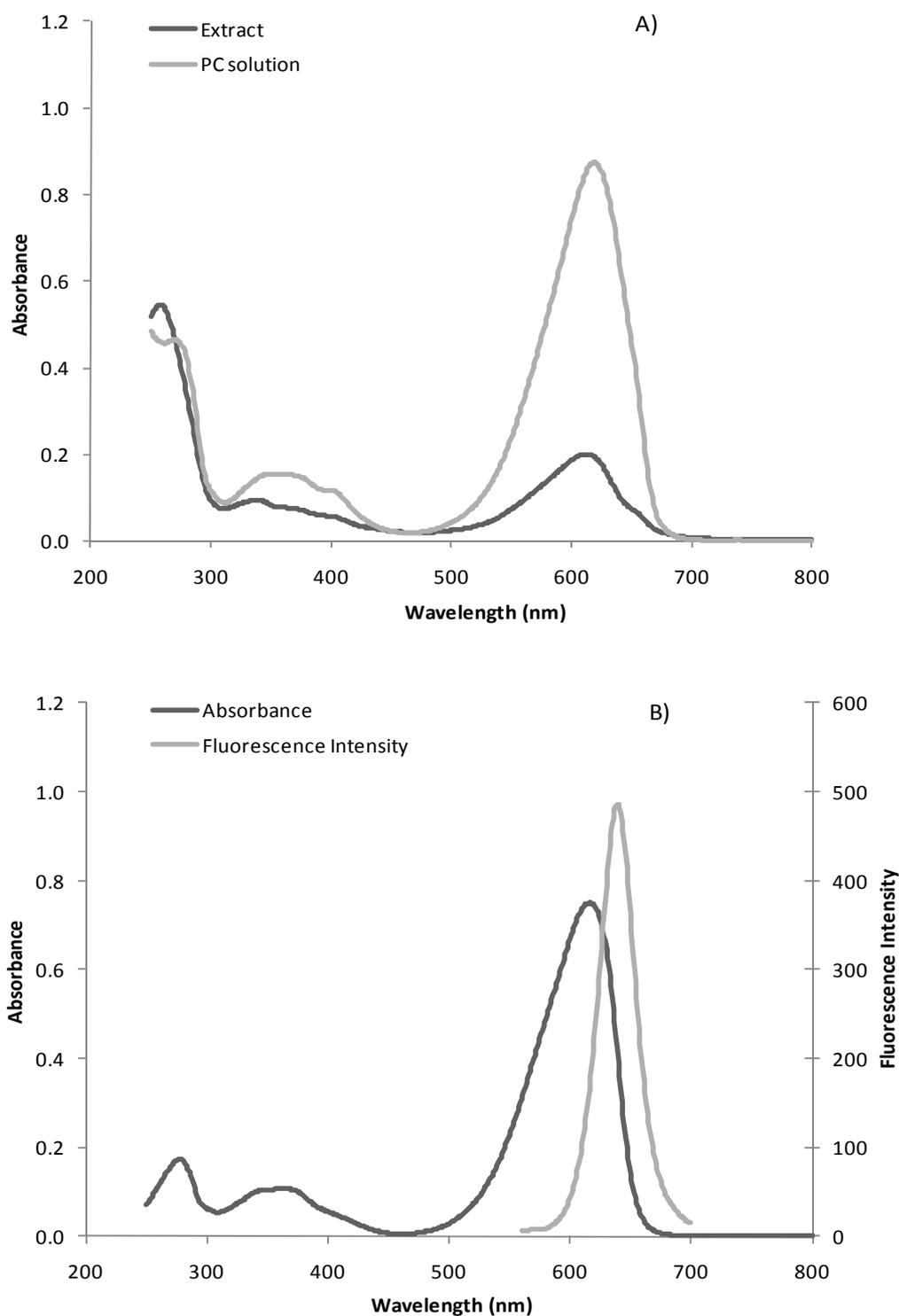


Fig. 4.-.(A) Absorption spectrum of phycocyanins crude extract and phycocyanins-rich solution from expanded bed adsorption chromatography.(B) Spectroscopic characterization (absorption spectra and fluorescence emission) of purified C-PC in $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium phosphate buffer pH=7.

3.1.2.-Expanded bed adsorption chromatography.

3.1.2.1.-Equilibrium and dynamic binding capacities.

The first step to develop an EBAC process is to determine the equilibrium adsorption properties of product and adsorbent at real conditions, using crude extract. For this the equilibrium adsorption isotherm on the Streamline-DEAE matrix using phycocyanins crude extract from *Anabaena marina* was obtained (Fig. 5). From these data, the maximum C-PC equilibrium binding capacity was calculated, based on the linear form of the Langmuir's equation, a value of 1.74 mg/mL being obtained. In previous studies the maximum binding capacity determined, using either pure C-PC or phycocyanins crude extract from *Spirulina platensis*, was 11.7 and 0.8 mg C-PC/mL adsorbent respectively [22]. These data demonstrate that the capacity of the adsorbent decreases considerably in the presence of other proteins in the crude extract. Thus, the non-specific binding of negatively charged compounds in the feedstock interfere with the binding of C-PC to the adsorbent, and hence resulted in a lower capacity. Otherwise, values obtained for both crude extracts were similar, indicating that the crude extracts from *Anabaena* and *Spirulina* have a similar composition, possibly because both are blue-green algae.

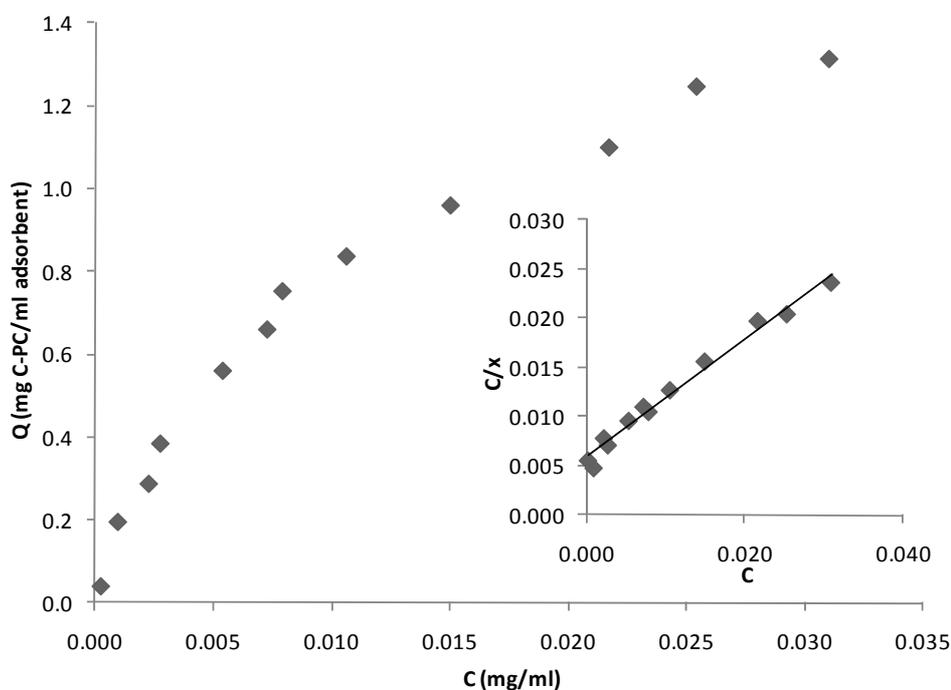


Fig. 5.-Equilibrium adsorption isotherm of C-PC from phycocyanins crude extract on the Streamline-DEAE matrix. Inside it showed the linearised isotherm form according to the Langmuir's equation.

The equilibrium binding capacity is the maximum amount of product that can be fixed in the adsorbent at large times. However, during the operation of the expanded bed there are phenomena that reduce the contact time and thus the binding capacity. For this reason the dynamic binding capacity must be determined to allow estimating the maximum loading volume of unclarified feedstock that can be applied to the column before achieving breakthrough of the target protein. The breakthrough curve for C-PC using Streamline-DEAE was measured in a 15 mm i.d. column (Fig. 6). The dynamic binding capacity of the bed was determined when the C-PC concentration in the column effluent reached 10% of the initial concentration ($C/C_0=0.1$) (Ec.4) in order to reduce the loss of the target product in flowthrough (25-27). In these conditions the dynamic binding capacity determined was 0.9 mg C-PC/mL Streamline-DEAE adsorbent. This value is lower than 1.7 mg C-PC/mL adsorbent obtained from adsorption isotherm because the time for solid-liquid phase to reach equilibrium was insufficient. During operation the liquid velocity and the viscosity of the mobile phase influence the dynamic binding capacity. In addition, the dynamic capacity for C-PC using Streamline-DEAE is low due to the large size of these proteins, which limits the binding of most of the target protein onto surface the of the adsorbent [28,29].

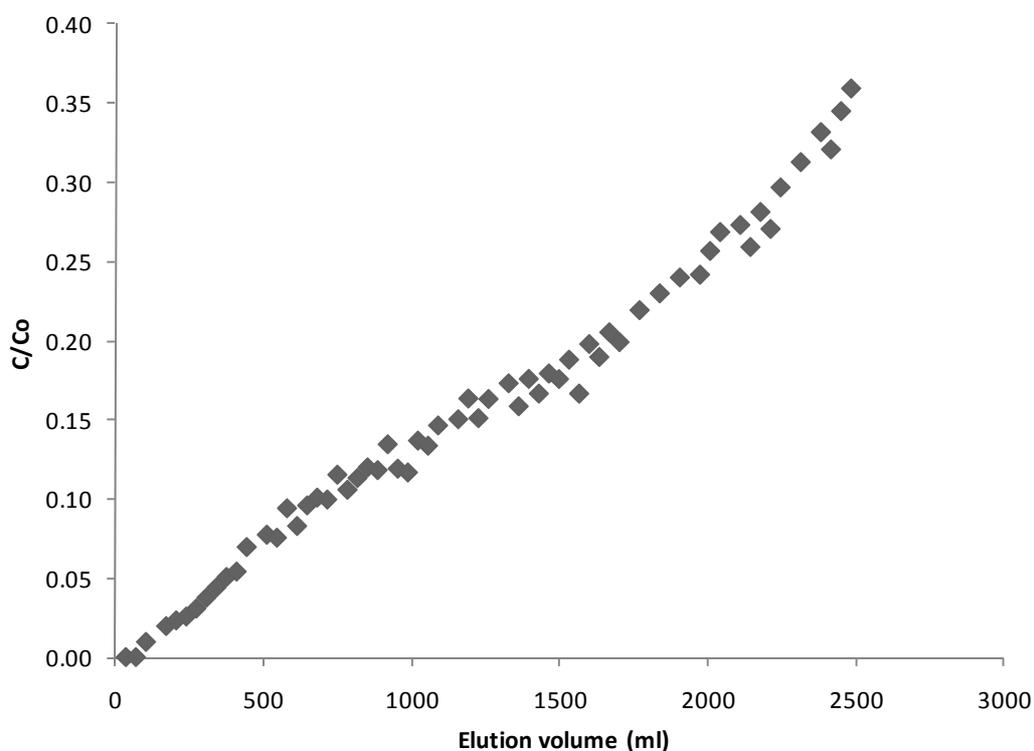


Fig. 6.-Breakthrough curve for phycocyanins crude extract on Streamline-DEAE using a 15 mm internal diameter column.

3.1.2.2.-*Optimization of expanded bed chromatography.*

To determine the optimal conditions for expanded bed operation, the influence of the expansion degree of the bed and viscosity of the feedstock in the protein recovery were studied at small scale, using a 15 mm i.d. column. Effective expanded bed operation is achieved when the volume of the expanded bed is between 2 and 3 times the volume of the packed bed material and the bed is stable. In these conditions the liquid flow through the bed is close to plug flow and the contact efficiency is close to packed bed [30]. To determine the optimal expansion degree of the bed, experiments were performed using the same sample load (0.9 mg C-PC/mL adsorbent) but modifying the liquid velocity to achieve degrees of expansion from 1.8 to 2.8. Results show that a maximum recovery of 87% was achieved when the expanded bed volume was twice the settled bed volume, being the liquid velocity necessary to achieve this expansion degree 250 cm/h (Fig. 7A). At expansion degrees from 1.8 to 2.2 the recovery of C-PC is similar and higher than 86%. However, at expansion degrees higher than 2.2 the recovery of C-PC decreases greatly. This is because at liquid flow rates below the optimum, the expansion degree is low and the mass transfer resistance is high and thus the product recovery and the performance of the system are poor. Opposite, at liquid flow rates above optimum the degree of expansion is excessive and, although the mass transfer resistance diminishes, the distance between matrix particles increases, leading to a lower amount of protein adsorbed on the gel particles. The optimum value of the expansion degree determined experimentally is equal to the previously referenced [20,22,31], thus supporting the idea that an expanded bed with double its settled height provides good results in similar systems.

The viscosity of the sample is another important factor to be considered in the optimization of expanded bed operations. In general, the physical properties of the feedstock can be unfavorable for effective processing in expanded beds. Such situations may occur when disrupted-cell preparations of high viscosity are pumped without dilution into the EBAC systems causing flow disturbance, unequal distribution of the sample and poor recovery of the target product [32]. Dilution of feedstock before application to the bed is a possible solution to such problems, although the consequent increase in the volume of liquid that needs to be applied to the bed may also reduce the efficiency of the expanded-bed step. The influence of the viscosity of the sample on the behaviour of the system was therefore analyzed. Experiments were conducted at the optimum expansion degree ($H/H_0 = 2$) and sample load (0.9 mg C-PC/ mL adsorbent), viscosity of the feedstock being modified from

1.109 to 1.025 mP by dilution. All the experiments performed adequately, the behaviour of the expanded bed column was close to plug flow and no channelling phenomena was observed. The results show that the yield of the process increased when the viscosity of sample decreased, the C-PC recovery increasing from 87 to 91 % when the viscosity decreased from 1.109 to 1.025 mP, the operation time increasing from 11 to 41 min (Fig. 7B). The decrease in the diffusion rate caused by the increase in viscosity reduces the adsorption of proteins into the gel particles. However, the increase in yield (4%) is not enough to justify a reduction in the viscosity of the sample by dilution, due to the consequent increase in the volume of liquid (four fold) which needs to be applied to the bed, that also reduce the efficiency of the expanded-bed procedure in terms of time and economy. For this reason it was concluded that no additional dilution should be performed.

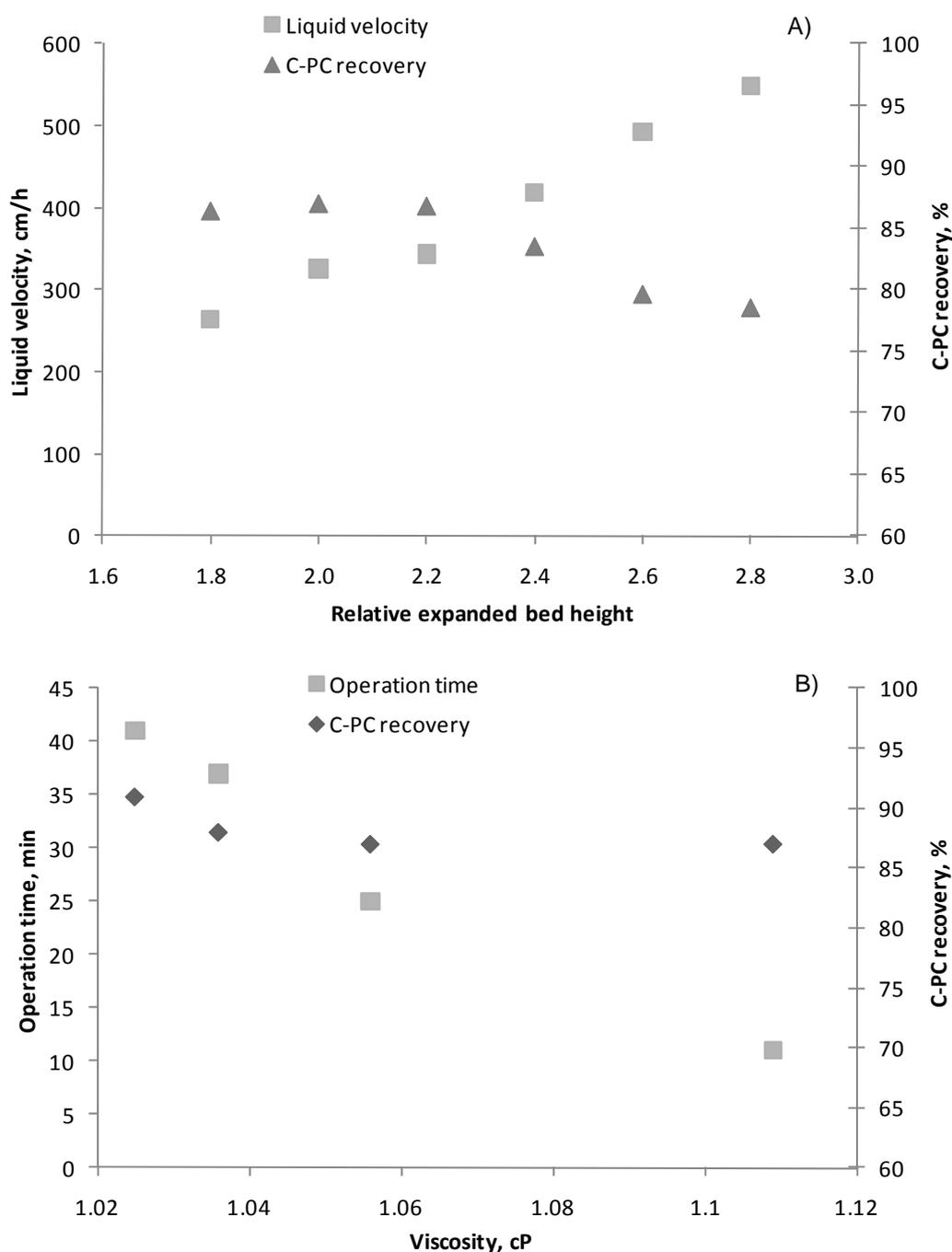


Fig. 7.- (A) Influence of the liquid velocity on bed expansion characteristics and C-PC recovery percentage. (B) Influence of viscosity on C-PC recovery percentage and operation time.

Once the expanded bed adsorption has been optimized, the next step is to recover the C-PC by elution from the bed. Previous to elution, the remaining unbound molecules are removed by washing the bed in expanded mode using starting buffer. Then, adsorbed C-PC can be eluted. Although the elution from Streamline-DEAE can be performed in expanded

bed or packed bed mode, elution in packed bed mode was previously selected as optimal (33). Thus, expanded bed adsorption experiments were performed at optimal operation conditions previously determined, the adsorbed C-PC being eluted using 500 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 in packed bed mode. Operating in these conditions, particulate material was not observed in the eluted fractions, the absorbance of effluent from the column during EBA chromatography being showed in Fig. 8. The absorbance of the fractions obtained shows a sharp peak, indicating a high elution efficiency. The UV-vis absorption spectrum of this PCs rich solution corresponds to a phycobiliproteins mixture where C-PC predominates with slight APC contamination (Fig. 4). The spectrum showed a significant loss of absorption in the near-UV region with respect to the crude extract spectrum. In addition, the purity ratio (A_{615}/A_{280}) was about 1.7, which is five times higher than of the crude extract ($A_{615}/A_{280}=0.3$), although it does not still meet the purity standard of C-PC. It should be emphasized that it was considered more important to achieve a high rate of phycocyanin recovery than a highly pure solution, since the procedure is intended to replace low-resolution steps that normally result in phycobiliproteins losses.

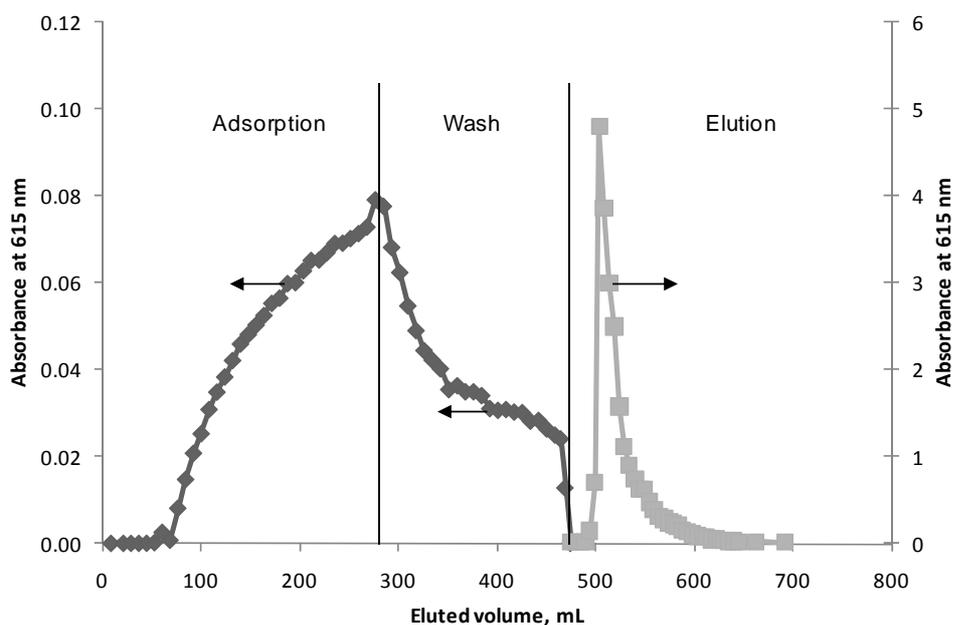


Fig.

8.-Absorbance at 615 nm of the effluent from the 15 mm internal diameter column during EBA chromatography of crude extract from *Anabaena marina* biomass. In the elution step, the absorbance was measured after suitable dilution. Thus, the absorbance values in ordinate axes are the resulting values after multiplication by the dilution factor.

3.1.2.3.-Scale-up of expanded bed chromatography.

Once the operation of expanded bed adsorption chromatography has been optimized at small scale, it was scaled-up to columns of 25 mm, 40 mm, 60 mm and finally 90 mm i.d. For scale up of expanded bed adsorption columns it is a must to keep the form of the breakthrough curve constant. This is a function of the length of the column and the feedstock flow rate, and thus both parameters must be kept constant on the larger scale. All the different internal diameter columns essayed were filled with 15 cm of Streamline-DEAE. Regarding the flow rate, the liquid velocity (flow rate divided by cross-sectional area) must be also kept constant. Thus, if the column diameter is modified, the volumetric feedstock flow rate has to be increased in proportion to the cross section of the column. To verify that the scale-up procedure was adequate the performance of the different columns was evaluated by operating them according to the optimal conditions obtained in previous experiments. Data from the runs performed in the different columns are shown in Table 1. The yield of C-PC on all scales was in the range of 82 to 86%, an influence of the column size being not observed. Fig. 9 shows the chromatographic profile obtained using the 60 mm i.d. column, which is analogous to the obtained using the 15 mm internal diameter column (Fig. 8). Moreover, the chromatographic profile of the eluates obtained from the different expanded bed runs performed using different columns were identical, with absorbance ratio values of $A_{615}/A_{280} \approx 1.6$. These results verify the consistency of the scale-up process used and the reproducibility of large scale Streamline-DEAE columns.

Table 1.- Summary of data from small to large scale recovery of C-PC from *Anabaena marina* by expanded bed adsorption chromatography using 15 cm (settled bed height) Streamline DEAE at 256 cm/h in Streamline columns (15-90 mm i.d.).

Column i.d. (mm)	C-PC loaded (mg)	Sample Volume (ml)	Elution peak (SBV)	Elution peak (ml)	Settled volume (ml)	Total time operation (min)	C-PC recovered (mg)	C-PC recovery (%)
15	24	234	19.1	506	27	102	18	86.1
25	66	645	20.0	1506	74	119	55	82.8
40	170	1652	19.2	3629	189	140	146	85.9
60	382	3718	20.2	8586	424	152	325	85.0
90	859	8366	20.7	19748	954	176	723	84.2

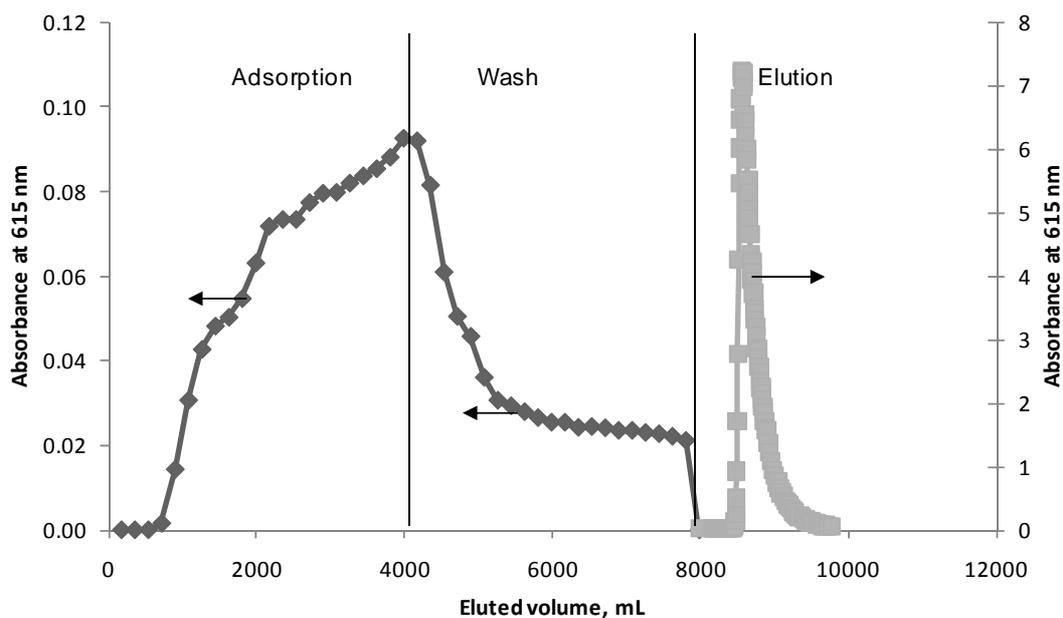


Fig. 9.-Absorbance at 615 nm of the effluent from the 60 mm internal diameter column during EBA chromatography of crude extract from *Anabaena marina* biomass. In the elution step, the absorbance was measured after suitable dilution. Thus, the absorbance values in ordinate axes are the resulting values after multiplication by the dilution factor.

3.1.3.-Purification and identification of C-PC.

Finally, in order to obtain pure C-PC, the eluate obtained from EBAC was subjected to anion-exchange chromatography in packed bed mode to eliminate APC and other colorless proteins. Prior to this, the fractions recovered from the Streamline-DEAE column (PCs rich solution) were precipitated, resuspended in starting buffer and dialyzed against the same buffer, finally they were loaded in the starting buffer-pre-equilibrated column. To separate pure C-PC by anion-exchange chromatography, continuous and discontinuous ionic strength gradients were assayed, as well as pH gradients. The pH gradient protocol was not successful (data not shown) and so pure C-PC was recovered using ionic strength discontinuous gradient. For this the column was developed with 290 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 using a flow rate of 50 mL/h. The recovery of C-PC after DEAE-cellulose chromatography was 74%, expressed as the percentage of pure C-PC in the final concentrate versus the total C-PC loaded onto the ion-exchange matrix. So, the overall recovery measured using the proposed method is 62% (Table 2). The C-PC fractions whose spectroscopic purity ratios (A_{615}/A_{280})

were higher than 4.0 were pooled, lyophilized and stored in the dark at -20 °C.

Table 2.- Recovery and purity of fractions obtained during the proposed process.

Purification step	C-PC recovery on step (%)	Purity ratio A_{615}/A_{280}
Extraction	97	0.4
EBA chromatography	86	1.6
Streamline DEAE		
Packed bed chromatography cellulose DE-52	74	>4
Overall C-PC recovery	62	

To analyze the evolution of purity during the overall process, samples obtained in each one of the stages (extraction, expanded bed chromatography and anion-exchange chromatography) were developed by SDS-PAGE electrophoresis. Fig. 10 shows that unwanted proteins were removed at each successive chromatographic step (lanes 2 to 4). The bands located near 20 kDa in lanes 2 and 3 should be assigned to the combination of C-PC and APC α - β -subunits (intense bands) and other bands (less intense) correspond to contaminant proteins, these being less intense than biliprotein bands. It can be observed that many of the unwanted proteins from crude extract (lane 2) were removed after EBA chromatography (lane 3). Subsequently, after anion-exchange chromatography only two bands with similar intensities (lane 4) which should be the α - and β -subunits of C-PC were detected. By comparing with the molecular markers, purified C-PC showed two bands corresponding to 17.6 and 20.5 kDa respectively. These values agree with those reported earlier [22,34,35].

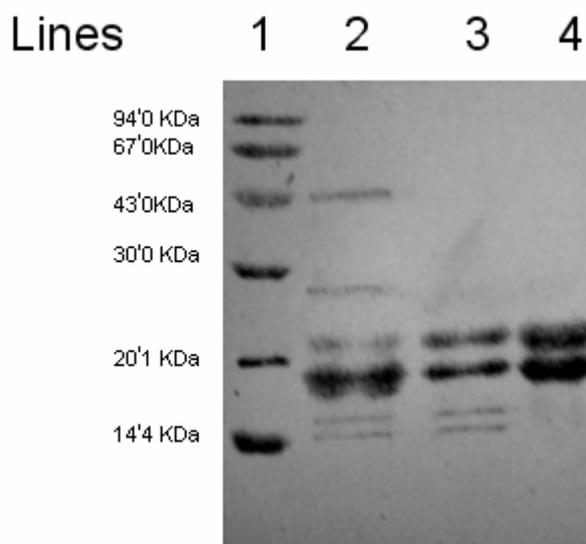


Fig.10.- SDS-PAGE analysis of proteins solutions from different purifications steps. Lane 1: molecular mass markers; lane 2: phycocyanins crude extract; lane 3: eluate after EBA chromatography; lane 4: eluate after packed bed chromatography.

Phycocyanins purity and their conformational state were also tested using spectroscopic characterization. Fig. 4B shows absorption and fluorescence spectra from the pure C-PC solutions obtained. A sharp increase in a single peak at 615 nm shows the absorbance maximum of C-PC, whereas a decrease in absorbance at 280 nm indicates the removal of other proteins. There was no absorbance peak or shoulder at 650 nm, suggesting the absence of APC from the purified sample. The absorption spectra of the trimeric and monomeric C-PC forms are only slightly affected by the aggregation changes in the protein. Thus, the absorption and fluorescence spectra from the dialyzed C-PC solutions in Fig. 4B agree with those published for pure C-PC [36,37], although it is not possible to recognize the aggregation state from these spectra. The easiest and most explanatory spectroscopic test to determine the aggregation state of biliproteins is to record the excitation fluorescent steady-state anisotropy spectrum (data not shown). Since energy transfer between chromophores modulates the fluorescent properties of these proteins, a dramatic increase in the anisotropy spectra has been observed when the aggregation state of the biliproteins changes from trimers to monomers [36,37], due to the chromophores uncoupling, which altered the pathways for energy transfer between them. The spectra shapes and the quantitative values of the C-PC are similar to those published earlier for trimeric C-PC from *S. platensis* [38].

3.2.-Phycocyanins from *Synechocystis aquatilis*.

This cyanobacteria have phycobiliproteins content higher than other previously reported as *Spirulina* or *Anabaena*, of 2.8% versus 1.9% and 2.1% respectively. First, the extraction of the product from the biomass was optimized. Next, C-PC was separated by EBA chromatography using Streamline-DEAE. The purity of C-PC obtained was confirmed by SDS-PAGE electrophoresis, spectroscopic characterization and RP-HPLC. The operation of expanded bed technology was optimized on a small scale, the chromatographic parameters of sample load, viscosity and expansion degree being studied. Next, the process was scaled up 36 times by increasing the column diameter, while parameters such as the settled bed height, linear flow-rate and protein load remained constant. Technology of EBA allows obtaining concentrates ready to be loaded into a conventional DEAE-cellulose column, where the product was purified by packed bed ion exchange chromatography. Using this methodology pure C-PC is obtained and the protein recovery is maximized.

3.2.1.-Extraction step.

To optimize the extraction step the influence of extract phase and number of extraction steps was studied. Extraction experiments were carried out by repeated single contact using different water solutions and ultrasounds to maximize yield. Results showed as maximum yield was obtained when low ionic strength solutions were used, the use of ultrasounds does not strongly modifying the recovery yield (Table 3). Thus, total recovery yields higher than 90% were obtained using distilled water or phosphate buffer with ionic strength below 0.50 M. The lowest recovery yield, of 32%, was measured when using acetate buffer (1.00M, pH=5) whereas if phosphate buffer (1.00M, pH=7) was used the recovery yield increased up to 60%. Regarding the number of extractions, a mean value of 82% of total phycocyanins were extracted in the first extraction step whereas second extraction allows to obtain an additional 12%, thus a total mean recovery of 94% being obtained. Remaining 6% was recovered in a third extraction step no absorption being observed from phycocyanins in the supernatant from a fourth treatment of the sample.

Table 3.- Influence of extractant phase and method in the recovery of phycocyanins from *Synechocystis aquatilis* biomass.

	First extraction				Second extraction				Total phycobiliproteins	
	CPC, mg	APC, mg	Total, mg	%	CPC, mg	APC, mg	Total, mg	%	mg	%
Distilled water	55.4	21.0	76.46	85%	5.2	2.6	7.85	9%	84.3	94%
Distilled water+ultrasounds	57.7	17.6	75.31	84%	6.0	5.4	11.43	13%	86.7	96%
Phosphate buffer (0.05M, pH=7)	45.6	26.1	71.69	80%	7.5	4.7	12.23	14%	83.9	94%
Phosphate buffer (0.10M, pH=7)	48.6	26.2	74.83	83%	5.1	3.3	8.37	9%	83.2	92%
Phosphate buffer (0.50M, pH=7)	44.3	26.2	70.51	78%	7.5	4.5	12.04	13%	82.6	92%
Phosphate buffer (1.00M, pH=7)	26.7	15.8	42.52	47%	6.8	4.3	11.09	12%	53.6	60%
Acetate buffer (1.00M, pH=5)	14.2	7.0	21.15	24%	5.3	2.4	7.63	8%	28.8	32%

The extract thus obtained was centrifuged to produce the PCs crude extract which was utilized in EBA chromatography. The absorption spectrum of this extract (Fig. 11) showed high absorption at 615 nm, corresponding to a mixture of phycocyanins (C-PC and APC). The absorbance at 280 nm was greater than at 615 nm, which indicated the presence of other contaminant proteins besides phycocyanins.

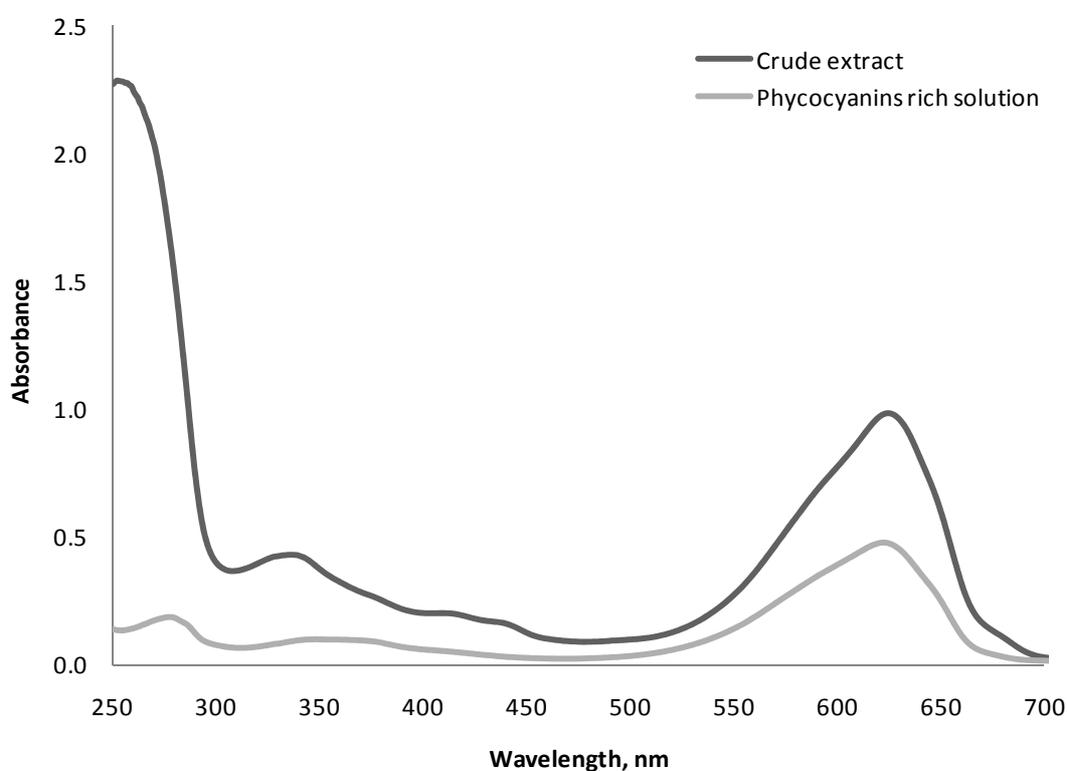


Fig 11.- Absorbance spectrum of crude extract before EBAC and phycocyanins rich solution after EBAC.

The optimization of the extraction step is a key factor to maximize the recovery of any product. The extraction method must be selected considering the nature of the product and raw material, but also the next steps in downstream, in this case EBAC. Due to the high sensibility of phycobiliproteins water solutions with low ionic strength and neutral pH are recommended as extract phase [22]. Moreover, extraction must be performed by smooth stirring due to the soft nature of raw material. Results showed as total recovery yields higher than 90% were obtained using distilled water or phosphate buffer with ionic strength below 0.50 M (Table 3). In addition, data showed the adverse effect of low pH, the recovery of C-PC being lower at pH 5.0 (32%) than at pH 7.0 (60%) for the same ionic strength (1.00 M). By these reasons, although maximal yield of 96% was obtained using distilled water it is recommended to use phosphate buffer pH 7.0 in order to stabilize the pH. Moreover, according with the next step (EBAC) the most appropriate ionic strength is 50 mM [22]. For this reason the 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 was finally selected as optimal. To enhance the yield of extraction a repeated single contact strategy is necessary. Results showed as, using 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 80% of total phycocyanins were extracted in the first extraction step whereas second extraction allows to obtain an additional 14%, thus a total mean recovery of 94% being obtained. An additional extraction will allow recovering an additional 6%. The extract thus obtained is rich in phycobiliproteins also containing other proteins and compounds, the purity ratio A_{615}/A_{280} being 0.7 (Fig. 11). It is widely known that the aggregation state of phycobiliproteins in solution is strongly affected by pH, ionic strength and protein concentration. The extraction method developed provides suitable conditions for maintenance of the C-PC conformation because at neutral pH, moderate ionic strength and moderated protein concentration, the highest possible aggregation state is the trimer where the conformation and spectral properties are well maintained [22]. In addition, it should be emphasized that this extraction method is simpler than others that use ultrasounds, mechanical breakage or the addition of chemical compounds (lysozyme, rivanol, acetone, Triton X-100). The extraction method developed has been selected because of its simplicity and because it generates a solution in optimal conditions to be applied on EBAC.

3.2.2.-Expanded bed adsorption chromatography.

To determine the equilibrium binding capacities the equilibrium adsorption isotherm of C-PC on the Streamline-DEAE matrix using phycocyanins crude extract was determined

(Fig. 12). Data showed as the maximum C-PC equilibrium binding capacity was 5.2 mg/mL, it being calculated considering the linear form of the Langmuir's equation. In addition, the dynamic binding capacity was measured. For this the breakthrough curve for C-PC using Streamline-DEAE was determined in a 15 mm i.d. column (Fig. 13). The dynamic binding capacity of the bed was determined when the C-PC concentration in the column effluent reached 10% of the initial concentration ($C/C_0=0.1$) (Ec.4) in order to reduce the loss of the target product in flowthrough [22]. In these conditions the dynamic binding capacity determined was 4.9 mg C-PC/mL Streamline-DEAE adsorbent. This value was only slightly lower to the static value measured of 5.2 mg/mL. Differences were due to time for solid-liquid phase to reach equilibrium was insufficient.

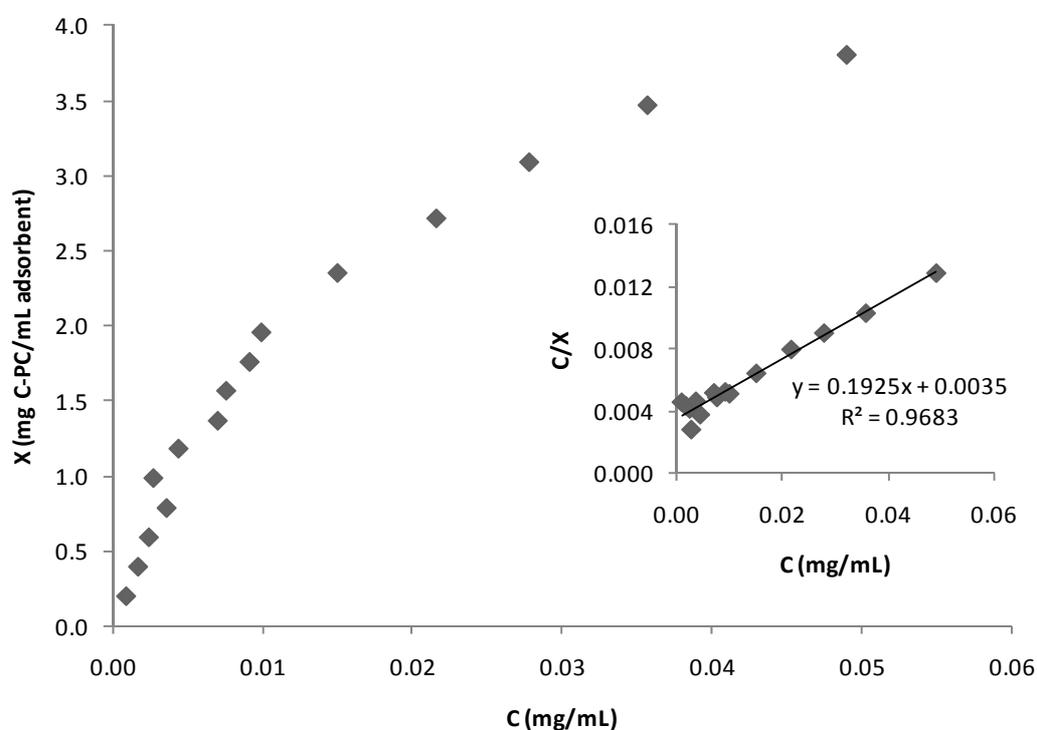


Fig 12- Equilibrium adsorption isotherm of C-PC on Streamline-DEAE determined using phycocyanins crude extract.

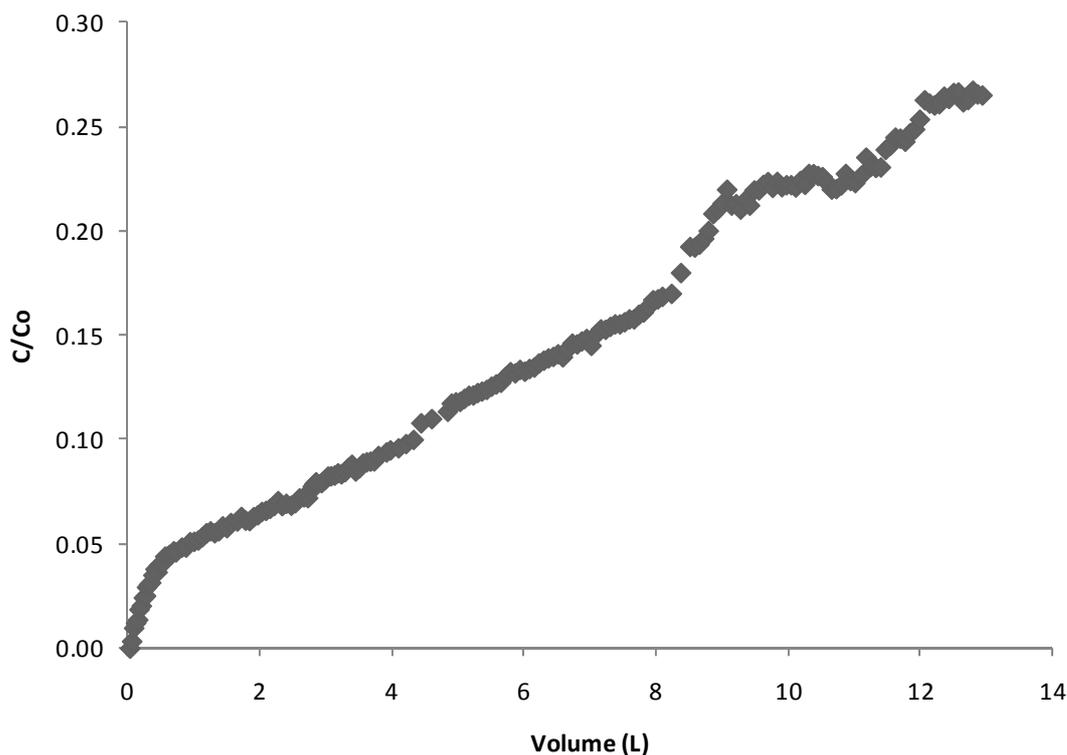


Fig 13.- Breakthrough curve for C-PC on Streamline-DEAE obtained at small scale (column i.d. 15 mm) using crude extract of phycobiliproteins.

Regarding the optimal conditions for expanded bed operation, the influence of the expansion degree of the bed and viscosity of the feedstock in the protein recovery were studied at small scale, using a 15 mm i.d. column. To determine the optimal expansion degree of the bed, experiments were performed using the same sample load (4.9 mg C-PC/mL adsorbent) but modifying the liquid velocity to achieve degrees of expansion from 1.8 to 2.8 (Table 4). Results show that a maximum recovery of 84.6% was achieved when the expanded bed volume was twice the settled bed volume, a liquid velocity of 9.6 mL/min being necessary to achieve this expansion degree. At expansion degrees from 1.8 and 2.2 the recovery of C-PC is similar and higher than 79%. However, at expansion degrees higher than 2.2 the recovery of C-PC decreases greatly.

Table 4.- Influence of expansion degree in the flow rate necessary to achieve it and C-PC recovery, using a column i.d. 15 mm and Streamline-DEAE.

H/H₀	Flow rate (mL/min)	C-PC recovery (%)
1.8	7.8	78.8
2.0	9.6	84.6
2.2	10.1	79.2
2.4	12.3	78.0
2.6	14.5	76.1
2.8	16.1	74.5

In addition to expansion degree, the influence of the viscosity of the sample on the behaviour of the system was therefore analyzed. These experiments were conducted at the optimum expansion degree ($H/H_0 = 2$) and same sample load (4.9 mg C-PC/mL adsorbent), the viscosity of the feedstock being modified from 1.157 to 1.020 mP by dilution with buffer (Table 5). All the experiments performed adequately, the behaviour of the expanded bed column was close to plug flow and no channelling phenomena were observed. The results show that the yield of the process increased when the viscosity of sample decreased, the C-PC recovery increasing from 84 to 91% when the viscosity reduced from 1.157 to 1.020 mP, although the operation time increases from 14 to 56 min and volume of sample to be applied to the bed increase three fold.

Table 5.- Influence of viscosity of the sample in the recovery of C-PC and time necessary to perform the operation, using a column i.d.15 mm with Streamline-DEAE.

Viscosity (mP)	Volume (mL)	Recovery of C- PC (%)	Time (min)
1.157	60	84.0	14
1.057	120	84.6	29
1.020	180	90.7	41
1.020	240	91.0	56

Once the optimal conditions for expanded bed adsorption have been determined, the next step is to recover the C-PC by elution from the bed. The adsorbed C-PC was eluted using 0.50 M sodium phosphate buffer pH 7.0 in packed bed mode. Operating in these conditions, particulate material was not observed in the eluted fractions, the absorbance of effluent from the column during EBA chromatography being showed in Fig. 14A. The absorbance of the

fractions obtained shows a sharp peak, indicating high elution efficiency. The UV-vis absorption spectrum of the obtained PCs rich solution showed a significant loss of absorption in the near-UV region with respect to the crude extract spectrum (Fig. 11). In addition, the purity ratio (A_{615}/A_{280}) was about 2.6.

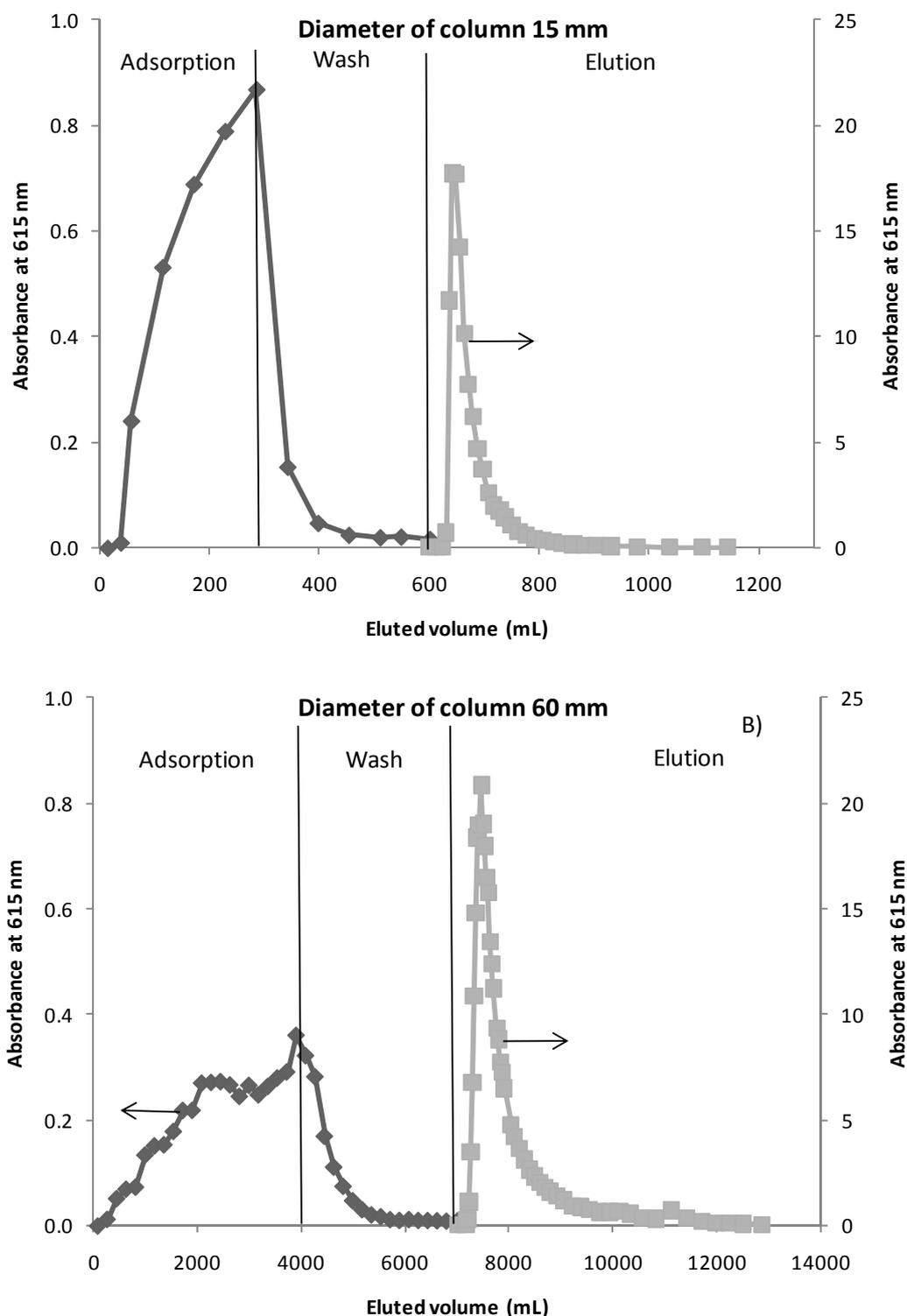


Fig 14.- Absorbance of effluent from column during EBA chromatography. A) Small scale, column i.d. 15 mm; B) Large scale, column i.d. 60 mm.

To scale-up the operation of expanded bed adsorption chromatography it is necessary to maintain the form of the breakthrough curve constant, thus the length of the column and the feedstock flow rate must be kept constant on the larger scale. To verify it, experiments were performed using columns of 25 mm, 40 mm, 60 mm and finally 90 mm i.d. Whatever the internal diameter the columns were filled with 15 cm of Streamline-DEAE, it being operated at expansion degrees equal to 2.0. To achieve this expansion degree the volumetric feedstock flow rate was increased in proportion to the cross section of the column, thus the feedstock flow rate through the cross section of the column remaining constant. Data showed as the yield of C-PC was in the range of 88.0 to 92.7%, influence of diameter of the column being not observed (Table 6). Figure 14B shows the chromatographic profile obtained using the 60 mm i.d. column, which is analogous to the obtained using the 15 mm internal diameter column (Fig. 14A).

Table 6.- Summary of data from small to large scale of recovery of C-PC by expanded bed adsorption chromatography on 15 cm (settled bed height) Streamline DEAE columns (15-90 mm i.d.) at liquid linear velocity of 3.26 m/h.

Column i.d. (mm)	C-PC loaded (mg)	Sample Volume (mL)	Elution peak (SBV)	Elution peak (mL)	Settled volume (mL)	Total time operation (min)	C-PC recovered (mg)	C-PC recovery (%)
15	130	261	20.7	643	31	148	118	90.8
25	361	726	20.8	1545	74	160	335	92.7
40	924	1860	19.2	3620	189	193	809	88.0
60	2078	4184	19.0	7468	395	209	1869	90.0
90	4572	9205	20.0	19748	986	224	4106	89.8

The first step to develop an EBAC process is to determine the equilibrium adsorption properties of product and adsorbent. For this, the equilibrium adsorption isotherm of C-PC on the Streamline-DEAE matrix using the phycocyanins crude extract was determined, an equilibrium binding capacity of 5.2 mg/mL being measured. In previous studies the maximum binding capacity determined, using either pure C-PC and phycocyanins crude extract from *Spirulina platensis*, was 11.7 and 0.8 mg C-PC/mL adsorbent, respectively [22]. For crude extract from *Anabaena marina* a value of 0.9 mg C-PC/ml adsorbent was found [39]. These data demonstrate that the capacity of the adsorbent decreases considerably in the presence of other proteins in the crude extract. Thus, the non-specific binding of negatively charged compounds in the feedstock interfere with the binding of C-PC to the adsorbent, and hence resulted in a lower capacity. Otherwise, values obtained for crude extracts obtained from *Synechocystis* were quite different that obtained for *Spirulina* and *Anabaena*, indicating that

the crude extracts from *Synechocystis* have a different composition than obtained from *Spirulina* and *Anabaena*.

The equilibrium binding capacity determines the maximum amount of product that can be fixed in the adsorbent, the real or dynamic binding capacity during the operation being lower due to the existence of phenomena that reduces the contact time and thus the binding capacity. In this sense, the dynamic binding capacity must be experimentally determined as the maximum loading volume of unclarified feedstock that can be applied to the column before achieving breakthrough of the target protein. Experimentally the dynamic binding capacity determined was 4.9 mg C-PC/mL Streamline-DEAE adsorbent. This value was slightly lower to the static value measured of 5.2 mg/mL due to time for solid-liquid phase to reach equilibrium was insufficient. Thus, during operation the liquid velocity and the viscosity of the mobile phase influences the dynamic binding capacity. In addition, the dynamic capacity for C-PC using Streamline-DEAE is low due to the large size of these proteins, which limits the binding of most of the target protein onto surface of the adsorbent [23, 31]. These values agree with others papers where adsorption capacity of the adsorbent is usually lower in the dynamic mode than in the static [40].

Once the dynamic capacity of the adsorbent is determined, the optimal conditions for expanded bed operation must be determined, two major factors determining it: (i) the expansion degree of the bed and (ii) the viscosity of the feedstock. Effective expanded bed operation is achieved when the volume of the expanded bed is between 2 and 3 times the volume of the packed bed material, and the bed is stable. In these conditions the liquid flow through the bed is close to plug flow and the contact efficiency is close to packed bed [32]. In this case, the maximum recovery of 84.6% was achieved when the expanded bed volume was twice the settled bed volume. To achieve this expansion degree the flow rate was of 9.6 mL/min, it corresponding to a linear liquid velocity through the cross section of the tube of 3.26 m/h. At expansion degrees higher than 2.2 the recovery of C-PC decreases greatly due to at liquid flow rates below the optimum, the expansion degree is low and the mass transfer resistance is high, thus the product recovery and the performance of the system are poor. Opposite, at liquid flow rates above optimum the degree of expansion is excessive and, although the mass transfer resistance diminishes, the distance between matrix particles increases, leading to a lower amount of protein adsorbed on the gel particles. The optimum value of the expansion degree determined experimentally is equal to the previously referenced [25, 27, 34], thus supporting the idea that an expanded bed with double its settled height provides the best results.

Regarding the viscosity of the sample, is another important factor to be considered in the optimization of expanded bed operations. In general, the physical properties of the feedstock can be unfavourable for effective processing in expanded beds. Such situations may occur when disrupted-cell preparations of high viscosity are pumped without dilution into the EBAC systems causing flow disturbance, unequal distribution of the sample and poor recovery of the target product. Dilution of feedstock before application to the bed is a possible solution to such problems, although the consequent increase in the volume of liquid that needs to be applied to the bed may also reduce the efficiency of the expanded-bed step. Experiments performed showed as the yield increased when the viscosity of sample decreased, maximum recovery of C-PC of 91% being measured when the viscosity reduced to 1.020 mP. To reach this viscosity the sample must be diluted with buffer thus the volume of sample increasing, time necessary to perform the operation also increasing. In spite of these disadvantages the increases of yield of 7% justify it, concluding that dilution of the sample is necessary.

To recover the C-PC from the bed it must be eluted adequately. Although the elution from Streamline-DEAE can be performed in expanded bed or packed bed mode, elution in packed bed mode was previously selected as optimal [22]. Performed experiments indicates high elution efficiency, a sharp peak on absorbance curve being measured (Fig. 14A). The UV-vis absorption spectrum of the obtained PCs rich solution corresponds to a phycobiliproteins mixture where C-PC predominates with slight APC contamination (Fig. 11). In addition, the purity ratio (A_{615}/A_{280}) was about 2.6, which is four times higher than of the crude extract ($A_{615}/A_{280}=0.7$), although it does not still meet the purity standard of C-PC. It should be emphasized that it was prioritized to achieve a high rate of phycocyanin recovery than a highly pure solution, since the procedure is intended to replace low-resolution steps that normally result in phycobiliproteins losses.

Finally, once the operation of expanded bed adsorption chromatography has been optimized at small scale, it was scaled-up. The criterion for scale-up of expanded bed adsorption columns is to maintain the form of the breakthrough curve constant. It is a function of the length of the column and the feedstock flow rate, thus both parameters must be kept constant on the larger scale. To verify it, experiments were performed using columns from 25 to 90 mm i.d. Results showed as the criterion for scale-up used was right, influence of diameter of the column in the yield of C-PC being not observed (Table 6). Actually, the chromatographic profile obtained using the 60 mm i.d. column (Fig. 14B) and the 15 mm i. d. column (Fig. 14A) were identical. Moreover, the chromatographic profile of the eluates obtained from the different expanded bed runs performed using different columns were

identical, with absorbance ratio values of $A_{615}/A_{280} \approx 2.61$. These results verify the consistency of the scale-up process used and the reproducibility of large scale Streamline-DEAE columns.

3.2.3.-Purification and identification of C-PC.

To obtain pure C-PC concentrates, the fractions recovered from the Streamline-DEAE column (PCs rich solution) were precipitated using ammonium sulphate, resuspended in starting buffer and dialyzed against the same buffer. Finally they were loaded in anion-exchange chromatography column pre-equilibrated with the starting buffer. To separate pure C-PC by anion-exchange chromatography, continuous and discontinuous ionic strength gradients were assayed, as well as pH gradients. The pH gradient protocol was not successful (data not shown) thus pure C-PC was recovered using ionic strength discontinuous gradient. For this the column was developed with 0.29 M sodium phosphate buffer pH 7.0 using a flow rate of 50 mL/h. The recovery of C-PC after DEAE-cellulose chromatography was 76%, expressed as the percentage of pure C-PC in the final concentrate versus the total C-PC loaded onto the ion-exchange matrix. The C-PC fractions, whose spectroscopic purity ratios (A_{615}/A_{280}) were higher than 4.0, were pooled, lyophilized and stored in the dark at -20 °C.

To analyze the evolution of purity during the overall process, samples obtained in each one of the stages (extraction, expanded bed chromatography and anion-exchange chromatography) were developed by SDS-PAGE electrophoresis (Fig. 15). Data shows that unwanted proteins were removed at each successive chromatographic step (lines 2 to 4). Bands located near 20100 Da in lines 2 and 3 should be assigned to the combination of C-PC and APC α - β -subunits (intense bands) and other bands (less intense) correspond to contaminant proteins.

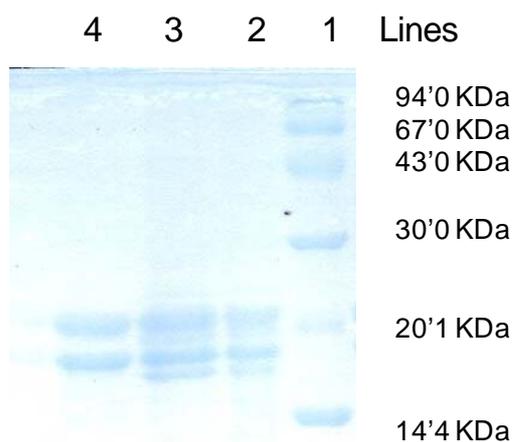


Fig 15.- Image of gel obtained from SDS-PAGE electrophoresis of samples corresponding to different process steps. Line 1 crude extract, Line 2 phycocyanins concentrate, Line 3 concentrate after EBAC, Line 4 pure C-PC fraction.

Absorption and fluorescence spectra from the pure C-PC solutions obtained are showed in Figure 16. A sharp increase in a single peak at 615 nm shows the absorbance maximum of C-PC, whereas a decrease in absorbance at 280 nm indicates the removal of other proteins. There was no absorbance peak or shoulder at 650 nm, indicating no presence of APC on the purified sample. Moreover, RP-HPLC was used to test purity of C-PC concentrates, and to obtain concentrates of α and β subunits of C-PC separately. Different gradients of acetonitrile and water were tested. The gradient described in section 2 was found to give the best baseline separation of C-PC subunits (Fig. 17). The alfa subunit which carries a single phycocyanobilin chromophore, elutes at 27.9 min and is followed by the beta subunit (31 min) which carries two phycocyanobilin chromophores.

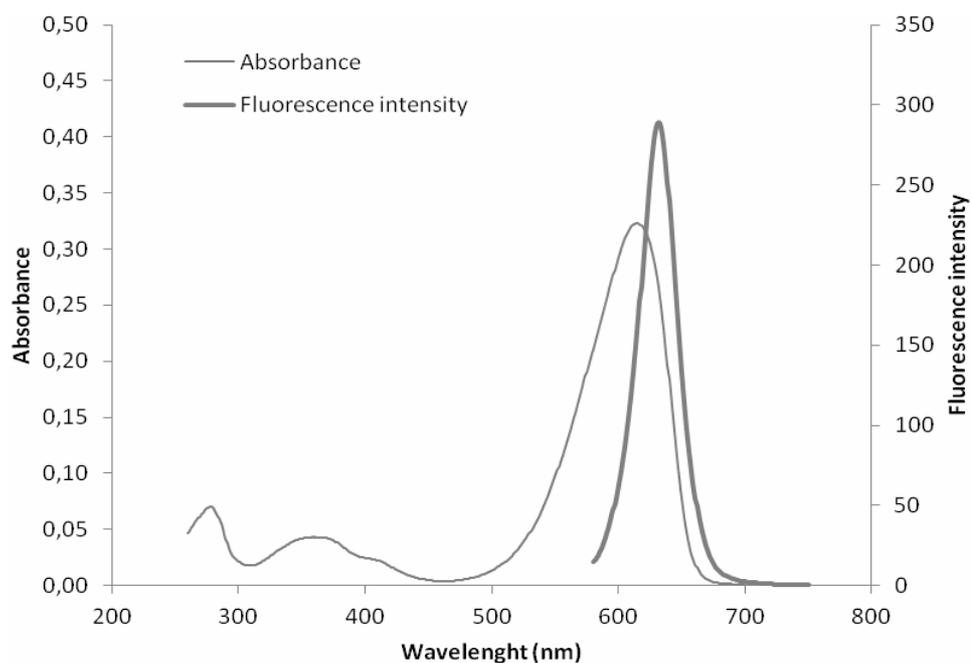


Fig 16.- Absorption and fluorescence spectra of C-PC pure concentrate obtained after the overall process.

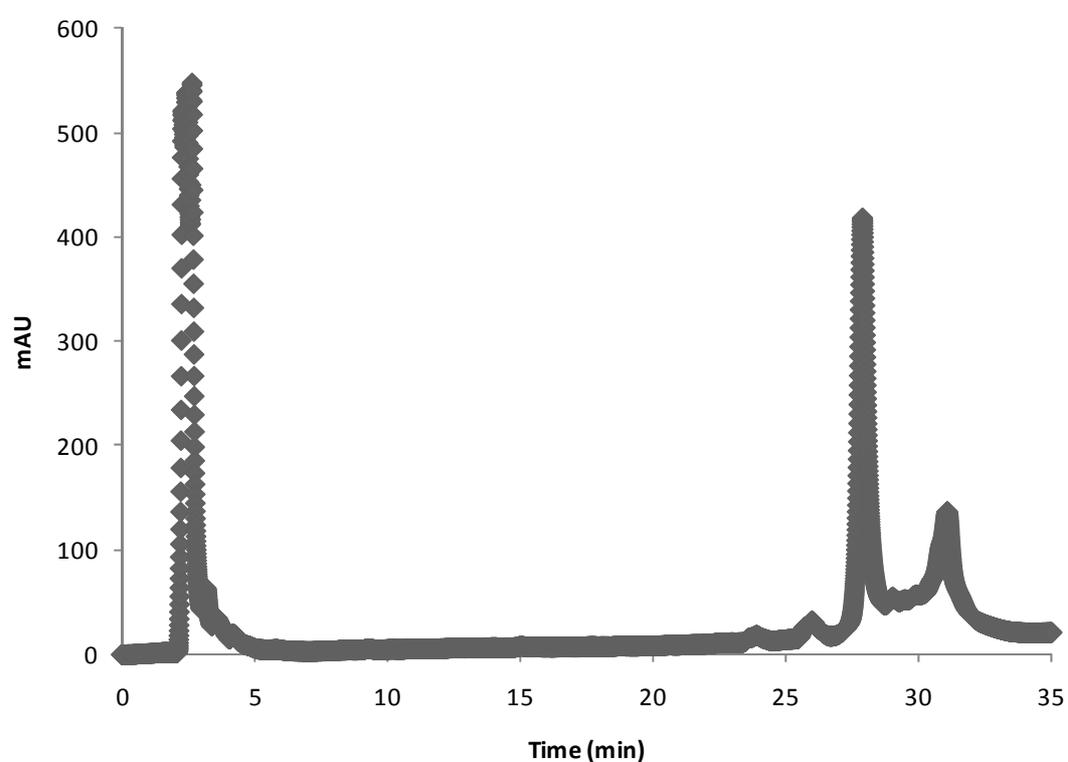


Fig 17.- HPLC separation of C-PC subunits using the gradient described in section 2. First peak correspond to injection whereas last peaks correspond to C-PC alfa and beta subunits. Signal absorbance (mAU) was monitored at 226 nm.

The C-PC concentrates obtained have a purity ratio $A_{615}/A_{280} \approx 2.61$, it do not accomplishing requirements of some applications. To achieve higher purity ratios it is necessary to perform a second chromatography step. Thus, in order to obtain pure C-PC the eluate obtained from EBAC was subjected to anion-exchange chromatography in packed bed mode to eliminate A-PC and other colorless proteins. It was demonstrated that this chromatography step must be performed using ionic strength discontinuous gradients. On this way C-PC concentrates of purity ratio higher than 4.0 are obtained. Purity of concentrates obtained in each one of steps was verified by SDS-PAGE electrophoresis. It was observed that many of the unwanted proteins from crude extract (line 2) were removed after EBA chromatography (line 3). Subsequently, after anion-exchange chromatography only two bands with similar intensities (line 4) corresponding to the α - and β -subunits of C-PC were detected. By comparing with the molecular markers, purified C-PC showed two bands corresponding to 17783 and 20100 Da respectively. These values agree with those reported earlier [22, 34, 35]. Regarding the absorption and fluorescence spectra of purified fractions, the absorption spectra of the trimeric and monomeric C-PC forms are only slightly affected by the aggregation changes in the protein. Thus, the absorption and fluorescence spectra from the dialyzed C-PC solutions in Fig. 16 agree with those published for pure C-PC [22, 34, 35], although it is not possible to recognize the aggregation state from these spectra. The easiest and most explanatory spectroscopic test to determine the aggregation state of biliproteins is to record the excitation fluorescent steady-state anisotropy spectrum (data not shown). Since energy transfer between chromophores modulates the fluorescent properties of these proteins, a dramatic increase in the anisotropy spectra has been observed when the aggregation state of the biliproteins changes from trimers to monomers [16, 24, 36], due to the chromophores uncoupling, which altered the pathways for energy transfer between them. The spectra shapes and the quantitative values of the C-PC are similar to those published earlier for trimeric C-PC from *S. platensis* [22, 36].

3.3.-Phycocyanins from *Spirulina platensis*.

In view of the increasing demands for relatively large amounts of phycobiliproteins, the aim of the presented study was to develop at pilot scale a process for the large-scale purification of C-PC from the microalga *Spirulina platensis* using EBAC. First, the extraction of the product from the biomass was optimized. Next, C-PC was separated by EBA

chromatography using Streamline-DEAE. The operation of expanded bed technology was optimized on a small scale, the chromatographic parameters of sample load, viscosity and expansion degree being studied. Next, the process was scaled up 100 times by increasing the column diameter, while parameters such as the settled bed height, linear flow-rate and protein load remained constant. Technology of EBA allows obtaining concentrates ready to be loaded into a conventional DEAE-cellulose column, where the product was purified by packed bed ion exchange chromatography. The purity of C-PC obtained was confirmed by SDS-PAGE electrophoresis and spectroscopic characterization. Using this methodology pure C-PC is obtained and the protein recovery is maximized.

3.3.1.-Extraction step.

To optimize the extraction step the influence of extractant phase and number of extraction steps was studied. Extraction experiments were carried out by repeated single contact using different water and buffer solutions to maximize yield. Results showed as maximum yield was obtained when low ionic strength buffer phosphate and water solutions were used (Table 7). Regarding the number of extractions, were necessary three extractions and no absorption being observed from phycocyanins in the supernatant from a fourth treatment of the sample. The extract thus obtained was centrifuged to produce the PCs crude extract which was utilized in EBAC. The absorption spectrum of this extract (Fig. 18) showed maxima absorption, corresponding to a mixture of phycocyanins (C-PC and APC). The absorbance at 280 nm was greater than at 615 nm, which indicated the presence of other contaminant proteins besides phycocyanins.

Table 7.-Influence of the extractant phase in the recovery of phycocyanins from *Spirulina platensis* biomass during the extraction step.

	First extraction PCs(mg)	Second extractio n PCs(mg)	Third extraction PCs (mg)	Total Biliprotein s (mg)	Total Biliprotein s (%)
Phosphate buffer 1.00M pH 7	43.44	51.48	18.59	113.51	2.27
Phosphate buffer 0.50M pH 7	70.06	30.12	15.61	115.80	2.32
Phosphate buffer 0.10M pH 7	48.53	13.30	41.56	103.38	2.07
Phosphate buffer 0.05M pH 7	54.84	23.42	42.53	120.80	2.42
Acetate buffer 1.00 pH 5	14.84	4.23	14.02	33.080	0.66
Distilled water	44.84	38.98	62.29	146.72	2.93

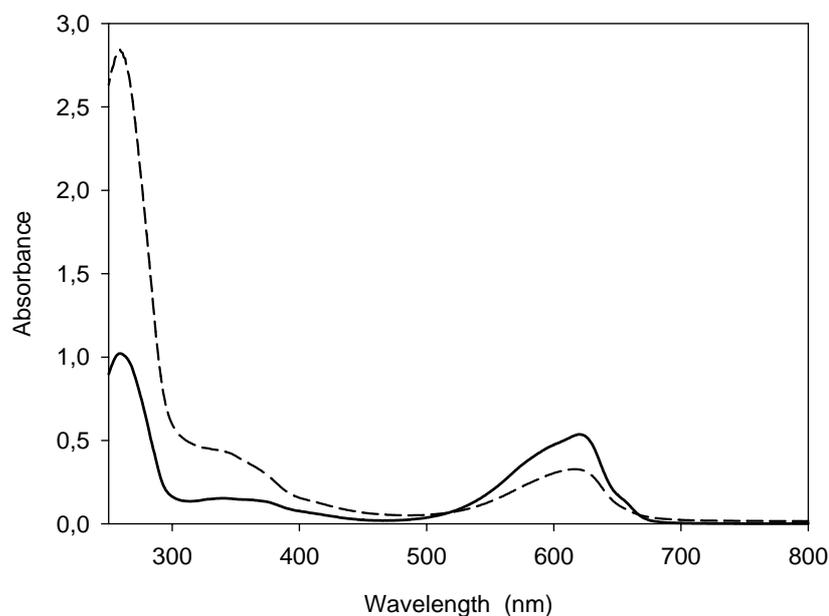


Fig 18.- Absorbance spectrum of crude extract before EBAC (—) and phycocyanins rich solution after EBAC (---).

Due to the high sensibility of phycobiliproteins, water solutions with low ionic strength and neutral pH are recommended as extractant phase. Although maximal percentage was obtained using distilled water (2.93 %), it is recommended to use phosphate buffer (0.05 M) pH 7.0 in order to stabilize the pH and according with the next EBAC step [22]. To enhance the yield of extraction a repeated single contact strategy is necessary. Results showed as, using 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 45% of total phycocyanins were extracted in the first extraction step whereas second extraction allows to obtain an additional 19%, thus a total mean recovery of 64% being obtained. An additional extraction will allow recovering an additional 36%. The extract thus obtained is rich in phycobiliproteins also containing other proteins and compounds, the purity ratio A_{615}/A_{280} being 0.19 (Fig. 18). It is widely known that the aggregation state of phycobiliproteins in solution is strongly affected by pH, ionic strength and protein concentration. The extraction method developed provides suitable conditions for maintenance of the C-PC conformation because at neutral pH, moderate ionic strength and moderated protein concentration, the highest possible aggregation state is the trimer where the conformation and spectral properties are well maintained. In addition, it should be emphasized that this extraction method is simpler than others that use ultrasounds, mechanical breakage or the addition of chemical compounds (lysozyme, rivanol, acetone, Triton X-100). The extraction method developed has been selected because of its simplicity and because it generates a solution in optimal conditions to be applied on EBAC.

3.3.2.-*EBA chromatography.*

To determine the equilibrium binding capacities the equilibrium adsorption isotherm of C-PC on the Streamline-DEAE matrix using phycocyanins crude extract was determined (Fig. 19). Data showed as the maximum C-PC equilibrium binding capacity was 1.6 mg/mL, it being calculated considering the linear form of the Langmuir's equation. In addition, the dynamic binding capacity was measured. For this the breakthrough curve for C-PC using Streamline-DEAE was determined in a 15 mm I.D. column (Fig. 20). The dynamic binding capacity of the bed was determined when the C-PC concentration in the column effluent reached 10% of the initial concentration ($C/C_0=0.1$) (Ec.4) in order to reduce the loss of the target product in flowthrough [22,41]. In these conditions the dynamic binding capacity determined was 0.91 mg C-PC/mL Streamline-DEAE adsorbent. This value was lower to the static value measured of 1.6 mg/mL.

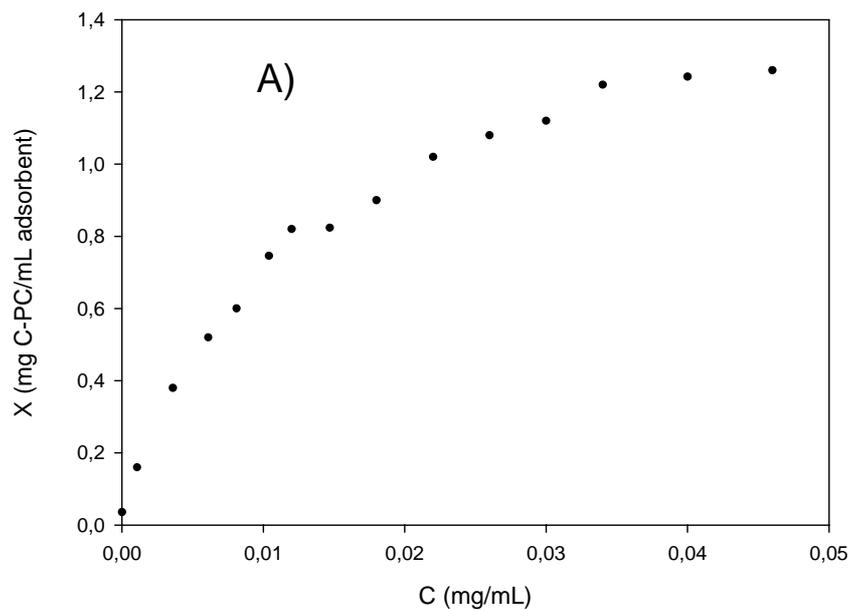


Fig 19- Equilibrium adsorption isotherm of C-PC from phycocyanins crude extract on Streamline-DEAE matrix.

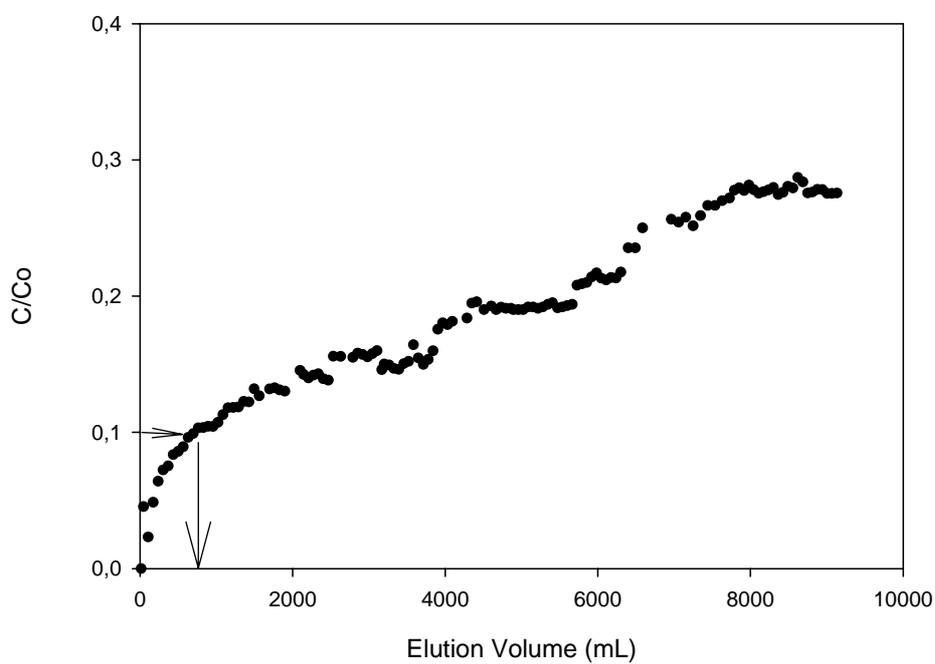


Fig 20.- Breakthrough curve for C-PC on Streamline-DEAE obtained at small scale (column I.D. 15 mm) using crude extract of phycobiliproteins.

Regarding the optimal conditions for expanded bed operation, the influence of the expansion degree of the bed and viscosity of the feedstock in the protein recovery were studied at small scale, using a 15 mm I.D. column. Results show that a maximum recovery was achieved when the expanded bed volume was twice the settled bed volume. In addition to expansion degree, the influence of the viscosity of the sample on the behaviour of the system was therefore analyzed. These experiments were conducted at the optimum expansion degree ($H/H_0 = 2$) and same sample load (0.91 mg C-PC/mL adsorbent), the viscosity of the feedstock being modified from 1.084 to 1.030 mP by dilution with buffer (Table 8). The results show that the yield of the process increased when the viscosity of sample decreased, the C-PC recovery increasing from 75 to 76.2% when the viscosity reduced from 1.084 to 1.030 mP, although the operation time increases from 13 to 49 min and volume of sample to be applied to the bed increase four folds.

Table 8.-Influence of viscosity of the sample in the recovery of C-PC and time necessary to perform the operation, using a column i.d.15 mm with Streamline-DEAE.

Viscosity (mP)	Volume (mL)	Recovery C-PC (%)	Time (min)
1.084	80	75.0	13
1.052	160	74.8	25
1.038	240	75.2	36
1.030	320	76.2	49

Once the optimal conditions for expanded bed adsorption have been determined, the next step is to recover the C-PC by elution from the bed. The adsorbed C-PC was eluted using 0.50 M sodium phosphate buffer pH 7.0 in packed bed mode. Operating in these conditions, particulate material was not observed in the eluted fractions, the absorbance of effluent from the column during EBA chromatography being showed in Fig. 21. The absorbance of the fractions obtained shows a sharp peak, indicating high elution efficiency. The UV-vis absorption spectrum of the obtained PCs rich solution showed a significant loss of absorption in the near-UV region with respect to the crude extract spectrum (Fig. 18). In addition, the purity ratio (A_{615}/A_{280}) was about 0.87.

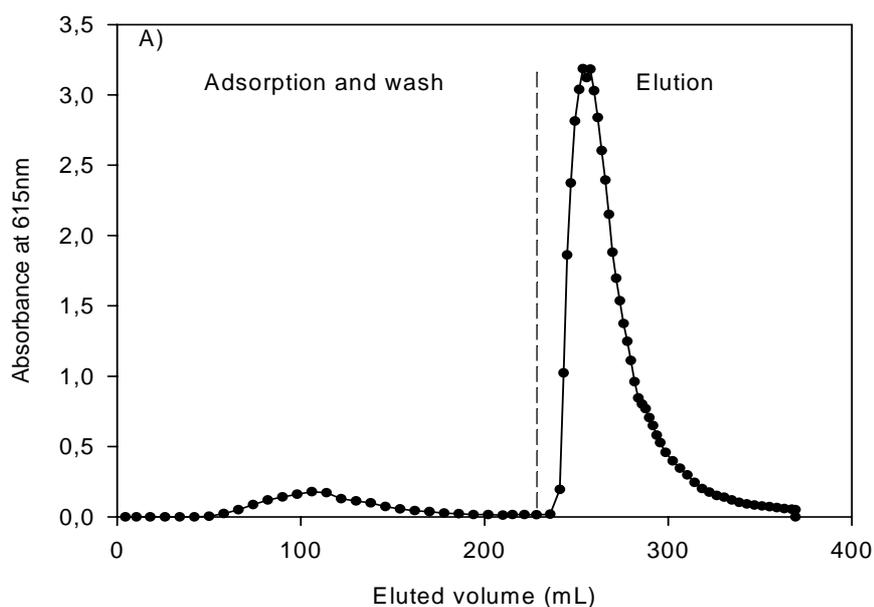


Fig 21.- Absorbance of effluent from column during EBA chromatography, column I.D. 15 mm. In the elution step, the absorbance was measured after suitable dilution. Thus, the absorbance elution values in ordinate axes are the resulting values after multiplication by the dilution factor.

To scale-up the operation of expanded bed adsorption chromatography it is necessary to maintain the form of the breakthrough curve constant, thus the length of the column and the feedstock flow rate must be kept constant on the larger scale. To verify it, experiments were performed using columns of 25 to 90 mm I.D. and finally 150 mm I.D. Whatever, the columns were filled with $H_0=15$ cm (with the exception of the 150 mm I.D. column, that was filled with $H_0=50$ cm), being operated at expansion degrees equal to 2.0. To achieve this expansion degree the volumetric feedstock flow rate was increased in proportion to the cross section of the column, thus the feedstock flow rate through the cross section of the column remaining constant. Data showed as the yield of C-PC was in the range of 75 to 79% (Table 9). Figure 22 shows the chromatographic profile obtained using the 90 mm I.D. column, which is analogous to the obtained using the 15 mm I.D. column (Fig. 21).

Table 9.- Recovery and purity of fractions obtained during the proposed process.

Purification step	C-PC recovery on step (%)	Purity ratio A_{615}/A_{280}
Extraction	100	0.19
EBA chromatography Streamline-DEAE	79	0.87
Packed bed chromatography cellulose DE-52	76	>4
Overall C-PC recovery	59	

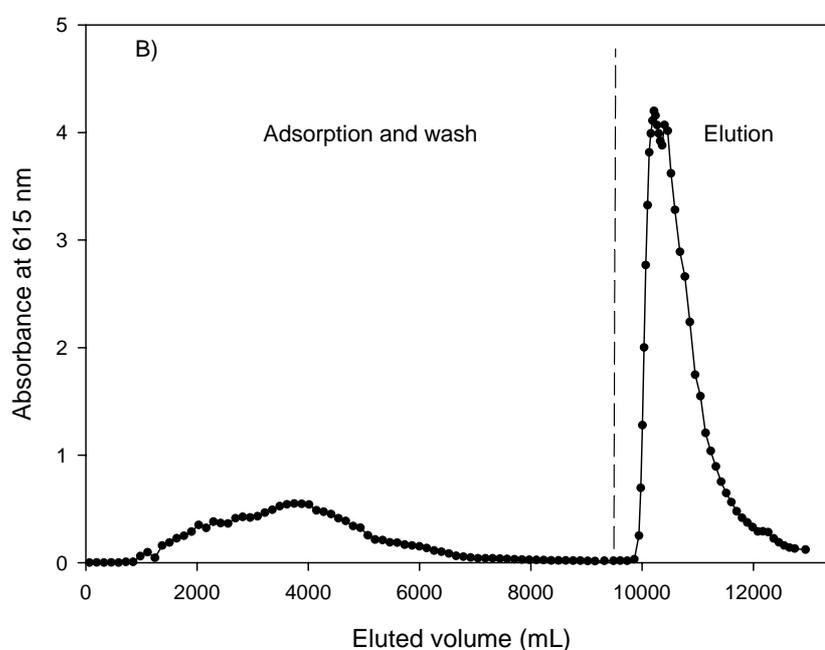


Fig 22.- Absorbance of effluent from column during EBA chromatography, column I.D. 90 mm. In the elution step, the absorbance was measured after suitable dilution. Thus, the absorbance elution values in ordinate axes are the resulting values after multiplication by the dilution factor.

In previous studies the maximum binding capacity determined using equilibrium adsorption isotherm, using pure C-PC from *Spirulina platensis*, was 11.7 C-PC/mL adsorbent [22]. In this study an equilibrium binding capacity of 1.6 mg/mL was obtained and for crude extract from another microalga like *Anabaena marina*, a value of 1.7 mg C-PC/ml adsorbent was found [39]. The results indicate that the crude extracts from *Spirulina* and *Anabaena* are very similar and these data demonstrate that the capacity of the adsorbent decreases

considerably in the presence of other proteins in the crude extract. Thus, the non-specific binding of negatively charged compounds in the feedstock interfere with the binding of C-PC to the adsorbent, and hence resulted in a lower capacity.

In order to obtain a major approximation to real behaviour of work in column, the dynamic binding capacity must be experimentally determined as the maximum loading volume of unclarified feedstock that can be applied to the column before achieving breakthrough of the target protein. In this sense, the dynamic binding capacity determined was 0.91 mg C-PC/mL Streamline-DEAE adsorbent. This value was lower to the static value measured of 1.6 mg/mL due to time for solid-liquid phase to reach equilibrium was insufficient. Thus, during operation the liquid velocity and the viscosity of the mobile phase influence the dynamic binding capacity. In addition, the dynamic capacity for C-PC using Streamline-DEAE is low due to the large size of these proteins, which limits the binding of most of the target protein onto surface the of the adsorbent. These values agree with others papers where adsorption capacity of the adsorbent is usually lower in the dynamic mode than in the static [39,40].

Once the dynamic capacity of the adsorbent is determined, the optimal conditions for expanded bed operation must be determined. The maximum recovery was achieved when the expanded bed volume was twice the settled bed volume (data not shown). At expansion degrees higher than 2 the recovery of C-PC decreases due to at liquid flow rates below the optimum, the expansion degree is low and the mass transfer resistance is high, thus the product recovery and the performance of the system are poor. Opposite, at liquid flow rates above optimum the degree of expansion is excessive and, although the mass transfer resistance diminishes, the distance between matrix particles increases, leading to a lower amount of protein adsorbed on the gel particles.

The physical properties of the feedstock can be unfavourable for effective processing in expanded beds. In this sense the sample viscosity could be a problem and the dilution of feedstock before application to the bed is a possible solution. Moreover, the consequent increase in the volume of liquid that needs to be applied to the bed may also reduce the efficiency of the expanded-bed step. Experiments performed showed as the yield increased when the viscosity of sample decreased, maximum recovery of C-PC of 76.2% being measured when the viscosity reduced to 1.030 mP. To reach this viscosity the sample must be

diluted with buffer thus the volume of sample increasing, time necessary to perform the operation also increasing. In this sense, a 1.2 % increase of yield does not justify it, concluding that dilution of the sample is not necessary.

To recover the C-PC from the bed it must be eluted adequately. Although the elution from Streamline-DEAE can be performed in expanded bed or packed bed mode, elution in packed bed mode was previously selected as optimal [39]. Performed experiments indicates high elution efficiency, a sharp peak on absorbance curve being measured (Fig. 21,22). The UV-vis absorption spectrum of the obtained PCs rich solution corresponds to a phycobiliproteins mixture where C-PC predominates with slight APC contamination (Fig. 18). In addition, the purity ratio (A_{615}/A_{280}) was about 0.87, which is four times higher than of the crude extract ($A_{615}/A_{280}=0.19$), although it does not still meet the purity standard of C-PC. It should be emphasized that it was prioritized to achieve a high rate of phycocyanin recovery than a highly pure solution, since the procedure is intended to replace low-resolution steps that normally result in phycobiliproteins losses.

Next, once the operation of expanded bed adsorption chromatography has been optimized at small scale, it was scaled-up. The criterion for scale-up of expanded bed adsorption columns is to maintain the form of the breakthrough curve constant. It is a function of the length of the column and the feedstock flow rate, thus both parameters must be kept constant on the larger scale. To verify it, experiments were performed using columns from 25 to 90 mm I.D. Results showed as the criterion for scale-up used was right, influence of diameter of the column in the yield of C-PC being not observed (Table 3). Moreover, the chromatographic profile of the eluates obtained from the different expanded bed runs performed using different columns were identical, with absorbance ratio values of $A_{615}/A_{280}\approx 0.87$. These results verify the consistency of the scale-up process used and the reproducibility of large scale Streamline-DEAE columns, allowing develop a final experiment through a pilot scale 150 mm I.D. column operated under similar conditions (Table 10). The EBAC process was then scaled up 100 times and the yield obtained was 79 %.

Table 10.- Summary of data from small to pilot scale recovery of C-PC by expanded bed adsorption chromatography on 15 cm (settled bed height) Streamline DEAE columns (15-150 mm I.D).

Column I.D. (mm)	C-PC loaded (mg)	Sample Volume (mL)	Elution peak (SBV)	Elution peak (mL)	Settled volume (mL)	Total time operation (min)	C-PC recovery (%)
15	24	80	9.6	254	27	86	75.5
25	67	222	11.2	826	74	99	74.2
40	172	568	12.5	2376	189	105	76.5
60	386	1275	10.5	4473	424	109	76.8
90	868	2894	11.2	11720	954	265	76.4
Pilot scale column							
150*	8036	26788	-	71150	8831*	592	79.0

*: Pilot scale column 150 mm x 1300 mm. $H_0 = 50$ cm.

3.3.3.-Purification and identification of C-PC.

To obtain pure C-PC, the fractions recovered from the Streamline-DEAE column (PCs rich solution) were utilized to develop a DEAE-cellulose column using packed bed chromatography like has been described previously [39].

To analyze the evolution of purity during the overall process, samples obtained in each one of the stages (extraction, expanded bed chromatography and anion-exchange chromatography) were developed by SDS-PAGE electrophoresis (Fig. 23). Data shows that unwanted proteins were removed at each successive chromatographic step (lines 1 to 3). Bands located near 20100 Da in lines 1 and 2 should be assigned to the combination of C-PC and APC α - β -subunits (intense bands) and other bands (less intense) correspond to contaminant proteins. Absorption and fluorescence spectra from the pure C-PC solutions obtained are showed in Fig. 24. A sharp increase in a single peak at 615 nm shows the absorbance maximum of C-PC, whereas a decrease in absorbance at 280 nm indicates the removal of other proteins. There was no absorbance peak or shoulder at 650 nm, indicating no presence of APC on the purified C-PC sample.

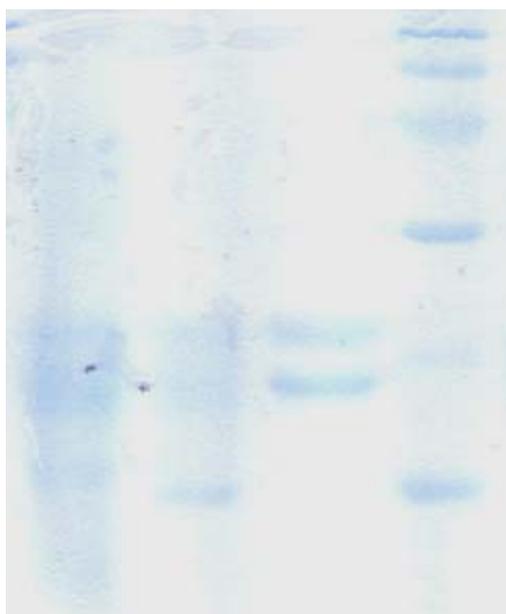


Fig 23.- SDS-PAGE electrophoresis of samples corresponding to different process steps. Line 1, phycocyanins crude extract; Line 2, phycocyanins rich solution after EBAC; Line 3, C-PC after packed bed chromatography; Line 4, molecular mass markers.

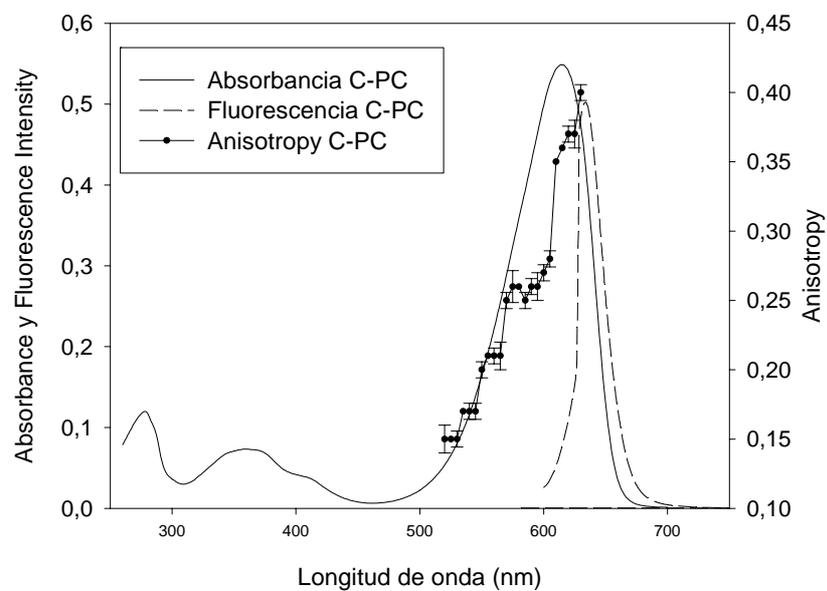


Fig 24.- Absorption and fluorescence spectra of C-PC pure concentrate obtained after the overall process.

The C-PC concentrates obtained have a purity ratio $A_{615}/A_{280} \approx 0.87$, it do not accomplishing requirements of some applications. To achieve higher purity ratios it is necessary to perform a second chromatography step. Thus, in order to obtain pure C-PC the eluate obtained from EBAC was subjected to anion-exchange chromatography in packed bed mode to eliminate A-PC and other colorless proteins. On this way C-PC concentrates of purity ratio higher than 4.0 are obtained. Purity of concentrates obtained in each one of steps was verified by SDS-PAGE electrophoresis. It was observed that many of the unwanted proteins from crude extract (line 1) were removed after EBA chromatography (line 2). Subsequently, after anion-exchange chromatography only two bands with similar intensities (line 3) corresponding to the α - and β -subunits of C-PC were detected. By comparing with the molecular markers, purified C-PC showed two bands corresponding to 17783 and 20893 Da respectively. These values agree with those reported earlier [22]. Regarding the absorption and fluorescence spectra of purified fractions, the absorption spectra of the trimeric and monomeric C-PC forms are only slightly affected by the aggregation changes in the protein. Thus, the absorption and fluorescence spectra from the dialyzed C-PC solutions in Fig. 24 agree with those published for pure C-PC [22,34,35], although it is not possible to recognize the aggregation state from these spectra. The easiest and most explanatory spectroscopic test to determine the aggregation state of biliproteins is to record the excitation fluorescent steady-state anisotropy spectrum (Fig. 24). The spectra shapes and the quantitative values of the C-PC are similar to those published earlier for trimeric C-PC from *S. platensis* [22].

5.-CONCLUSIONS.

In this work a scalable methodology for the efficient recovery and purification of C-PC from the blue-green alga *Anabaena marina*, *Synechocystis aquatilis* and *Spirulina platensis* are demonstrated. The proposed methodology involves an extraction step followed by expanded bed adsorption chromatography using Streamline-DEAE, complemented by conventional chromatography in DEAE-cellulose. The optimal extraction conditions were the use of sodium phosphate buffer 50 mM pH 7.0 in repeated single contact and the optimum number of contact steps was three. The optimal conditions of expanded bed adsorption chromatography were an expansion degree equal to two and the viscosity of crude extract was to be kept unmodified. Finally pure C-PC was recovered by conventional chromatography in DEAE-cellulose with ionic strength discontinuous gradient using 290 mM sodium phosphate buffer pH 7.0. Moreover the proposed method allows obtaining C-PC solutions in trimeric

aggregation state.

It is also demonstrated that expanded bed for C-PC purification can be adequately scaled up from small scale data. Results show that expanded bed chromatography is a scalable technology that allows large quantities of C-PC to be obtained minimizing the product losses. This technology allows maintaining a high protein recovery while reducing both processing costs and times when compared with conventional methodologies. Conventional schemes for phycobiliproteins purification uses multiple unit operations (precipitation, centrifugation, dialysis, ion-exchange chromatography, etc.), the unit production cost corresponding to fixed capital per year being higher than 70%. The use of expanded bed methodology greatly reduces the major equipment list as well as the man-power, also doubling the recovery yield. Thus, the join of both factors allows concluding that expanded bed methodology will greatly contribute to reduce the unit cost of producing C-PC, if adequate optimization and scale-up of the processes are achieved.

REFERENCES

- (1) Glazer AN. Phycobiliproteins. *Meth.Enzymol.* 1988;167:291-303.
- (2) Glazer AN. Phycobiliproteins - A Family of Valuable, Widely Used Fluorophores. *Scanning* 1997;19(3):154-155.
- (3) Arad S, Yaron A. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends in Food Science and Technology* 1992;3(C):92-97.
- (4) Ayyagari MS, Pande R, Kamtekar S, Gao H, Marx KA, Kumar J, et al. Molecular assembly of proteins and conjugated polymers: Toward development of biosensors. *Biotechnol.Bioeng.* 1995;45(2):116-121.
- (5) Bermejo R, Tobaruela DJ, Talavera EM, Orte A, Alvarez-Pez JM. Fluorescent behavior of B-phycoerythrin in microemulsions of aerosol OT/water/isooctane. *J.Colloid Interface Sci.* 2003;263(2):616-624.
- (6) Ramirez D, González A, Merino N, González R, Ancheta O, Romay C, et al. Effect of phycocyanin in zymosan-induced arthritis in mice - Phycocyanin as an antiarthritic compound. *Drug Dev.Res.* 1999;48(2):70-75.
- (7) Rimbau V, Camins A, Romay C, González R, Pallàs M. Protective effects of C-phycocyanin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus. *Neurosci.Lett.* 1999;276(2):75-78.
- (8) Benedetti S, Rinalducci S, Benvenuti F, Francogli S, Pagliarani S, Giorgi L, et al. Purification and characterization of phycocyanin from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2006;833(1):12-18.
- (9) Bhat VB, Madyastha KM. C-Phycocyanin: A potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2000;275(1):20-25.
- (10) Rimbau V, Camins A, Pubill D, Sureda FX, Romay C, González R, et al. C-phycocyanin protects cerebellar granule cells from low potassium/serum deprivation-induced apoptosis. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 2001;364(2):96-104.
- (11) Morcos NC, Berns M, Henry WL. Phycocyanin: Laser activation, cytotoxic effects, and uptake in human atherosclerotic plaque. *Lasers Surg.Med.* 1988;8(1):10-17.
- (12) Roy KR, Arunasree KM, Reddy NP, Dheeraj B, Reddy GV, Reddanna P. Alteration of mitochondrial membrane potential by *Spirulina platensis* C-phycocyanin induces apoptosis in the doxorubicin-resistant human hepatocellular-carcinoma cell line HepG2. *Biotechnol.Appl.Biochem.* 2007;47(3-4):159-167.

-
- (13) Subhashini J, Mahipal SVK, Reddy MC, Reddy MM, Rachamalla A, Reddanna P. Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Biochem.Pharmacol.* 2004;68(3):453-462.
- (14) Campanella L, Crescentini G, Avino P, Angiello L. Simple and rapid procedure for analyzing two phycocyanins (C-PC and APC) from *Spirulina platensis* algae using LPLC and HPLC methods. *Ann.Chim.* 2000;90(3-4):153-161.
- (15) Bermejo Román R, Álvarez-Pez JM, Acién Fernández FG, Molina Grima E. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *J.Biotechnol.* 2002;93(1):73-85.
- (16) Tchernov AA, Minkova KM, Houbavenska NB, Kovacheva NG. Purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. by aminohexyl-Sepharose chromatography. *J.Biotechnol.* 1999;69(1):69-73.
- (17) Herrera A, Boussiba S, Napoleone V, Hohlberg A. Recovery of c-phycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. *J.Appl.Phycol.* 1989;1(4):325-331.
- (18) Silveira ST, De Menezes Quines LK, Burkert CAV, Kalil SJ. Separation of phycocyanin from *Spirulina platensis* using ion exchange chromatography. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2008;31(5):477-482.
- (19) Narayan AV, Raghavarao KSMS. Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* employing aqueous two phase systems. *International Journal of Food Engineering* 2007;3(4).
- (20) Bermejo R, Acién FG, Ibáñez MJ, Fernández JM, Molina E, Alvarez-Pez JM. Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2003;790(1-2):317-325.
- (21) Clemmitt RH, Chase HA. Facilitated downstream processing of a histidine-tagged protein from unclarified *E. coli* homogenates using immobilized metal affinity expanded-bed adsorption. *Biotechnol.Bioeng.* 2000;67(2):206-216.
- (22) Bermejo R, Felipe MA, Talavera EM, Alvarez-Pez JM. Expanded bed adsorption chromatography for recovery of phycocyanins from the microalga *Spirulina platensis*. *Chromatographia* 2006;63(1-2):59-66.
- (23) NIU J-, WANG G-, Lin X-, Zhou B-. Large-scale recovery of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2007;850(1-2):267-276.

-
- (24) Bermejo Román R, Álvarez-Pez JM, Acien Fernández FG, Molina Grima E. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology* 2002;93(1):73-85.
- (25) Güzeltunc, E, O. Ulgen K. Recovery of actinorhodin from fermentation broth. *Journal of Chromatography A* 2001;914(1-2):67-76.
- (26) Lan JC-, Hamilton GE, Lyddiatt A. Physical and biochemical characterization of a simple intermediate between fluidized and expanded bed contactors. *Bioseparation* 1999;8(1-5):43-51.
- (27) Özyurt S, Kirdar B, Ulgen KO. Recovery of antithrombin III from milk by expanded bed chromatography. *Journal of Chromatography A* 2002;944(1-2):203-210.
- (28) Clemmitt RH, Chase HA. Facilitated downstream processing of a histidine-tagged protein from unclarified *E. coli* homogenates using immobilized metal affinity expanded-bed adsorption. *Biotechnol. Bioeng.* 2000;67(2):206-216.
- (29) Ng MYT, Tan WS, Abdullah N, Ling TC, Tey BT. Direct purification of recombinant hepatitis B core antigen from two different pre-conditioned unclarified *Escherichia coli* feedstocks via expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography A* 2007;1172(1):47-56.
- (30) Barnfield Frej AK, Hjorth R, Hammarstrom A. Pilot scale recovery of recombinant annexin V from unclarified *Escherichia coli* homogenate using expanded bed adsorption. *Biotechnol. Bioeng.* 1994;44(8):922-929.
- (31) Chase HA, Draeger NM. Expanded-bed adsorption of proteins using ion-exchangers. *Sep. Sci. Technol.* 1992;27(14):2021-2039.
- (32) Chase HA. Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. *Trends Biotechnol.* 1994;12(8):296-303.
- (33) Bermejo R, Ruiz E, Acien FG. Recovery of B-phycoerythrin using expanded bed adsorption chromatography: Scale-up of the process. *Enzyme Microb. Technol.* 2007;40(4):927-933.
- (34) Duerring M, Schmidt GB, Huber R. Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of constitutive C-phycoerythrin from the chromatically adapting cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* at 1.66 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1991;217(3):577-592.
- (35) Santiago-Santos MC, Ponce-Noyola T, Olvera-Ramírez R, Ortega-López J, Cañizares-Villanueva RO. Extraction and purification of phycoerythrin from *Calothrix* sp. *Process*

Biochemistry 2004;39(12):2047-2052.

- (36) Bermejo R, Talavera EM, Alvarez-Pez JM, Orte JC. Chromatographic purification of biliproteins from *Spirulina platensis*. High-performance liquid chromatographic separation of their α and β subunits. *Journal of Chromatography A* 1997;778(1-2):441-450.
- (37) Mimuro M, Rübels R, Füglistaller P, Zuber H. The microenvironment around the chromophores and its changes due to the association states in C-phycoerythrin isolated from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *BBA - Bioenergetics* 1986;851(3):447-456.
- (38) Bermejo R, Talavera EM, DelValle C, Alvarez-Pez JM. C-phycoerythrin incorporated into reverse micelles: A fluorescence study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2000;18(1):51-59.
- (39) Ramos A, Acien FG, Fernández-Sevilla J.M., González C.V., Bermejo R. Large-scale isolation and purification of C-phycoerythrin from the cyanobacteria *Anabaena marina* using expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2010;85(6):783-792.
- (40) Rosano R, Ungaro N, D'Ambrosio A, Liuzzi G.M., Riccio P. Extracting and purifying R- phycoerythrin from Mediterranean red algae *Corallina elongata*. *Journal of Biotechnology* 2003;101:289-293.
- (41) Shepard S.R, Boyd G.A., Schrimsher J.L. Routine manufacture of recombinant proteins using expanded bed adsorption chromatography. *Bioseparation* 2001;10:51-56.

PUBLICACIONES

Large-scale isolation and purification of C-phycocyanin from the cyanobacteria *Anabaena marina* using expanded bed adsorption chromatography

Amparo Ramos,^a F.Gabriel Acién,^b José M. Fernández-Sevilla,^b Cynthia V. González^b and Ruperto Bermejo^{a*}

Abstract

BACKGROUND: Phycobiliproteins are water soluble proteins useful as fluorescent markers of cells and macromolecules, and as natural colorants, and are anticarcinogenic. Although phycobiliproteins have many applications, their use is limited by the high cost of the purified macromolecules, mainly related with the cost of extraction and purification. In this study a fast and scalable method for preparative extraction and purification of C-phycocyanin (C-PC) from *Anabaena marina* is developed.

RESULTS: The method developed consists in the extraction of phycobiliproteins using repeated single contact strategy, separation being performed by expanded bed adsorption (EBA) chromatography using Streamline-DEAE. Optimal conditions for EBA were obtained at small scale, using a 15 mm internal diameter column, these being a sample load of 0.9 mg C-PC mL⁻¹ adsorbent, an expanded bed volume twice the settled bed volume and a sample viscosity of 1.109 mP. The process was then scaled up 36 times, the success of the scale-up process being verified. Finally, to obtain pure C-PC conventional ion-exchange chromatography was utilized.

CONCLUSION: Small diameter columns was shown to be useful to simulate the behavior of larger diameter columns for use in scaled up systems. Expanded bed adsorption was demonstrated to be a scalable technology allowing large quantities of C-PC to be obtained, maintaining high protein recovery while reducing both processing cost and time. The proposed methodology allows recovery of more than 62% of the C-PC contained in the biomass in the form of pure C-PC concentrates.

© 2010 Society of Chemical Industry

Keywords: expanded bed adsorption chromatography; *Anabaena marina*; phycobiliproteins; C-phycocyanin; preparative protein purification; anion-exchange chromatography

INTRODUCTION

Phycobiliproteins are water soluble proteins that form light-harvesting antenna complexes (phycobilisomes) and act as photosynthetic accessory pigments in cyanobacteria and red algae. These proteins absorb visible light from 450 to 650 nm and are divided into three main classes based on their absorption spectra: phycoerythrins (PEs, $\lambda_{\max} \sim 540\text{--}570$ nm), phycocyanins (PCs, $\lambda_{\max} \sim 610\text{--}620$ nm) and allophycocyanins (APC, $\lambda_{\max} \sim 650\text{--}655$ nm).¹ The main applications of phycobiliproteins are as fluorescent markers of cells and macromolecules in biomedical research, diagnostics, therapeutics and highly sensitive fluorescence techniques.² In addition, they have potential as natural colorants for use in food, cosmetics and pharmaceuticals, particularly as substitutes for synthetic dyes, which are generally toxic or otherwise unsafe.^{3–5} C-phycocyanin (C-PC) is of great interest because of its therapeutic value due to the protective effect and anticarcinogenic activity.^{6,7} C-PC is a blue pigment with strong antioxidative and anti-inflammatory activities.^{8,9} C-PC has been used for the treatment of Alzheimer's disease and Parkinson's disease,¹⁰ and the prevention of experimental oral

and skin cancers.¹¹ Recently, this protein was reported to induce apoptosis in some carcinoma cells¹² and human chronic myeloid leukemia cells.¹³ Preliminary X-ray diffraction studies of C-PC from *S. platensis*, *F. diplosiphon* and *A. quadruplicatum* determined the protein dimensions in different aggregation states, indicating an equivalent radius for the trimeric state of C-PC of 43.2 Å.^{14,15}

Although phycobiliproteins have many applications, their use is limited by the high cost of the purified macromolecules, mainly related with the cost of extraction and purification. To solve this problem it is necessary to adopt new methodologies that allow recovery of phycobiliproteins in large amounts

* Correspondence to: Ruperto Bermejo, Department of Physical and Analytical Chemistry, E.P.S. of Linares, Jaén University 23700 Linares (Jaén) Spain. E-mail: rbermejo@ujaen.es

^a Department of Physical and Analytical Chemistry, Jaén University, E.P.S. of Linares, 23700 Linares. Spain

^b Department of Chemical Engineering, Almería University, 04071 Almería. Spain

at low cost. The conventional schemes for phycobiliproteins purification propose a sequence of unit operations which recover the product after a combination of different and complex methods, such as precipitation, centrifugation, dialysis, ion-exchange chromatography, gel filtration and chromatography on hydroxyapatite. In general, conventional methodologies involve two processes: (i) sample pretreatment in order to liberate the intracellular material, obtaining a crude extract; and (ii) purification of phycobiliproteins using conventional chromatography. Sample pretreatment consists of disintegration of the cell wall, for which different methods have been used: ultrasound, lysozyme, mechanical breakage, treatment with rivanol, treatment with Triton X-100 and mechanical homogenization, ultrasound and extraction with acetone.^{16–18} After cell-wall disintegration the phycobiliproteins are precipitated using ammonium sulfate. Centrifugation and dialysis of the samples is usually then necessary to obtain a crude extract. The second step involves one or more chromatographic processes. For C-PC purification, several chromatographic methods are described in the literature, and these involve adsorption, hydrophobic interaction, gel filtration or ion exchange chromatography.^{19,20} A major drawback of these conventional protocols is the large number of steps involved, producing a significant decrease in the product yield. Furthermore, the scale-up of these methods is difficult and expensive. Hence, there is a need for efficient and economical large-scale bioseparation methods, which will achieve high purity as well as high yield, while maintaining the biological activity of the molecules.

In recent years, different alternatives to the conventional methodologies have been developed, such as aqueous two phase extraction,²¹ and expanded bed adsorption chromatography (EBAC).²² EBAC is an alternative bioseparation technique that greatly reduces the number of purification operations for protein adsorption to gel media, capturing proteins from particle-containing feedstock. The use of this technique not only simplifies the clarification step, but also produces concentrated and partially pure product ready for the next purification step, usually chromatography on a packed bed in a single operation.^{23,24} The use of expanded beds simplifies the downstream-processing flow sheets for the recovery of a wide variety of phycobiliproteins, with concomitant savings in equipment and operating costs.^{25,26} Utilization of an expanded bed for the purification of phycobiliproteins, instead of conventional methodologies, has been demonstrated to reduce the time taken from more than 8 h to less than 40 min, and to improve the yield from 32% to 66%.²⁷

In the present work, an expanded bed methodology for large-scale recovery of C-PC from the microalga *Anabaena marina* was developed. First, the extraction of the product from the raw material was optimized. Second, the separation of C-PC from the crude extract was studied at small scale using EBAC and the chromatographic parameters of viscosity and expansion degree were optimized. Next, the EBAC process was scaled up 36 times by increasing the column diameter, the scale-up criteria being verified. Finally, the concentrate obtained from EBAC was loaded into a conventional DEAE-cellulose column where the product was purified by packed bed ion exchange chromatography. Purity of the C-PC obtained was confirmed by SDS-PAGE electrophoresis and spectroscopic characterization. Results show that EBAC is a scalable technology that allows one to obtain large quantities of C-PC without product loss, while maintaining high protein recovery while reducing both processing cost and time compared to previous methodologies.

MATERIALS AND METHODS

Microalgal biomass

The blue-green microalga *Anabaena marina* ATCC 33 047 was used as raw material. The biomass was obtained from continuous cultures carried out outdoors in a flat panel photobioreactor. The photobioreactor was 2.6 m wide, 1.6 m high and 0.07 m thick. It was operated at a dilution rate of 0.3 day⁻¹ outdoors in Almeria, Spain, during spring. Arnon medium was used for culture growth. The photobioreactor was aerated at 0.05 v/v min⁻¹ and pH was controlled at 8.0 by on-demand injection of CO₂. Temperature of the culture was controlled at 20–30 °C by passing thermostated water through a heat exchanger located inside the photobioreactor. Biomass was directly collected from the harvest by centrifugation and stabilized by freeze drying. Dry biomass was then stored at 4 °C until processing.

Chemicals

Streamline-diethylaminoethyl (DEAE) anion-exchanger and materials used for sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) were obtained from Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). Preswollen microgranular DEAE-cellulose DE-52 was obtained from Whatman (Maidstone, UK). Molecular mass standards, dialysis tubing and tubing closures, ammonium sulfate, sodium azide and all other chemicals were from Sigma Diagnostics (St Louis, MO, USA) and used without further purification.

Extraction and measurement of phycobiliproteins

For extraction of phycobiliproteins, water and buffer solutions were used, all with 0.01% sodium azide added. For all experiments, 2 g of biomass powder was mixed with 40 mL of liquid and the slurry was agitated for 30 min at constant speed by a Heidolph RZR1 variable-speed magnetic stirrer (Schwabach, Germany). The resulting slurry was transferred to centrifuge tubes and centrifuged at 12 000 rpm for 15 min in a Meditronic BL-S Selecta centrifuge to remove major particles and cell debris that collapsed chromatographic operations. The blue supernatant (crude extract) was collected, measured and the quantities of biliproteins (C-PC and APC) determined according to Equations (1) and (2).²⁸ Absorbance measurements and absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer (Beaconsfield, UK) Lambda-20 UV-Vis spectrophotometer with a 1 cm light path.

$$C - PC(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) = \frac{A_{615 \text{ nm}} - A_{730 \text{ nm}} - 0.47 \cdot (A_{625 \text{ nm}} - A_{730 \text{ nm}})}{5.34} \quad (1)$$

$$APC(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) = \frac{A_{652 \text{ nm}} - A_{730 \text{ nm}} - 0.2087 \cdot (A_{615 \text{ nm}} - A_{730 \text{ nm}})}{5.09} \quad (2)$$

To determine the influence of number of extractions in the recovery of phycobiliproteins the same procedure was repeated by adding another 40 mL of liquid over the pellets obtained after centrifugation, agitating, centrifuging and measuring again, the phycobiliproteins content in the supernatant using the same procedure. To obtain large volumes of crude extract for the purification steps, the process was repeated using the optimal extraction medium (50 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer pH 7.0). All the supernatants from centrifugation were pooled obtaining a PCs crude extract that was stored at 4 °C and utilized for EBAC experiments. The complete purification procedure is shown in Fig. 1.

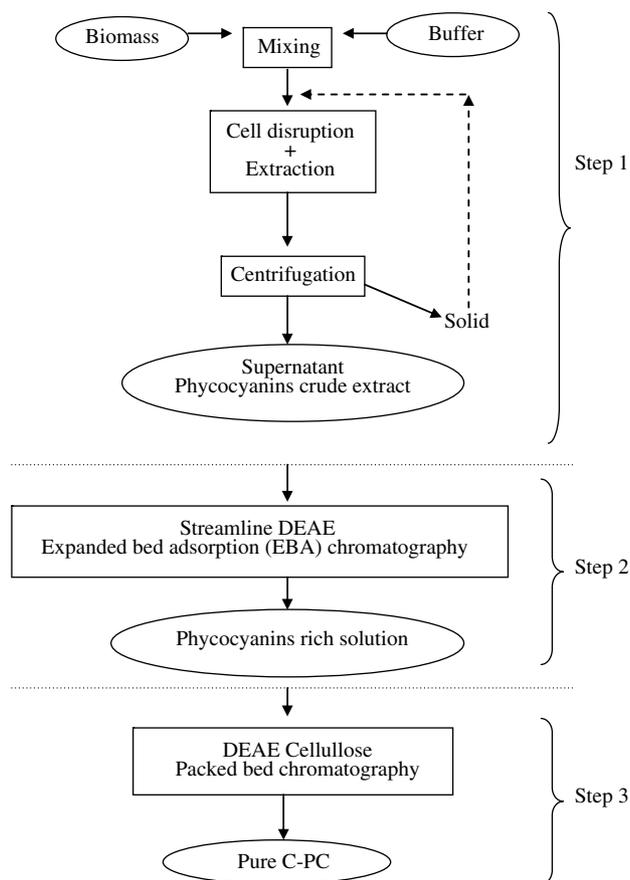


Figure 1. Schematic diagram of the C-PC purification process.

Expanded bed chromatography

Equilibrium adsorption isotherm and dynamic binding capacity

The adsorption isotherm was obtained by shake flasks experiments. The adsorption parameters on the Streamline-DEAE chromatographic matrix were determined using phycocyanin crude extract. For this, 15 mL sealed shake tubes containing dilutions of the crude extract were used. The tubes were placed in a shaking water bath at 26 °C and 2 mL of Streamline-DEAE was added to each tube. After 24 h of equilibration time the content of the tubes was analyzed. The equilibrium concentration of C-PC in the bulk liquid phase was determined spectroscopically and the C-PC bound per mL of the ion-exchanger adsorbent at equilibrium was calculated by a mass balance. The maximum binding capacity was calculated using the linear form of the Langmuir's equation, where Q and C are the adsorbed and aqueous protein concentration in equilibrium, respectively:

$$Q = \frac{Q_{\max} \cdot C}{K_e + C} \quad (3)$$

The dynamic binding capacity of the adsorbent was determined from the breakthrough profile using the 15 mm internal diameter column with a settled height of 15 cm. For this purpose a crude extract solution of C-PC (0.033 mg mL⁻¹) in 50 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer, pH 7.0 (starting buffer) was used. Initially, starting buffer was pumped upwards through the bed at increasing flow rate until the bed stopped expanding. After this, the C-PC crude extract solution was applied to the expanded bed and the breakthrough curve was calculated as the amount of applied

C-PC per mL adsorbent at different C/C_0 , where C_0 corresponds to the C-PC concentration in the crude extract and C the C-PC concentration in the flowthrough. Loading was terminated when C/C_0 rose to 0.4 approximately. The dynamic binding capacity (X_m) (mg of protein per ml of settled adsorbent) can be calculated according to (4), where V_b is the volume at 10% breakthrough (mL), C_0 is the initial concentration or the unclarified feedstock (mg mL⁻¹) and V_s is the settled volume of the adsorbent (mL):²⁹

$$x_m = \frac{C_0 \cdot V_b}{V_s} \quad (4)$$

Expanded bed operation

For expanded bed operation the columns were filled with the necessary volume of adsorbent to a constant settled height of 15 cm (H_0). Distilled water was then pumped upwards through the bed until it stopped expanding. A Heidolph PD-5001 peristaltic pump (Schwabach, Germany) was used to regulate the flow-rate. When the bed was stable (after approximately 20–30 min) the column was equilibrated with a suitable volume of starting buffer. Next, a solution from the extraction step (PCs crude extract) was used as sample for EBA experiments. The PCs crude extract was applied, and the expanded bed runs were conducted at a constant bed height, maintaining it at the initial degree of expansion by altering the flows accordingly during the run. The PCs crude extract was constantly stirred during application to avoid settling. The upper adaptor of the column can be set 5 cm above the height to which the bed expands. The phycobiliproteins in the extract were captured by the adsorbent, while the cell debris, particles and most contaminant proteins were eluted by the upward flow. After application of the total sample volume, the columns were washed with the starting buffer until the absorbance at 615 nm in the effluent returned to the base line.

After washing in the expanded bed mode, the upward flow was stopped and the bed was allowed to settle in the column. The adaptor was then moved down to the settled bed surface and the phycobiliproteins were recovered using an isocratic elution of 500 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer, pH 7.0 (PCs-rich solution). Fractions of 5–30 mL were collected during elution using a Redifrac fraction collector from GE Healthcare. Phycobiliproteins concentration was determined at 615 nm and the fractions with a blue color were pooled. Subsequently, cleaning-in-place procedure was carried out, the column being washed with three settled bed volumes of 0.5 mol L⁻¹ NaOH-1 mol L⁻¹ NaCl solution, three settled bed volumes of distilled water, three settled bed volumes of 25% (v/v) acetic acid, and three settled bed volumes of distilled water. The column was prepared for a new experiment after equilibration with five settled bed volumes of starting buffer.

Small-scale optimization

To optimize the expanded bed methodology on a small scale (15 mm i.d. column) the influence of the degree of expansion and viscosity of the sample in the yield of the process were studied. The degree of expansion was measured as H/H_0 , where H is the expanded bed height and H_0 is the settled bed height. Different degrees of bed expansion were assayed from 1.6 to 2.8, by pumping buffer and sample up into the Streamline-DEAE column at different flow rates, from 7.8 to 16.1 mL min⁻¹ (185 to 550 cm h⁻¹) In these experiments, a sample volume of 72 mL (0.33 mg C-PC/mL crude extract) and a protein/adsorbent ratio of 0.9 mg C-PC mL⁻¹ adsorbent were used. Regarding the viscosity, different sample viscosities were assayed. Samples were prepared

by C-PC crude extract (0.332 mg C-PC mL⁻¹) dilution with a suitable volume of buffer. Viscosity was measured in 100 mL samples using a Series 75 Cannon–Fenske Proton viscosimeter (Cannon Instrument Company, 2139 High Tech Rd., State College, PA 16803) calibrated against distilled water at 25 °C.

Production of high purity C-phycoyanin

The PCs-rich solution from EBAC step was used to obtain pure C-PC by anion exchange chromatography. The PCs rich solution from EBAC was dialyzed against a suitable volume of 50 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer, pH 7.0. The dialyzed solution (0.33 mg C-PC mL⁻¹) was applied to a column (2.5 × 20 cm) loaded with DEAE-cellulose DE-52 and pre-equilibrated with starting buffer. After washing with one bed volume of this buffer, the column was developed with 290 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer, pH 7.0. C-PC was eluted from the column loaded with PCs-rich solution and the fractions with an intense blue colour were pooled using a flow rate of 50 mL h⁻¹. Next, the column was cleaned and prepared for a new experiment, being washed with one bed volume of 500 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer pH 7.0 and equilibrated with starting buffer. C-PC blue tubes were pooled, brought to 70% of saturation with (NH₄)₂SO₄ and left to stand overnight in the dark at 4 °C before centrifugation. The pellets of purified biliproteins were resuspended in small volumes of 5 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer, dialyzed overnight at 4 °C against the same buffer and freeze-dried for later use.

Identification of purified C-phycoyanin

The content and purity of C-PC purified by anion-exchange chromatography was determined by UV-vis absorption spectroscopy, steady-state fluorescence and electrophoresis. Absorbance measurements and absorption spectra were recorded on a Perkin–Elmer (Beaconsfield, UK) Lambda-20 UV-Vis spectrophotometer with a 1 cm light path. Fluorescence emission spectra were recorded on a Jasco FP-6500 spectrofluorometer (Kyoto, Japan). Protein concentrations were chosen so that re-absorption of the emission was negligible. All spectra were recorded at room temperature. The amount of phycobiliproteins was calculated using Equations (1) and (2).

Electrophoresis was carried out in a Bio-Rad Miniprotein III vertical slab gel apparatus (Milan, Italy) using Laemmli-buffer system consisting of a 12.5% (w/v) polyacrylamide slab gel, 0.75 mm thick, containing 0.1% (w/v) SDS with a stacking gel of 4% polyacrylamide. Samples were preincubated with 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 4.5% (v/v) β-mercaptoethanol, 0.025% (w/v) bromophenol blue, and 60 mmol L⁻¹ Tris-HCl buffer, pH 6.8, for 5 min at 95 °C. Gels were run at room temperature and visualized by staining with 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 40% methanol (v/v) with 7% (v/v) acetic acid for 30 min, and destained in dilute acetic acid. The following proteins were used as molecular mass markers (in kDa): phosphorylase b (94.0), albumin (67.0), ovalbumin (43.0), carbonic anhydrase (30.0), trypsin inhibitor (20.0) and α-lactalbumin (14.4).

RESULTS AND DISCUSSION

Extraction

Optimization of the extraction method is a key step for maximum recovery of any product. The extraction method must be selected considering the nature of the product and raw material

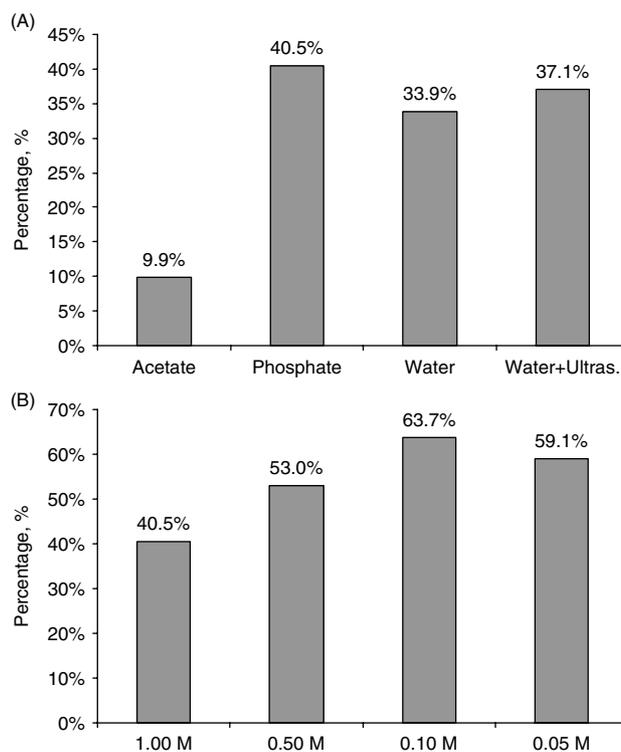


Figure 2. Influence of cell disruption methods on the recovery percentage of phycobiliproteins from *A. marina* biomass: (A) acetate 1000 mmol L⁻¹, phosphate 1000 mmol L⁻¹, water and water+ultrasound; (B) different ionic strength of phosphate buffer.

but also the next steps downstream, in this case EBAC. Due to the high sensibility of phycobiliproteins to pH and ionic strength changes,²⁵ water solutions with low ionic strength and neutral pH were selected as extraction phase. For the sake of simplicity and easy execution, a repeated single contact strategy was selected as contact method. The contact is carried out with only a smooth stirring due to the soft nature of raw material.

In this sense, previous test of EBAC performed using Streamline-DEAE showed that in crude extracts from blue-green algae the major fraction of contaminant proteins elutes when a 50 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer pH 7.0 was pumped through the column, whereas phycocyanins eluted when 500 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer pH 7.0 was circulated.²⁵ From these data it can be estimated that the optimal conditions for extraction would be those necessary to develop the EBAC step, although it must be verified. To optimize the extraction step two variables were studied: (i) the composition of extraction media and (ii) its ionic strength. Results showed as the composition of extraction phase was the main variable determining the yield of process, the use of sodium phosphate buffer pH 7.0 allowed the highest value of 40.5% (Fig. 2(A)). The utilization of water can also be considered although ultrasound does not enhance greatly the extraction yield. The use of acetate buffer pH 5.0 showed the lowest extraction yield, only of 9.9%. Regarding the ionic strength of the sodium phosphate buffer, results showed as this variable influenced the recovery of phycobiliproteins, this increasing when the ionic strength decreases except at the lowest ionic strength tested (Fig. 2(B)). The highest extraction yield in only one step was 63.7%, it being obtained by osmotic shock using 0.1 mol L⁻¹ sodium

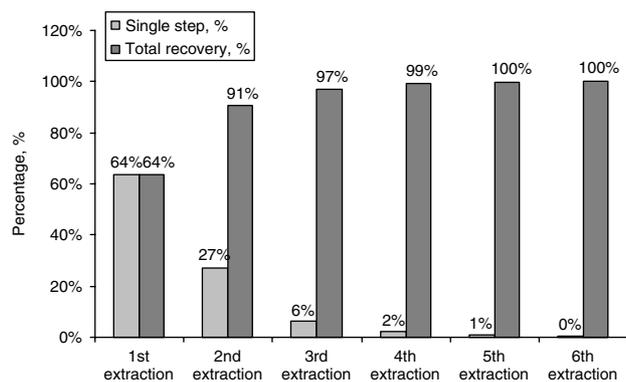


Figure 3. Influence of the repeated extraction strategy for cell disruption to maximize phycobiliproteins recovery.

phosphate buffer pH 7.0. However, according with the next step (EBAC) the most appropriate ionic strength is 50 mmol L⁻¹.²⁵ If 0.05 mol L⁻¹ sodium phosphate buffer pH 7.0 is used for extraction the recovery yield only decreases a 4.6%, to 59.1%, this result being similar to the highest recovery yield obtained with 0.1 mol L⁻¹ ionic strength. For this reason the 50 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer pH 7.0 was finally selected as optimal. This value can be increased by repeating the extraction procedure. Applying the repeated single contact strategy selected it was observed that the extraction yield can be increased up to 97% in only three steps (Fig. 3). The extraction must be repeated five times for a exhaustive recovery of the phycocyanins from the biomass, since no absorption was observed from phycocyanins in the supernatant from a sixth treatment of the sample.

The extract thus obtained was centrifuged to produce the supernatant (PCs crude extract) utilized in EBA chromatography. The feedstocks from which proteins are prepared are generally complex, containing dissolved solids, suspended solids and cells. The release of the protein of interest by the cell disruption methods yields cell debris of different sizes in addition to intact cells. The first step in a purification protocol is the clarification using microfiltration or centrifugation and after this EBA is possible to use.²⁴ Microalgae contain a specially complex mixture which often blocks conventional chromatographic columns, thus making difficult large-scale isolation and purification of biliproteins using conventional methods (packed-bed).²⁶ The absorption spectrum of this extract (Fig. 4(A)) showed maxima absorption corresponding to a mixture of phycocyanins (C-PC and APC). The absorbance at 280 nm was greater than at 615 nm, which indicated the presence of other contaminant proteins besides C-PC. It is widely known that the aggregation state of phycobiliproteins in solution is strongly affected by pH, ionic strength and protein concentration.^{25,30} The extraction method developed provides suitable conditions for maintenance of the C-PC conformation because at neutral pH, moderate ionic strength and moderated protein concentration, the highest possible aggregation state is the trimer where the conformation and spectral properties are well maintained.²⁵ In addition, it should be emphasized that this extraction method is simpler than others that use ultrasounds, mechanical breakage or the addition of chemical compounds (lysozyme, rivanol, acetone, Triton X-100).^{16,17} The extraction method developed has been selected because of its simplicity and because it generates a solution in optimal conditions to be applied on EBAC.

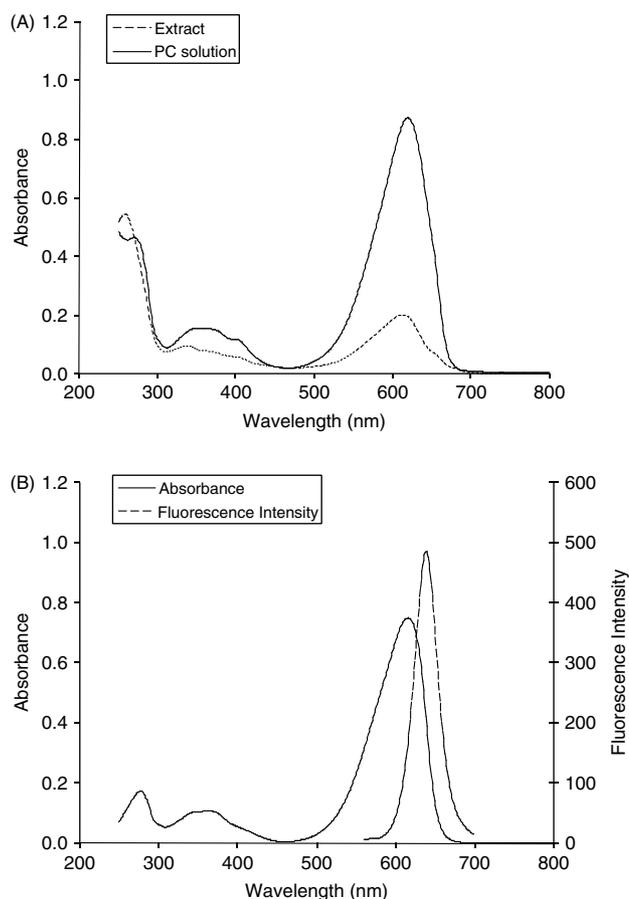


Figure 4. (A) Absorption spectrum (---) of phycocyanins crude extract and phycocyanins-rich solution (—) from expanded bed adsorption chromatography. (B) Spectroscopic characterization (absorption spectra and fluorescence emission) of purified C-PC in 5 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer pH = 7.

Expanded bed adsorption chromatography

Equilibrium and dynamic binding capacities

The first step to develop an EBAC process is to determine the equilibrium adsorption properties of product and adsorbent at real conditions, using crude extract. For this the equilibrium adsorption isotherm on the Streamline-DEAE matrix using phycocyanins crude extract from *Anabaena marina* was obtained (Fig. 5). From these data, the maximum C-PC equilibrium binding capacity was calculated, based on the linear form of the Langmuir's equation, a value of 1.74 mg mL⁻¹ being obtained. In previous studies the maximum binding capacity determined, using either pure C-PC or phycocyanins crude extract from *Spirulina platensis*, was 11.7 and 0.8 mg C-PC mL⁻¹ adsorbent, respectively.²⁵ These data demonstrate that the capacity of the adsorbent decreases considerably in the presence of other proteins in the crude extract. Thus, the non-specific binding of negatively charged compounds in the feedstock interfere with the binding of C-PC to the adsorbent, and hence resulted in a lower capacity. Otherwise, values obtained for both crude extracts were similar, indicating that the crude extracts from *Anabaena* and *Spirulina* have a similar composition, possibly because both are blue-green algae.

The equilibrium binding capacity is the maximum amount of product that can be fixed in the adsorbent at large times. However, during the operation of the expanded bed there are phenomena

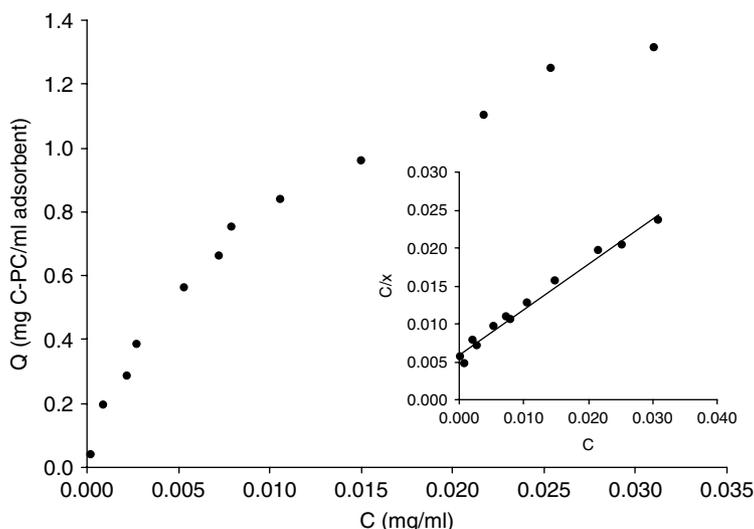


Figure 5. Equilibrium adsorption isotherm of C-PC from phycocyanins crude extract on the Streamline-DEAE matrix. Inside it showed the linearised isotherm form according to the Langmuir's equation.

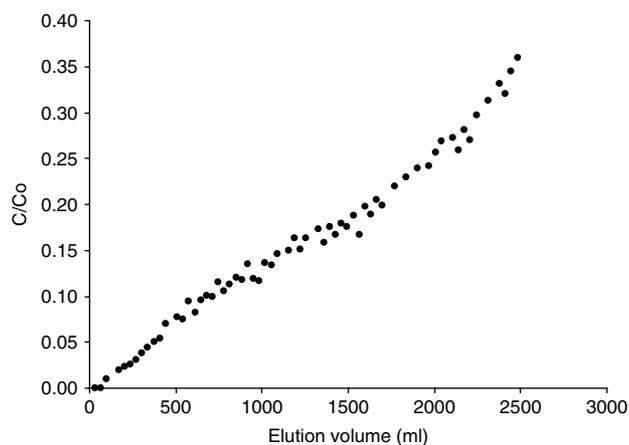


Figure 6. Breakthrough curve for phycocyanins crude extract on Streamline-DEAE using a 15 mm internal diameter column.

that reduce the contact time and thus the binding capacity. For this reason the dynamic binding capacity must be determined to allow estimating the maximum loading volume of unclarified feedstock that can be applied to the column before achieving breakthrough of the target protein. The breakthrough curve for C-PC using Streamline-DEAE was measured in a 15 mm i.d. column (Fig. 6). The dynamic binding capacity of the bed was determined when the C-PC concentration in the column effluent reached 10% of the initial concentration ($C/C_0 = 0.1$) (Equation (3)) in order to reduce the loss of the target product in flowthrough.^{25–27} In these conditions the dynamic binding capacity determined was 0.9 mg C-PC mL⁻¹ Streamline-DEAE adsorbent. This value is lower than 1.7 mg C-PC mL⁻¹ adsorbent obtained from adsorption isotherm because the time for solid–liquid phase to reach equilibrium was insufficient. During operation the liquid velocity and the viscosity of the mobile phase influence the dynamic binding capacity. In addition, the dynamic capacity for C-PC using Streamline-DEAE is low due to the large size of these proteins, which limits the binding of most of the target protein onto surface the of the adsorbent.^{23,31}

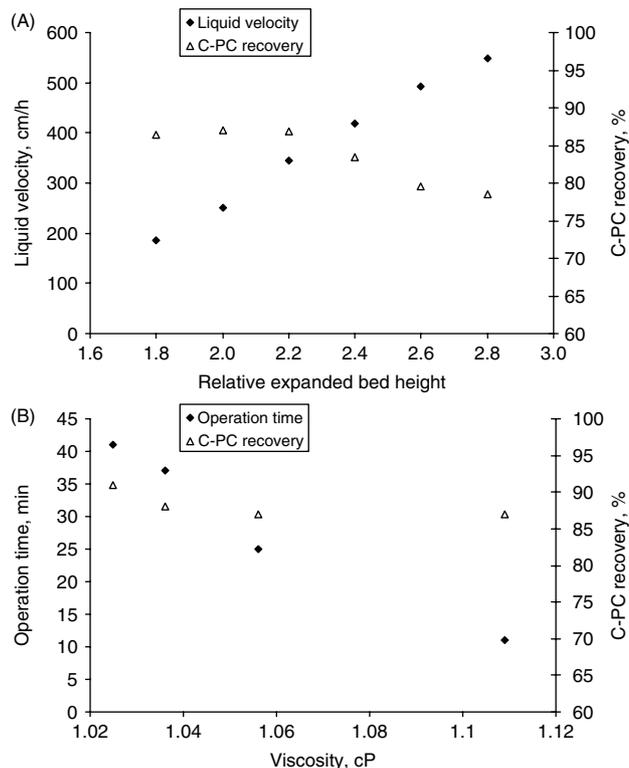


Figure 7. (A) Influence of the liquid velocity on bed expansion characteristics and C-PC recovery percentage. (B) Influence of viscosity on C-PC recovery percentage and operation time. For these experiments a 15 mm internal diameter Streamline-DEAE column was used.

Optimization of expanded bed chromatography

To determine the optimal conditions for expanded bed operation, the influence of the expansion degree of the bed and viscosity of the feedstock in the protein recovery were studied at small scale, using a 15 mm i.d. column. Effective expanded bed operation is achieved when the volume of the expanded bed is between two and three times the volume of the packed bed material and the

bed is stable. In these conditions the liquid flow through the bed is close to plug flow and the contact efficiency is close to packed bed.³² To determine the optimal expansion degree of the bed, experiments were performed using the same sample load (0.9 mg C-PC mL⁻¹ adsorbent) but modifying the liquid velocity to achieve degrees of expansion from 1.8 to 2.8. Results shows that a maximum recovery of 87% was achieved when the expanded bed volume was twice the settled bed volume, being the liquid velocity necessary to achieve this expansion degree 250 cm h⁻¹ (Fig. 7(A)). At expansion degrees from 1.8 to 2.2 the recovery of C-PC is similar, and higher than 86%. However, at expansion degrees higher than 2.2 the recovery of C-PC decreases greatly. This is because at liquid flow rates below the optimum, the expansion degree is low and the mass transfer resistance is high and thus the product recovery and the performance of the system are poor. Opposite, at liquid flow rates above optimum the degree of expansion is excessive and, although the mass transfer resistance diminishes, the distance between matrix particles increases, leading to a lower amount of protein adsorbed on the gel particles. The maximum recovery value obtained is in the range of experimentally determined using different conditions (feedstocks, target proteins, adsorbent matrix, diameter of column) ranging from 70 to 98%.³³ The optimum value of the expansion degree determined experimentally is equal to the previously referenced,^{25,27,34} thus supporting the idea that an expanded bed with double its settled height provides good results in similar systems.

The viscosity of the sample is another important factor to be considered in the optimization of expanded bed operations. In general, the physical properties of the feedstock can be unfavorable for effective processing in expanded beds. Such situations may occur when disrupted-cell preparations of high viscosity are pumped without dilution into the EBAC systems causing flow disturbance, unequal distribution of the sample and poor recovery of the target product.²² Dilution of feedstock before application to the bed is a possible solution to such problems, although the consequent increase in the volume of liquid that needs to be applied to the bed may also reduce the efficiency of the expanded-bed step. The influence of the viscosity of the sample on the behaviour of the system was therefore analyzed. Experiments were conducted at the optimum expansion degree ($H/H_0 = 2$) and sample load (0.9 mg C-PC mL⁻¹ adsorbent), viscosity of the feedstock being modified from 1.109 to 1.025 mP by dilution. All the experiments performed adequately, the behaviour of the expanded bed column was close to plug flow and no channelling phenomena was observed. The results show that the yield of the process increased when the viscosity of sample decreased, the C-PC recovery increasing from 87 to 91% when the viscosity decreased from 1.109 to 1.025 mP, the operation time increasing from 11 to 41 min (Fig. 7(B)). The decrease in the diffusion rate caused by the increase in viscosity reduces the adsorption of proteins into the gel particles. However, the increase in yield (4%) is not enough to justify a reduction in the viscosity of the sample by dilution, due to the consequent increase in the volume of liquid (four-fold) which needs to be applied to the bed, that also reduce the efficiency of the expanded-bed procedure in terms of time and economy. For this reason it was concluded that no additional dilution should be performed.

Once the expanded bed adsorption has been optimized, the next step is to recover the C-PC by elution from the bed. Previous to elution, the remaining unbound molecules are removed by washing the bed in expanded mode using starting buffer. Then, adsorbed C-PC can be eluted. Although the elution from

Streamline-DEAE can be performed in expanded bed or packed bed mode, elution in packed bed mode was previously selected as optimal.³⁵ Thus, expanded bed adsorption experiments were performed at optimal operation conditions previously determined, the adsorbed C-PC being eluted using 500 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer pH 7.0 in packed bed mode. Operating in these conditions, particulate material was not observed in the eluted fractions, the absorbance of effluent from the column during EBA chromatography being showed in Fig. 8(A). The absorbance of the fractions obtained shows a sharp peak, indicating a high elution efficiency. The UV-vis absorption spectrum of this PCs rich solution corresponds to a phycobiliproteins mixture where C-PC predominates with slight APC contamination (Fig. 4(A)). The spectrum showed a significant loss of absorption in the near-UV region with respect to the crude extract spectrum. In addition, the purity ratio (A_{615}/A_{280}) was about 1.7, which is five times higher than of the crude extract ($A_{615}/A_{280} = 0.3$), although it still does not meet the purity standard of C-PC. It should be emphasized that it was considered more important to achieve a high rate of phycocyanin recovery than a highly pure solution, since the procedure is intended to replace low-resolution steps that normally result in phycobiliproteins losses.

Scale-up of expanded bed chromatography

Once the operation of expanded bed adsorption chromatography has been optimized at small scale, it was scaled-up to columns of 25 mm, 40 mm, 60 mm and finally 90 mm i.d. For scale-up of expanded bed adsorption columns it is a must to keep the form of the breakthrough curve constant. This is a function of the length of the column and the feedstock flow rate, and thus both parameters must be kept constant on the larger scale. All the different internal diameter columns essayed were filled with 15 cm of Streamline-DEAE. Regarding the flow rate, the liquid velocity (flow rate divided by cross-sectional area) must be also kept constant. Thus, if the column diameter is modified, the volumetric feedstock flow rate has to be increased in proportion to the cross section of the column. To verify that the scale-up procedure was adequate the performance of the different columns was evaluated by operating them according to the optimal conditions obtained in previous experiments. Data from the runs performed in the different columns are shown in Table 1. The yield of C-PC at all scales was in the range 82 to 86%, no influence of the column size being observed. Figure 8(B) shows the chromatographic profile obtained using the 60 mm i.d. column, which is analogous to the obtained using the 15 mm internal diameter column (Fig. 8(A)). Moreover, the chromatographic profile of the eluates obtained from the different expanded bed runs performed using different columns were identical, with absorbance ratio values of $A_{615}/A_{280} \approx 1.6$. These results verify the consistency of the scale-up process used and the reproducibility of large scale Streamline-DEAE columns.

Purification and identification of C-PC

Finally, in order to obtain pure C-PC, the eluate obtained from EBAC was subjected to anion exchange chromatography in packed bed mode to eliminate APC and other colorless proteins. Prior to this, the fractions recovered from the Streamline-DEAE column (PCs-rich solution) were precipitated, resuspended in starting buffer and dialyzed against the same buffer, finally they were loaded in the starting buffer-pre-equilibrated column. To separate pure C-PC by anion exchange chromatography, continuous and discontinuous

Table 1. Summary of data from small to large scale recovery of C-PC from *Anabaena marina* by expanded bed adsorption chromatography using 15 cm (settled bed height) Streamline DEAE at 256 cm h⁻¹ in Streamline columns (15–90 mm i.d)

Column i.d. (mm)	C-PC loaded (mg)	Sample volume (ml)	Elution peak (SBV)	Elution peak (ml)	Settled volume (ml)	Total time operation (min)	C-PC recovered (mg)	C-PC recovery (%)
15	24	234	19.1	506	27	102	18	86.1
25	66	645	20.0	1506	74	119	55	82.8
40	170	1652	19.2	3629	189	140	146	85.9
60	382	3718	20.2	8586	424	152	325	85.0
90	859	8366	20.7	19748	954	176	723	84.2

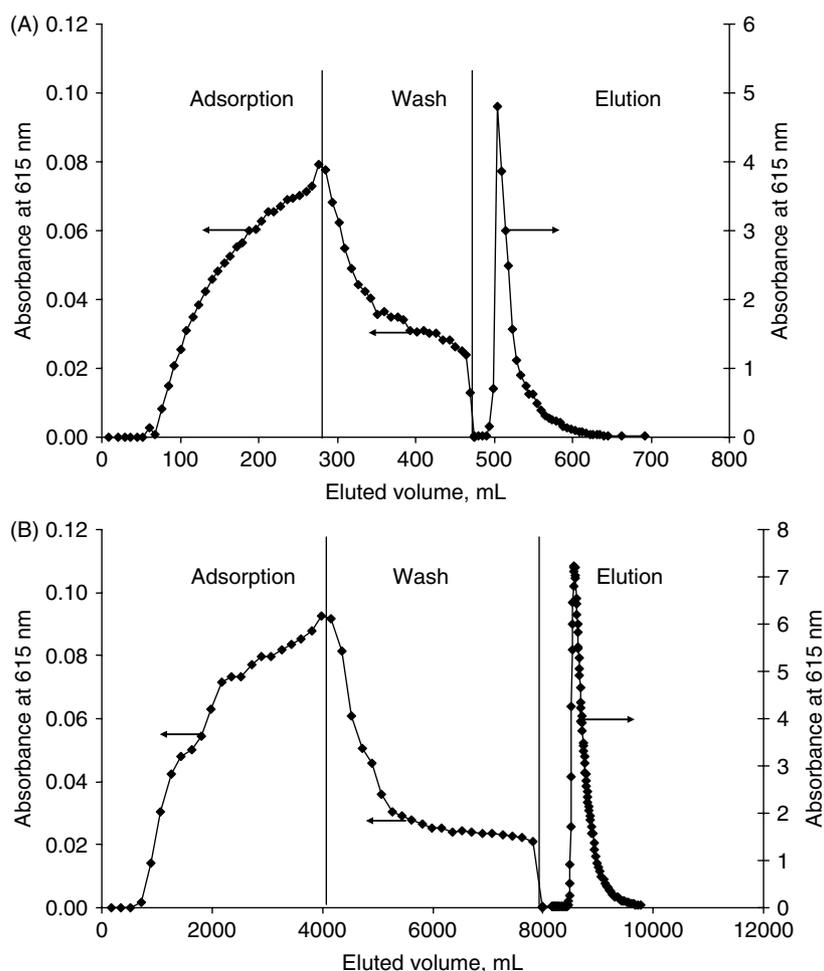


Figure 8. Absorbance at 615 nm of the effluent from the (A) 15 mm internal diameter column and (B) 60 mm internal diameter column, during EBA chromatography of crude extract from *Anabaena marina* biomass. C-PC crude extract (0.9 mg C-PC mL⁻¹ adsorbent) was applied to the Streamline-DEAE column. Feed rate = 256 cm h⁻¹, elution rate = 90 cm h⁻¹. In the elution step, the absorbance was measured after suitable dilution. Thus, the absorbance values in ordinate axes are the resulting values after multiplication by the dilution factor.

ionic strength gradients were assayed, as well as pH gradients. The pH gradient protocol was not successful (data not shown) and so pure C-PC was recovered using ionic strength discontinuous gradient. For this the column was developed with 290 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer pH 7.0 using a flow rate of 50 mL h⁻¹. The recovery of C-PC after DEAE-cellulose chromatography was 74%, expressed as the percentage of pure C-PC in the final concentrate versus the total C-PC loaded onto the ion-exchange matrix. The C-PC fractions whose spectroscopic purity ratios (A_{615}/A_{280}) were higher than 4.0 were pooled, lyophilized and stored in the dark at -20 °C.

To analyze the evolution of purity during the overall process, samples obtained in each one of the stages (extraction, expanded bed chromatography and anion-exchange chromatography) were developed by SDS-PAGE electrophoresis. Figure 9 shows that unwanted proteins were removed at each successive chromatographic step (lanes 2 to 4). The bands located near 20 kDa in lanes 2 and 3 should be assigned to the combination of C-PC and APC α - β -subunits (intense bands) and other bands (less intense) correspond to contaminant proteins, these being less intense than biliprotein bands. It can be observed that many of the unwanted proteins from crude extract (lane 2) were removed after

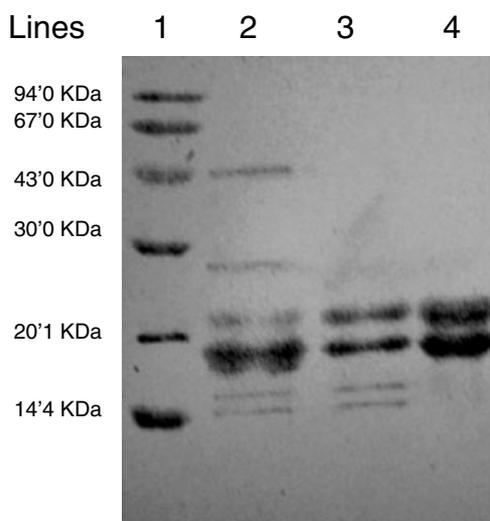


Figure 9. SDS-PAGE analysis of proteins solutions from different purification steps. Lane 1: molecular mass markers; lane 2: phycocyanins crude extract; lane 3: eluate after EBA chromatography; lane 4: eluate after packed bed chromatography.

EBA chromatography (lane 3). Subsequently, after anion-exchange chromatography only two bands with similar intensities (lane 4) which should be the α - and β -subunits of C-PC were detected. By comparing with the molecular markers, purified C-PC showed two bands corresponding to 17.6 and 20.5 kDa, respectively. These values agree with those reported earlier.^{25,36,37}

Phycocyanins purity and their conformational state were also tested using spectroscopic characterization. Figure 4B shows absorption and fluorescence spectra from the pure C-PC solutions obtained. A sharp increase in a single peak at 615 nm shows the absorbance maximum of C-PC, whereas a decrease in absorbance at 280 nm indicates the removal of other proteins. There was no absorbance peak or shoulder at 650 nm, suggesting the absence of APC from the purified sample. The absorption spectra of the trimeric and monomeric C-PC forms are only slightly affected by the aggregation changes in the protein. Thus, the absorption and fluorescence spectra from the dialyzed C-PC solutions in Fig. 4(B) agree with those published for pure C-PC,^{36,37} although it is not possible to recognize the aggregation state from these spectra. The easiest and most explanatory spectroscopic test to determine the aggregation state of biliproteins is to record the excitation fluorescent steady-state anisotropy spectrum (data not shown). Since energy transfer between chromophores modulates the fluorescent properties of these proteins, a dramatic increase in the anisotropy spectra has been observed when the aggregation state of the biliproteins changes from trimers to monomers,^{38,39} due to the chromophores uncoupling, which altered the pathways for energy transfer between them. The spectra shapes and the quantitative values of the C-PC are similar to those published earlier for trimeric C-PC from *S. platensis*.³⁸

CONCLUSIONS

In this work a scalable methodology for the efficient recovery and purification of C-PC from the blue-green alga *Anabaena marina* is demonstrated. The proposed methodology involves an extraction step followed by expanded bed adsorption chromatography using Streamline-DEAE, complemented by conventional chromato-

Table 2. Recovery and purity of fractions obtained during the proposed process

Purification step	C-PC recovery on step (%)	Purity ratio A_{615}/A_{280}
Extraction	97	0.4
EBA chromatography Streamline DEAE	86	1.6
Packed bed chromatography cellulose DE-52	74	>4
Overall C-PC recovery	62	

graphy in DEAE-cellulose. The optimal extraction conditions were the use of sodium phosphate buffer 50 mmol L⁻¹ pH 7.0 in repeated single contact and the optimum number of contact steps was three. The optimal conditions of expanded bed adsorption chromatography were an expansion degree equal to two and the viscosity of crude extract was to be kept unmodified. Finally, pure C-PC was recovered by conventional chromatography in DEAE-cellulose with ionic strength discontinuous gradient using 290 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer pH 7.0. Data shows that the C-PC overall recovery measured using the proposed method was 62%, 97% of C-PC recovery by extraction with only a 13% of C-PC decrease with expanded bed chromatography (Table 2). This value is higher than the value obtained previously for C-PC from *Spirulina platensis* involving EBA chromatography. Moreover the proposed method allows obtaining C-PC solutions in trimeric aggregation state.

It is also demonstrated that expanded bed for C-PC purification can be adequately scaled-up from small scale data. Results show that expanded bed chromatography is a scalable technology that allows large quantities of C-PC to be obtained, minimizing the product losses. This technology allows maintaining a high protein recovery while reducing both processing costs and times when compared with conventional methodologies. Conventional schemes for phycobiliproteins purification uses multiple unit operations (precipitation, centrifugation, dialysis, ion-exchange chromatography, etc.), the unit production cost corresponding to fixed capital per year being higher than 70%. The use of expanded bed methodology greatly reduces the major equipment list as well as the man-power, also doubling the recovery yield. Thus, the join of both factors allows concluding that expanded bed methodology will greatly contribute to reduce the unit cost of producing C-PC, if adequate optimization and scale-up of the processes are achieved.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support from Junta de Andalucía (Spain) (Proyecto de Excelencia P06-TEP-01362) is gratefully acknowledged. A. Ramos thanks the Junta de Andalucía for her grant.

REFERENCES

- 1 Glazer AN, Phycobiliproteins. *Meth Enzymol* **167**:291–303 (1988).
- 2 Glazer AN, Phycobiliproteins – a family of valuable, widely used fluorophores. *Scanning* **19**:154–155 (1997).
- 3 Arad S and Yaron A, Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends Food Sci Technol* **3**:92–97 (1992).
- 4 Ayyagari MS, Pande R, Kamtekar S, Gao H, Marx KA, Kumar J, et al, Molecular assembly of proteins and conjugated polymers: toward development of biosensors. *Biotechnol Bioeng* **45**:116–121 (1995).

- 5 Bermejo R, Tobaruela DJ, Talavera EM, Orte A and Alvarez-Pez JM, Fluorescent behavior of B-phycoerythrin in microemulsions of aerosol OT/water/isooctane. *J Colloid Interface Sci* **263**:616–624 (2003).
- 6 Ramirez D, González A, Merino N, González R, Ancheta O, Romay C, et al, Effect of phycocyanin in zymosan-induced arthritis in mice – phycocyanin as an antiarthritic compound. *Drug Dev Res* **48**:70–75 (1999).
- 7 Rimbau V, Camins A, Romay C, González R and Pallás M. Protective effects of C-phycocyanin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus. *Neurosci Lett* **276**:75–78 (1999).
- 8 Benedetti S, Rinalducci S, Benvenuti F, Francogli S, Pagliarini S, Giorgi L, et al, Purification and characterization of phycocyanin from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *J Chromatog B: Anal Technol Biomed Life Sci* **833**:12–18 (2006).
- 9 Bhat VB and Madyastha KM, C-phycocyanin: A potent peroxyl radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* **275**:20–25 (2000).
- 10 Rimbau V, Camins A, Pubill D, Sureda FX, Romay C, González R, et al, C-phycocyanin protects cerebellar granule cells from low potassium/serum deprivation-induced apoptosis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **364**:96–104 (2001).
- 11 Morcos NC, Berns M and Henry WL, Phycocyanin: Laser activation, cytotoxic effects, and uptake in human atherosclerotic plaque. *Lasers Surg Med* **8**:10–17 (1988).
- 12 Roy KR, Arunasree KM, Reddy NP, Dheeraj B, Reddy GV and Reddanna P, Alteration of mitochondrial membrane potential by *Spirulina platensis* C-phycocyanin induces apoptosis in the doxorubicin-resistant human hepatocellular-carcinoma cell line HepG2. *Biotechnol Appl Biochem* **47**:159–167 (2007).
- 13 Subhashini J, Mahipal SVK, Reddy MC, Reddy MM, Rachamalla A and Reddanna P. Molecular mechanisms in C-phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Biochem Pharmacol* **68**:453–462 (2004).
- 14 Bermejo R, Talavera EM, Del Valle C and Álvarez-Pez JM, C-PC incorporated into reverse micelles: a fluorescence study. *Colloid Surfaces B: Biointerfaces* **18**:51–59 (2000).
- 15 Moreno A, Bermejo R, Talavera EM, Alvarez-Pez JM, Sanza-Aparicio J and Romero-Garrido A, Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of C-PC and APC from *Spirulina platensis*. *Acta Cryst A* **D53**:321–326 (1997).
- 16 Campanella L, Crescentini G, Avino P and Angiello L, Simple and rapid procedure for analyzing two phycocyanins (C-PC and APC) from *Spirulina platensis* algae using LPLC and HPLC methods. *Ann Chim* **90**:153–161 (2000).
- 17 Bermejo Román R, Álvarez-Pez JM, Acien Fernández FG and Molina Grima E, Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *J Biotechnol* **93**:73–85 (2002).
- 18 Tchernov AA, Minkova KM, Houbavenska NB and Kovacheva NG. Purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. by amino-hexyl-Sepharose chromatography. *J Biotechnol* **69**:69–73 (1999).
- 19 Herrera A, Boussiba S, Napoleone V and Hohlberg A, Recovery of c-phycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. *J Appl Phycol* **1**:325–331 (1989).
- 20 Silveira ST, De Menezes Quines LK, Burkert CAV and Kalil SJ, Separation of phycocyanin from *Spirulina platensis* using ion exchange chromatography. *Bioprocess Biosyst Eng* **31**:477–482 (2008).
- 21 Narayan AV and Raghavarao KSMS, Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* employing aqueous two phase systems. *Int J Food Eng* **3**:(2007).
- 22 Chase HA, Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. *Trends Biotechnol* **12**:296–303 (1994).
- 23 Clemmitt RH and Chase HA, Facilitated downstream processing of a histidine-tagged protein from unclarified *E. coli* homogenates using immobilized metal affinity expanded-bed adsorption. *Biotechnol Bioeng* **67**:206–216 (2000).
- 24 Anspach FB, Curbelo D, Hartmann R, Garke G and Deckwer W, Expanded bed chromatography in primary protein purification. *J Chromatog A* **855**:129–144 (1999).
- 25 Bermejo R, Felipe MA, Talavera EM and Alvarez-Pez JM, Expanded bed adsorption chromatography for recovery of phycocyanins from the microalga *Spirulina platensis*. *Chromatographia* **63**:59–66 (2006).
- 26 Niu J, Wang G, Lin X and Zhou B. Large-scale recovery of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. *J Chromatog B: Anal Technol Biomed Life Sci* **850**:267–276 (2007).
- 27 Bermejo R, Acien FG, Ibáñez MJ, Fernández JM, Molina E and Alvarez-Pez JM, Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. *J Chromatog B: Anal Technol Biomed Life Sci* **790**:317–325 (2003).
- 28 Siegelman H and Kycia JH, Algal biliproteins. in *Handbook of Phycological Methods: Physiological Biochemistry Methods*, ed by Hellebust JA and Craigie JS. Cambridge University Press, London, pp 71–79 (1978).
- 29 Güzeltunc E and Ulgen KÖ, Recovery of actinorhodin from fermentation broth. *J Chromatogr A* **914**:67–76 (2001).
- 30 Glazer AN, Phycobiliproteins. in *Chemicals from Microalgae*, ed by Cohen Z. Taylor and Francis Ltd, London, pp 262–280 (1999).
- 31 Ng MYT, Tan WS, Abdullah N, Ling TC and Tey BT, Direct purification of recombinant hepatitis B core antigen from two different pre-conditioned unclarified *Escherichia coli* feedstocks via expanded bed adsorption chromatography. *J Chromatog A* **1172**:47–56 (2007).
- 32 Barnfield Frej AK, Hjorth R and Hammarstrom A, Pilot scale recovery of recombinant annexin V from unclarified *Escherichia coli* homogenate using expanded bed adsorption. *Biotechnol Bioeng* **44**:922–929 (1994).
- 33 Clemmitt RH and Chase HA, Adsorption as an initial step for the capture of proteins. in *Isolation and Purification of Proteins*, Hattikaul R and Mattiasson B. CRC Press, pp 373–422 (2003).
- 34 Chase HA and Draeger NM, Expanded-bed adsorption of proteins using ion-exchangers. *Sep Sci Technol* **27**:2021–2039 (1992).
- 35 Bermejo R, Ruiz E and Acien FG, Recovery of B-phycoerythrin using expanded bed adsorption chromatography: scale-up of the process. *Enzyme Microb Technol* **40**:927–933 (2007).
- 36 Duerring M, Schmidt GB and Huber R, Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of constitutive C-phycocyanin from the chromatically adapting cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* at 1.66 Å resolution. *J Mol Biol* **217**:577–592 (1991).
- 37 Santiago-Santos MC, Ponce-Noyola T, Olvera-Ramírez R, Ortega-López J and Cañizares-Villanueva RO, Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. *Process Biochem* **39**:2047–2052 (2004).
- 38 Bermejo R, Talavera EM, Alvarez-Pez JM and Orte JC, Chromatographic purification of biliproteins from *Spirulina platensis*. High-performance liquid chromatographic separation of their α and β subunits. *J Chromatog A* **778**:441–450 (1997).
- 39 Mimuro M, Rübéli R, Füglistaller P and Zuber H. The microenvironment around the chromophores and its changes due to the association states in C-phycocyanin isolated from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *BBA – Bioenergetics* **851**:447–456 (1986).



Development of a process for large-scale purification of C-phycocyanin from *Synechocystis aquatilis* using expanded bed adsorption chromatography

Amparo Ramos^a, F.Gabriel Acién^b, José M. Fernández-Sevilla^b,
Cynthia V. González^b, Ruperto Bermejo^{a,*}

^a Department of Physical and Analytical Chemistry, Jaén University, E.P.S. of Linares, Alfonso X El Sabio, No. 28, 23700 Linares, Jaén, Spain

^b Department of Chemical Engineering, Almería University, 04071 Almería, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 November 2010

Accepted 10 January 2011

Available online 15 January 2011

Keywords:

Expanded bed adsorption chromatography

Synechocystis aquatilis

Phycobiliproteins

C-phycocyanin

Preparative protein purification

Anion-exchange chromatography

ABSTRACT

In this paper a large and scalable method for purification of C-phycocyanin (C-PC) from the cyanobacteria *Synechocystis aquatilis* has been developed. Phycobiliproteins are extracted from the cells by osmotic shock and separated by passing the centrifuged cell suspension through an expanded bed adsorption chromatography (EBAC) column using Streamline-DEAE as adsorbent. The eluted C-PC rich solution is finally purified by packed-bed chromatography using DEAE-cellulose. Optimal extraction is achieved using phosphate 0.05 M buffer pH 7.0 twice. The operation of EBAC is optimized on a small scale using a column of 15 mm internal diameter (I.D.). The optimal conditions are a sample load of 4.9 mg C-PC/mL adsorbent, an expanded bed volume twice the settled bed volume and a sample viscosity of 1.020 mP. The EBAC process is then scaled up by increasing the column I.D. (15, 25, 40, 60 and 90 mm) and the success of the scale-up process is verified by determining the protein breakthrough capacity and product recovery. The yield of the EBAC step is in the range of 90–93% for every column diameter. To obtain pure C-PC, conventional ion-exchange chromatography with DEAE-cellulose is utilized and a yield of 74% is obtained. The overall yield of the process, comprising all steps, is 69%. The purification steps are monitored using SDS-PAGE and the purity of recovered C-PC is confirmed by absorption and emission spectroscopy and RP-HPLC. Results show that EBAC method is a scalable technology that allows large quantities of C-PC to be obtained without product loss, maintaining a high protein recovery while reducing both processing cost and time.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Phycobiliproteins are proteins that form light-harvesting antenna complexes (phycobilisomes) and act as photosynthetic accessory pigments in cyanobacteria and red algae. These macromolecules are a family of hydrophilic, brilliantly colored and stable fluorescent pigment proteins. Phycobiliproteins consist of three main groups: phycoerythrins (PEs), phycocyanins (PCs) and allophycocyanins (APCs) [1,2]. Because of their excellent spectroscopic properties, stability, high absorption coefficient and high quantum yield, a wide range of promising applications of phycobiliproteins in biomedical research, diagnostics and therapeutics has become possible [3–6]. In addition, they have potential as natural colorants

for use in food, cosmetics and pharmaceuticals, particularly as substitutes for synthetic dyes, which are generally toxic or otherwise unsafe [7–9]. Particularly, C-PC is of great importance because of its various medical and pharmacological properties, showing to have therapeutic value due to their protective effect and anti-carcinogenic activity [10,11], antioxidative and anti-inflammatory activities [12,13] and for the treatment of Alzheimer's and Parkinson's disease [14].

Phycobiliproteins have wide usage and great economic potential. Nevertheless, the widespread use of C-PC and other phycobiliproteins has been somewhat limited by the high cost of these purified macromolecules, ranging from \$10 to 50 per mg (Prozyme, ABDBioquest Inc.). For uses as colorant this price reduces to \$1–5 per gram because lower purity is requested (Sigma, 2009). Conventional methods for phycobiliprotein purification involve the pretreatment of the sample to liberate the intracellular material, making a crude extract ready for an isolation step in which the phycobiliproteins are separated using conventional chromatography processes [1,15–18]. For C-PC purification, several chromatographic methods are described in the literature involving adsorption, hydrophobic interaction, gel filtration or ion

Abbreviations: EBAC, expanded bed adsorption chromatography; DEAE, diethylaminoethyl; C-PC, C-phycocyanin; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; I.D., internal diameter; PCs, phycocyanins; RP-HPLC, reverse phase high performance liquid chromatography.

* Corresponding author. Tel.: +34 953 648513; fax: +34 953 648560.

E-mail address: rbermejo@ujaen.es (R. Bermejo).

exchange chromatography [16,19–21]. These methods involve a large number of steps, resulting complex and difficult to scale up, are time-consuming and have a low product yield. In order to establish a competitive biotechnological process for protein purification, expanded bed adsorption (EBA) chromatography has been proposed as a single-unit operation combining separation, concentration and capture of the target protein [22]. The use of this technique simplifies the clarification steps and produces a concentrate, including partially pure product, ready for the next purification step, usually packed-bed chromatography. Actually, the use of expanded bed simplifies the downstream-processing flow sheets for the recovery of a wide variety of proteins, with concomitant savings in equipment and operating costs [18,23–25].

In view of the increasing demands for relatively large amounts of phycobiliproteins, the aim of the present study is to develop a fast method for the large-scale purification of C-PC from the microalga *Synechocystis aquatilis* using expanded-bed adsorption. This cyanobacteria has a higher phycobiliprotein content than other previously reported as *Spirulina* or *Anabaena*, of 2.8% versus 1.9% and 2.1% respectively. First, the extraction of the product from the biomass was optimized. Next, C-PC was separated by EBA chromatography using Streamline-DEAE. The purity of C-PC obtained was confirmed by SDS-PAGE electrophoresis, spectroscopic characterization and RP-HPLC. The operation of expanded bed technology was optimized on a small scale and the chromatographic parameters (sample load, viscosity and expansion degree) were studied. Then, the process was scaled up 36 times by increasing the column diameter, while parameters such as the settled bed height, linear flow-rate and protein load remained constant. EBA technology allows obtaining concentrates ready to be loaded into a conventional DEAE-cellulose column, where the product is purified by packed bed ion exchange chromatography. Using this methodology pure C-PC is obtained and the protein recovery is maximized.

2. Materials and methods

2.1. Microalga biomass

The blue-green microalga *S. aquatilis* was used. The biomass was obtained from continuous cultures carried out outdoors in a flat panel photobioreactor. The photobioreactor was 2.6 m wide, 1.6 m high and 0.07 m thick. It was operated at a dilution rate of 0.3 day⁻¹ outdoors in Almeria, Spain, during spring. Arnon medium was used for culture growth. The photobioreactor was aerated at 0.05 (v/v/min) and pH was controlled at 8.0 by on-demand injection of CO₂. Temperature of the culture was controlled at 25 °C by passing thermostated water through a heat exchanger located inside the photobioreactor. Biomass was directly collected from the harvest by centrifugation and stabilized by freeze-drying. Dry biomass was then stored at 4 °C until it was processed.

2.2. Chemicals

Streamline-DEAE anion-exchanger and materials used for sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) were from Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). Preswollen microgranular DEAE-cellulose DE-52 was from Whatman (Maidstone, UK). Molecular mass standards, dialysis tubing and tubing closures, ammonium sulfate, sodium azide and all other chemicals were from Sigma Diagnostics (St. Louis, MO, USA) and used without further purification.

2.3. Extraction of phycobiliproteins

For extraction of phycobiliproteins, water and buffer solutions was used, all of them with 0.01% sodium azide added. For all

experiments, 2 g of biomass powder was mixed with 40 mL of liquid (water or buffer solutions), and the slurry was agitated for 30 min at constant speed by a Heidolph RZR1 variable-speed magnetic stirrer (Schwabach, Germany). The resulting slurry was transferred to centrifuge tubes and centrifuged at 12000 rpm for 15 min in a Meditronic BL-S Selecta centrifuge. The blue supernatant (crude extract) was collected and the concentration of biliproteins (C-PC and APC) determined according to Eqs. (1) and (2) respectively [26]. Absorbance measurements and absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer (Beaconsfield, UK) Lambda-20 UV-vis spectrophotometer with a 1 cm light path. To optimize the extraction step the same procedure was repeated by adding 40 mL of fresh liquid over the pellets obtained after the centrifugation, until no more phycobiliproteins were recovered.

$$\text{C-PC (mg mL}^{-1}\text{)} = \frac{A_{615\text{ nm}} - A_{730\text{ nm}} - 0.47(A_{652\text{ nm}} - A_{730\text{ nm}})}{5.34} \quad (1)$$

$$\text{APC (mg mL}^{-1}\text{)} = \frac{A_{652\text{ nm}} - A_{730\text{ nm}} - 0.2087(A_{615\text{ nm}} - A_{730\text{ nm}})}{5.09} \quad (2)$$

To obtain large volumes of crude extract the process was repeated using the optimal extraction medium (50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0). All the supernatants were pooled obtaining a PCs crude extract that was then stored at 4 °C and utilized for EBAC experiments. The complete purification procedure is shown in Fig. 1.

2.4. Expanded bed chromatography

2.4.1. Equilibrium adsorption isotherm and dynamic binding capacity

The adsorption isotherm was obtained by shake flasks experiments. The adsorption parameters of the Streamline-DEAE chromatographic matrix were determined using the phycocyanin crude extract. For this, 15 mL sealed shake tubes containing dilutions of the crude extract were used. The tubes were placed in a shaking water bath at 26 °C and 2 mL of Streamline-DEAE was added to each tube. After 24 h of equilibration time the content of the tubes was analyzed. The equilibrium concentration of C-PC in the bulk liquid phase was determined by spectrophotometer and the C-PC bound per mL of the ion-exchanger adsorbent at equilibrium was calculated by a mass balance. The maximum binding capacity was obtained using the linear form of the Langmuir's equation (Eq. (3)), where X and C are the adsorbed and aqueous protein concentration in equilibrium, respectively:

$$X = \frac{X_{\text{max}} \cdot C}{K_e + C} \quad (3)$$

The dynamic binding capacity of the adsorbent was determined from the breakthrough curve using the smallest column (15 mm I.D.) with the standard settled height of 15 cm. For this purpose a crude extract solution of C-PC (0.033 mg/mL) in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 (starting buffer) was used. Initially, starting buffer was pumped upwards through the bed at increasing flow rate until the bed stopped expanding. After this, the C-PC crude extract solution was applied to the expanded bed and the breakthrough curve was calculated as the amount of applied C-PC per ml adsorbent at different C/C_0 , where C_0 corresponds to the C-PC concentration in the crude extract and C the C-PC concentration in the flow through. The experiment was terminated when C/C_0 rose to 0.3. The dynamic binding capacity (X_m) (mg of protein per ml of settled adsorbent) can be calculated according to Eq. (4), where V_b

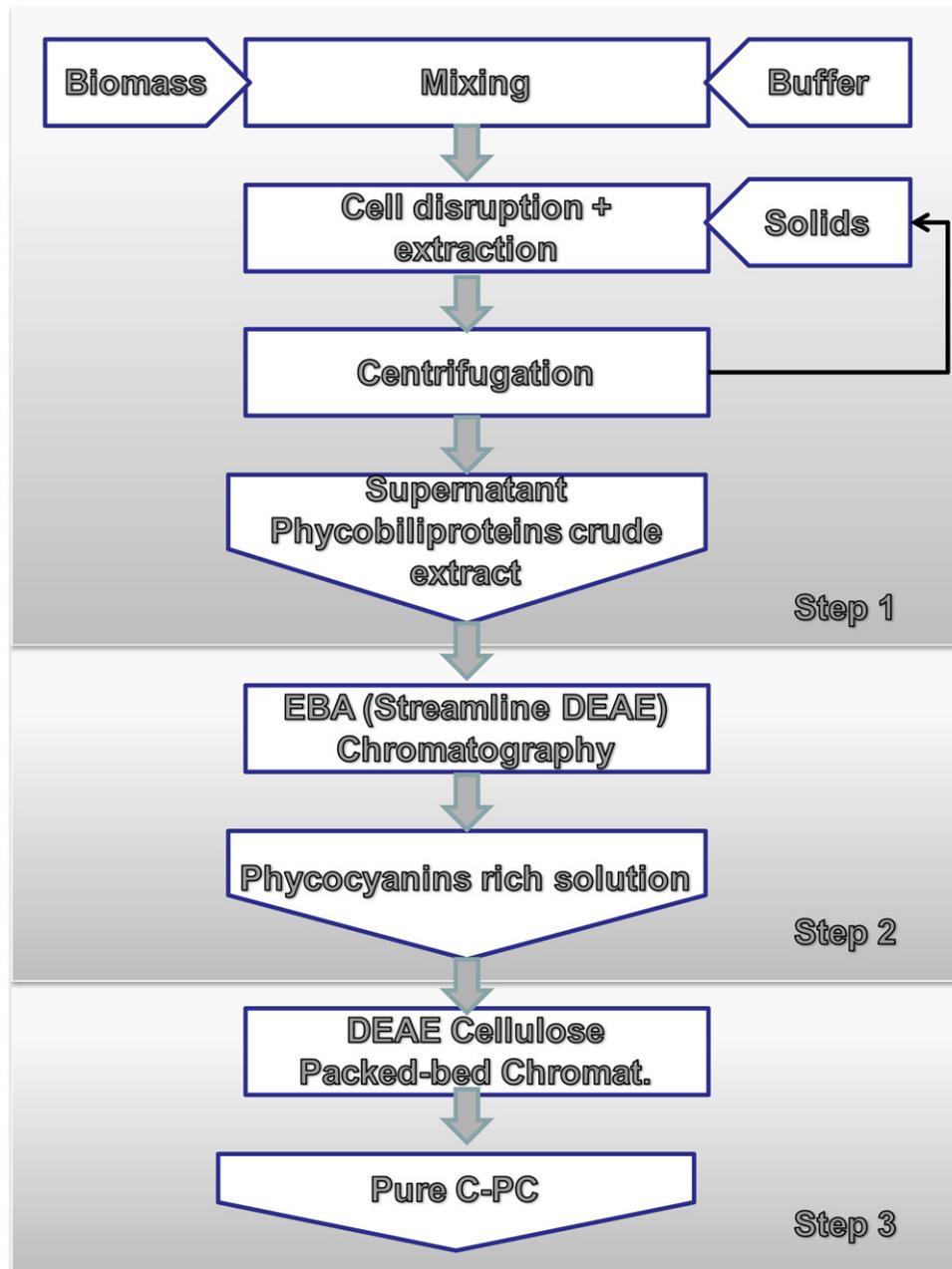


Fig. 1. Schematic diagram of the process used for C-PC extraction (step 1), separation (step 2) and purification (step 3) from microalgal biomass.

is the volume at 10% breakthrough (mL), C_0 is the initial concentration on the unclarified feedstock (mg/mL) and V_s is the settled volume of the adsorbent (mL).

$$X_m = \frac{C_0 \cdot V_b}{V_s} \quad (4)$$

2.4.2. Expanded bed operation

For expanded bed operation the column was filled with the necessary volume of adsorbent to a constant settled height of 15 cm (H_0). Distilled water was then pumped upwards through the bed until it stopped expanding. A Heidolph PD-5001 peristaltic pump (Schwabach, Germany) was used to regulate the flow-rate. When the bed was stable (after approximately 20–30 min) the column was equilibrated with a suitable volume of starting buffer. Next, solution from the extraction step (PCs crude extract) was used. The PCs crude extract was applied and the expanded bed runs

were conducted at a constant bed height. The PCs crude extract was constantly stirred during application to avoid settling. The phycobiliproteins in the extract were captured by the adsorbent, while the cell debris, particles and most contaminant proteins were eluted by the upward flow. After application of the total sample volume, the columns were washed with the starting buffer until the absorbance at 615 nm in the effluent returned to the base line. After washing in the expanded bed mode, the upward flow was stopped and the bed was allowed to settle in the column. The phycobiliproteins were eluted in downflow mode using an isocratic elution of 500 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 to obtain the PCs rich solution. Fractions of 5–30 ml were collected during elution using a Redifrac fraction collector from GE Healthcare. Concentration of phycobiliproteins at collected fractions was determined spectrophotometrically (Eqs. (1) and (2)) and blue color fractions were pooled. A cleaning-in-place procedure was carried out then. The column was washed with three settled bed volumes of each

0.5 M NaOH–1 M NaCl solution, distilled water, 25% (v/v) acetic acid, and distilled water in sequence. The column was prepared for a new experiment after equilibration with five settled bed volumes of starting buffer.

2.4.3. Optimization of EBA at small scale (15 mm I.D. column)

For the optimization of the expanded bed methodology on a small scale, the influence of the degree of expansion and viscosity of the sample were studied. The degree of expansion was quantified as H/H_0 , where H is the expanded bed height and H_0 is the settled bed height. Different degrees of bed expansion between 1.6 and 2.8, were assayed by pumping buffer and sample up into the Streamline-DEAE column at different flow-rates, from 7.8 to 16.1 ml min⁻¹. In these experiments, a sample volume of 87 mL (1.49 mg C-PC/ml crude extract) and a protein/adsorbent ratio of 4.9 mg C-PC/mL adsorbent were used. Regarding the viscosity, different sample viscosities were assayed. Samples were prepared by diluting the C-PC crude extract (1.49 mg C-PC/ml) with a suitable volume of buffer. Viscosity was measured using a Series 75 Cannon-Fenske Proton viscosimeter (Cannon Instrument Company, 2139 High Tech Rd., State College, PA 16803) calibrated against distilled water at 25 °C.

2.5. Recovery of pure C-phycoerythrin

The PCs rich solution from EBAC step was used to obtain pure C-PC by anion-exchange chromatography. The PCs rich solution from EBAC was dialyzed against a suitable volume of 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0. The dialyzed solution (0.44 mg C-PC/mL) was applied to a column (2.5 cm × 20 cm) loaded with DEAE-cellulose DE-52 and pre-equilibrated with starting buffer. After washing with one bed volume of this buffer, the column was developed with 290 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 at a flow rate of 50 mL/h. The C-PC was eluted from the column and the fractions with an intense blue color were pooled. Next, the column was cleaned and prepared for a new experiment, being washed with one bed volume of 500 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 and equilibrated with starting buffer. The C-PC blue fractions were pooled, saturated up to 70% with (NH₄)₂SO₄ and left to stand overnight in the dark at 4 °C before centrifugation. The pellets of purified biliproteins were resuspended in small volumes of 5 mM sodium phosphate buffer, dialyzed overnight at 4 °C against the same buffer, and finally freeze-dried.

2.6. Identification of purified C-phycoerythrin

The content and purity of C-PC purified by anion exchange chromatography were determined by UV-vis absorption spectroscopy, steady-state fluorescence, electrophoresis and RP-HPLC. Absorbance measurements and absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer (Beaconsfield, UK) Lambda-20 UV-Vis spectrophotometer with a 1 cm light path. Fluorescence emission spectra were recorded on a Jasco FP-6500 spectrofluorometer (Kyoto, Japan). Protein concentrations were chosen so that re-absorption of the emission was negligible. All spectra were recorded at room temperature. RP-HPLC was performed using a Vydac C4 column (4.6 mm × 250 mm) (The separations group, Hesperia, CA). Elution was carried out at a flow rate of 1 mL/min with a linear gradient of water and acetonitrile, containing 0.1% and 0.085% TFA respectively, from 20% of acetonitrile to 95% in 60 min. The effluent from the column was monitored by measuring the absorbance at 226 nm.

Electrophoresis was carried out in a Bio-Rad Miniprotein III vertical slab gel apparatus (Milan, Italy) using Laemmli-buffer system [27] consisting of a 12.5% (w/v) polyacrylamide slab gel, 0.75 mm thick, containing 0.1% (w/v) SDS with a stacking gel of 4% polyacry-

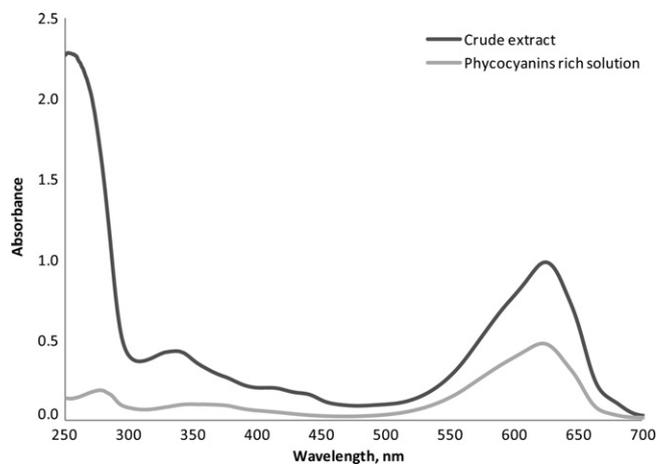


Fig. 2. Absorbance spectra of the crude extract before EBAC and of the phycocyanins-rich solution obtained after EBAC.

lamide. Samples were preincubated with 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 4.5% (v/v) β-mercaptoethanol, 0.025% (w/v) bromophenol blue, and 60 mM Tris-HCl buffer, pH 6.8, for 5 min at 95 °C. Gels were run at room temperature and visualized by staining with 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 40% methanol (v/v) with 7% (v/v) acetic acid for 30 min, and destained in dilute acetic acid. The following proteins were used as molecular mass markers (kDa): phosphorylase b (94.0), albumin (67.0), ovalbumin (43.0), carbonic anhydrase (30.0), trypsin inhibitor (20.0) and α-lactalbumin (14.4).

3. Results

3.1. Extraction step

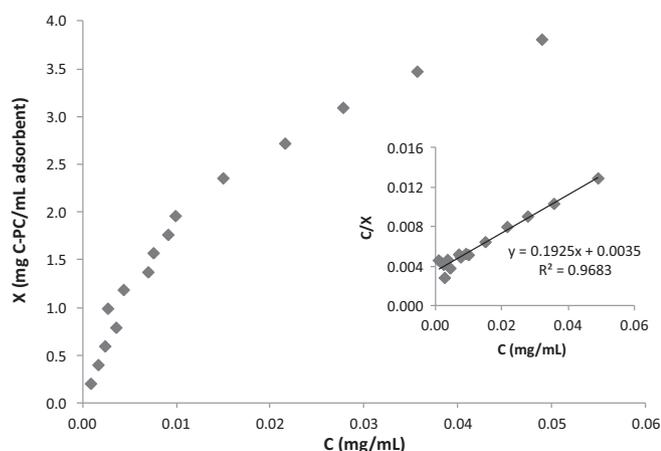
The extraction step was optimized by studying the influence of extractant phase and number of extraction steps. Extraction experiments were carried out by repeated single contact using different water solutions and ultrasound to maximize yield. The results show that the maximum yield was obtained with low ionic strength solutions, while the use of ultrasound did not modify the recovery yield in a large extent (Table 1). Thus, total recovery yields higher than 90% were obtained using distilled water or phosphate buffer with ionic strength below 0.50 M. The lowest recovery yield, 32%, was obtained using acetate buffer (1.00 M, pH=5) whereas for phosphate buffer (1.00 M, pH=7) the recovery yield increased to 60%. Regarding the number of extractions, 82% of total phycocyanins were extracted in the first extraction step in average whereas a second extraction allowed recovering an additional 12%, resulting in a total mean recovery of 94%. The remaining 6% was extracted completely in a third extraction step and no presence of phycocyanins was observed by spectroscopy in the supernatant obtained from a fourth treatment of the sample. The extract thus obtained was centrifuged to produce the PCs crude extract which was utilized in EBA chromatography. The absorption spectrum of this extract (Fig. 2) showed high absorption at 615 nm, corresponding to a mixture of phycocyanins (C-PC and APC). The absorbance at 280 nm was greater than at 615 nm, which indicated the presence of other contaminant proteins with the phycocyanins.

3.2. Expanded bed adsorption chromatography

To determine the equilibrium binding capacities, the equilibrium adsorption isotherm of C-PC on the Streamline-DEAE matrix using phycocyanins crude extract was determined (Fig. 3). Data showed a maximum C-PC equilibrium binding capacity of 5.2 mg/mL calculated considering the linear form of the Langmuir's

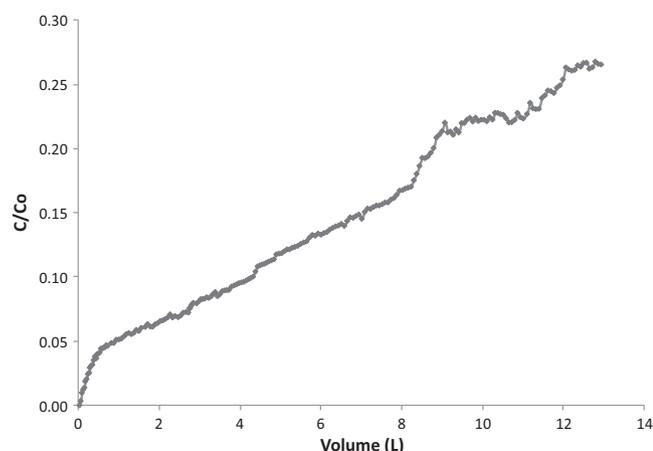
Table 1
Influence of extractant phase and method in the recovery of phycocyanins from *Synechocystis aquatilis* biomass.

	First extraction				Second extraction				Total phycobiliproteins	
	CPC (mg)	APC (mg)	Total (mg)	%	CPC (mg)	APC (mg)	Total (mg)	%	mg	%
Distilled water	55.4	21.0	76.46	85%	5.2	2.6	7.85	9%	84.3	94%
Distilled water + ultrasounds	57.7	17.6	75.31	84%	6.0	5.4	11.43	13%	86.7	96%
Phosphate buffer (0.05 M, pH=7)	45.6	26.1	71.69	80%	7.5	4.7	12.23	14%	83.9	94%
Phosphate buffer (0.10 M, pH=7)	48.6	26.2	74.83	83%	5.1	3.3	8.37	9%	83.2	92%
Phosphate buffer (0.50 M, pH=7)	44.3	26.2	70.51	78%	7.5	4.5	12.04	13%	82.6	92%
Phosphate buffer (1.00 M, pH=7)	26.7	15.8	42.52	47%	6.8	4.3	11.09	12%	53.6	60%
Acetate buffer (1.00 M, pH=5)	14.2	7.0	21.15	24%	5.3	2.4	7.63	8%	28.8	32%

**Fig. 3.** Equilibrium adsorption isotherm of C-PC on Streamline-DEAE determined using phycocyanin crude extract.

equation. In addition, the dynamic binding capacity was measured. For this the breakthrough curve for C-PC using Streamline-DEAE was determined in a 15 mm I.D. column (Fig. 4). The dynamic binding capacity of the bed was determined when the C-PC concentration in the column effluent reached 10% of the initial concentration ($C/C_0 = 0.1$) (Eq. (3)) in order to reduce the loss of target product in flow through [24]. In these conditions the dynamic binding capacity determined was 4.9 mg C-PC/mL Streamline-DEAE adsorbent. This value was only slightly lower to the static value measured of 5.2 mg/mL. The differences were due to the lack of time for solid–liquid phase to reach equilibrium.

Regarding the optimal conditions for expanded bed operation, the influence of the expansion degree of the bed and viscosity of the

**Fig. 4.** Breakthrough curve for C-PC on Streamline-DEAE obtained at small scale (column I.D. 15 mm) using crude extract of phycobiliproteins.**Table 2**
Influence of expansion degree in the flow rate necessary to achieve it and C-PC recovery, using a column I.D. 15 mm and Streamline-DEAE.

H/H_0	Flow rate (mL/min)	C-PC recovery (%)
1.8	7.8	78.8
2.0	9.6	84.6
2.2	10.1	79.2
2.4	12.3	78.0
2.6	14.5	76.1
2.8	16.1	74.5

feedstock in the protein recovery were studied at small scale, using a 15 mm I.D. column. To determine the optimal expansion degree of the bed, experiments were performed using the same sample load (4.9 mg C-PC/mL adsorbent) but modifying the liquid velocity to achieve degrees of expansion from 1.8 to 2.8 (Table 2). The results show that a maximum recovery of 84.6% was achieved when the expanded bed volume was twice the settled bed volume, for which a liquid velocity of 9.6 mL/min was necessary. At expansion degrees from 1.8 and 2.2 the recovery of C-PC is around 79% but above 2.2 the recovery of C-PC drops sharply. The influence of the viscosity of the sample on the behaviour of the system was also analyzed. These experiments were conducted at the optimum expansion degree ($H/H_0 = 2$) and with the same sample load (4.9 mg C-PC/mL adsorbent). The viscosity of the feedstock was modified from 1.157 to 1.020 mP by dilution with buffer (Table 3). All the experiments took place in adequate conditions with the expanded bed column operating close to plug flow and no channelling observed. Results show that the yield of the process was higher when the viscosity of sample decreased with the C-PC recovery increasing from 84 to 91% when the viscosity reduced from 1.157 to 1.020 mP, although the operation time increased from 14 to 56 min and volume of the sample to be applied to the bed increased by three fold.

Once the optimal conditions for expanded bed adsorption have been determined, the next step is to recover the C-PC by elution from the bed. The adsorbed C-PC was eluted using 0.50 M sodium phosphate buffer pH 7.0 in packed bed mode. Operating in these conditions, no particulate material was observed in the eluted fractions. The absorbance of the effluent leaving the column during EBA chromatography is shown in Fig. 5A. The absorbance versus time profile displays a sharp peak, indicating a high elution efficiency. The UV–vis absorption spectrum of the obtained PCs rich solution showed a significant loss of absorption in the near-UV region with

Table 3
Influence of viscosity of the sample in the recovery of C-PC and time necessary to perform the operation, using a column I.D. 15 mm with Streamline-DEAE.

Viscosity (mP)	Volume (mL)	Recovery of C-PC (%)	Time (min)
1.157	60	84.0	14
1.057	120	84.6	29
1.020	180	90.7	41
1.020	240	91.0	56

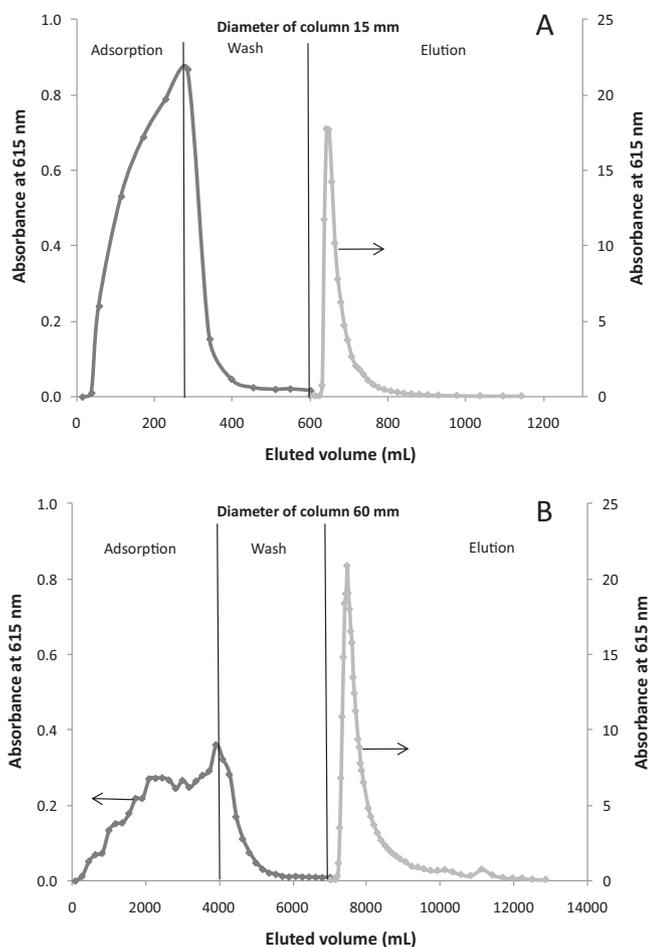


Fig. 5. Absorbance of the column effluent during EBA chromatography. (A) Small scale, column I.D. 15 mm; (B) large scale, column I.D. 60 mm. In the elution step, the absorbance was measured after suitable dilution. Thus, the absorbance values in ordinate axes are the resulting values after multiplication by the dilution factor.

respect to the crude extract spectrum (Fig. 2). In addition, the purity ratio (A_{615}/A_{280}) was about 2.6.

To scale-up the operation of expanded bed adsorption chromatography it is necessary to maintain the form of the breakthrough curve constant, thus the length of the column and the feedstock flow rate must be kept constant on the larger scale. To verify this, experiments with columns of 25 mm, 40 mm, 60 mm and finally 90 mm I.D. were done. All the columns were filled with 15 cm of Streamline-DEAE and operated at expansion degrees equal to 2.0. To achieve this expansion degree, the volumetric feedstock flow rate was increased in proportion to the cross section of the column, thus obtaining a constant feedstock flow rate through the cross section of the column. Data shown as C-PC yield was between 88.0 and 92.7%, regardless of column diameter. Therefore, no influence of column diameter used was observed (Table 4). Fig. 5B shows the chromatographic profile obtained using the 60 mm I.D. column, which is analogous to the obtained using the 15 mm I.D. column (Fig. 5A).

3.3. Purification and identification of C-PC

To obtain pure C-PC concentrates, the fractions recovered from the Streamline-DEAE column (PCs rich solution) were precipitated using ammonium sulfate, resuspended in starting buffer and dialyzed against the same buffer. Finally they were loaded in an anion-exchange chromatography column pre-equilibrated with the starting buffer. To separate pure C-PC by anion-exchange

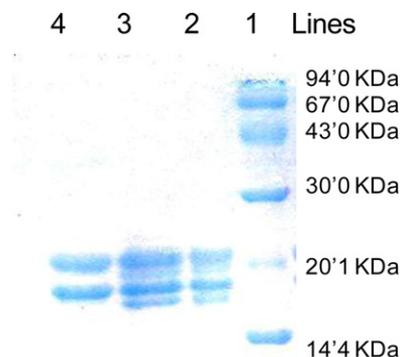


Fig. 6. Image of gel obtained from SDS-PAGE electrophoresis of samples corresponding to different process steps. Line 1, molecular mass markers; Line 2 phycocyanins crude extract; Line 3, phycocyanins rich solution after EBAC; Line 4, pure C-PC after packed bed chromatography.

chromatography, continuous and discontinuous ionic strength gradients were assayed, as well as pH gradients. The pH gradient protocol was not successful (data not shown), only the discontinuous ionic strength gradient experiments allowed obtaining pure C-PC. For this the column was developed with 0.29 M sodium phosphate buffer pH 7.0 using a flow rate of 50 mL/h. The recovery of C-PC after DEAE-cellulose chromatography was 76%, expressed as the percentage of pure C-PC in the final concentrate versus the total C-PC loaded onto the ion-exchange matrix. The C-PC fractions, whose spectroscopic purity ratios (A_{615}/A_{280}) were higher than 4.0, were pooled, lyophilized and stored in the dark at -20°C .

To analyze the evolution of the purity during the overall process, samples obtained in each stage (extraction, expanded bed chromatography and anion-exchange chromatography) were developed by SDS-PAGE electrophoresis (Fig. 6). Data show that unwanted proteins were removed at each successive chromatographic step (lines 2–4). The bands located near 20,100 Da in lines 2 and 3 correspond to the combination α - β -subunits of C-PC and APC, respectively (intense bands) and other bands (less intense) correspond to contaminant proteins. Line 4 shows as α - β -subunits of C-PC are the only two bands remaining after the complete purification process. The purity of this latter concentrate (pure C-PC) was verified by absorption and fluorescence spectra (Fig. 7). The sharp increase in a single peak at 615 nm shows the absorbance maximum of C-PC, whereas the decrease in absorbance at 280 nm indicates the removal of other proteins. There was no absorbance peak or shoulder at 650 nm, indicating no presence of APC on the

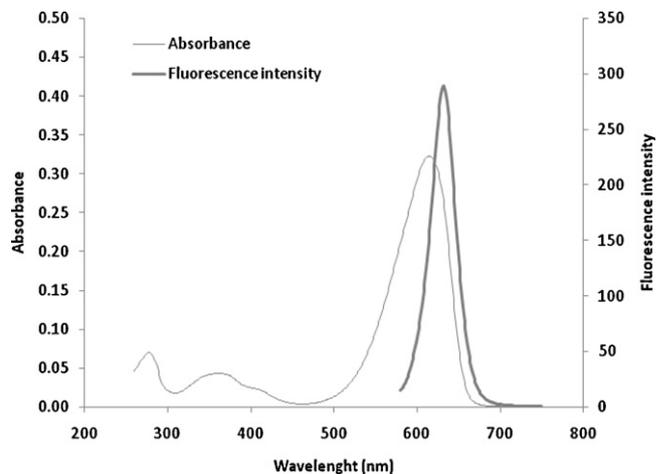


Fig. 7. Absorption and fluorescence spectra of C-PC pure concentrate obtained after the overall process.

Table 4

Summary of data from small to large scale recovery of C-PC by expanded bed adsorption chromatography on 15 cm (settled bed height) Streamline DEAE columns (15–90 mm I.D.) at liquid linear velocity of 3.26 m/h.

Column I.D. (mm)	C-PC loaded (mg)	Sample volume (mL)	Elution peak (SBV)	Elution peak (mL)	Settled volume (mL)	Total time operation (min)	C-PC recovered (mg)	C-PC recovery (%)
15	130	261	20.7	643	31	148	118	90.8
25	361	726	20.8	1545	74	160	335	92.7
40	924	1860	19.2	3620	189	193	809	88.0
60	2078	4184	19.0	7468	395	209	1869	90.0
90	4572	9205	20.0	19748	986	224	4106	89.8

purified sample. Moreover, RP-HPLC was used to test purity of C-PC concentrates, and to obtain concentrates of α and β subunits of C-PC separately. Different gradients of acetonitrile and water were tested. The gradient described in Section 2 was found to give the best baseline separation of C-PC subunits (Fig. 8). The alfa subunit, which carries a single phycocyanobilin chromophore, elutes at 27.9 min and is followed by the beta subunit (31 min), which carries two phycocyanobilin chromophores.

4. Discussion

4.1. Extraction step

The optimization of the extraction step is a key factor to maximize the recovery of any product. The extraction method must be selected considering not only the nature of the product and raw material, but also the next steps downstream, in this case EBAC. Due to the high sensibility of phycobiliproteins, low ionic strength and neutral pH water solutions are recommended as extraction phase [24]. Moreover, the extraction must be performed under smooth stirring due to the soft nature of the raw material. As the results show, total recovery yields over 90% were obtained using distilled water or phosphate buffer with ionic strength below 0.50 M (Table 1). The adverse effect of low pH is also shown. The recovery of C-PC resulted lower at pH 5.0 (32%) than at pH 7.0 (60%) for the same ionic strength (1.00 M). For these reasons, although maximal yield of 96% was obtained using distilled water, the use of pH 7.0 phosphate buffer to stabilize the pH is convenient. Moreover, bearing in mind the next step (EBAC), the most appropriate ionic strength is 50 mM (24). Hence, the 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 was finally selected as optimal. To obtain a high extraction yield, a repeated single contact strategy is necessary. The results showed that using 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 80% of total

phycocyanins were extracted in the first step. A second extraction allows obtaining an additional 14%, yielding a total mean recovery of 94% and an additional third step recovers the remaining 6%. The extract thus obtained is rich in phycobiliproteins but contains other proteins and different compounds also, which is seen in the purity ratio A_{615}/A_{280} of 0.7 (Fig. 2). It is widely known that the aggregation state of phycobiliproteins in solution is strongly affected by pH, ionic strength and protein concentration. The extraction method developed provides suitable conditions for maintenance of the C-PC conformation because at neutral pH, moderate ionic strength and moderated protein concentration, the highest possible aggregation state is the trimer for which the conformation and spectral properties are well maintained [24]. In addition, it should be emphasized that this extraction method is simpler than others requesting ultrasound, mechanical breakage or the addition of chemical compounds (lysozyme, rivanol, acetone, Triton X-100) [17,28]. The extraction method developed here has been selected because of its simplicity and because it renders a solution in optimal conditions to be applied on EBAC.

4.2. Expanded bed adsorption chromatography

The first step to develop an EBAC process is to determine the equilibrium adsorption properties of the product and adsorbent. For this, the equilibrium adsorption isotherm of C-PC on the Streamline-DEAE matrix using the phycocyanins crude extract was determined, obtaining an equilibrium binding capacity of 5.2 mg/mL. In previous studies, the maximum binding capacity determined using either pure C-PC or phycocyanins crude extract from *Spirulina platensis* was 11.7 and 0.8 mg C-PC/mL adsorbent, respectively [24]. For crude extract from *Anabaena marina* a value of 0.9 mg C-PC/mL adsorbent was found [33]. These data demonstrate that the capacity of the adsorbent decreases considerably in the presence of other proteins in the crude extract. Thus, the non-specific binding of negatively charged compounds in the feedstock interferes with the binding of C-PC to the adsorbent, and hence results in a lower capacity. On the other hand, the values obtained for crude extracts obtained from *Synechocystis* were quite different than the obtained for *Spirulina* and *Anabaena*, indicating that the crude extracts from *Synechocystis* have a different composition than those obtained from *Spirulina* and *Anabaena*.

The equilibrium binding capacity determines the maximum amount of product that can be fixed in the adsorbent, although the real or dynamic binding capacity during the operation is lower due to phenomena that reduce the contact time and thus the binding capacity. The dynamic binding capacity can be determined experimentally as the maximum loading volume of unclarified feedstock that can be applied to the column before breakthrough of the target protein takes place. Experimentally the dynamic binding capacity determined was 4.9 mg C-PC/mL Streamline-DEAE adsorbent. This value was slightly lower to the static value measured of 5.2 mg/mL because the time for the solid-liquid phases to reach equilibrium was insufficient. During operation the liquid velocity and the viscosity of the mobile phase influence the dynamic binding capacity.

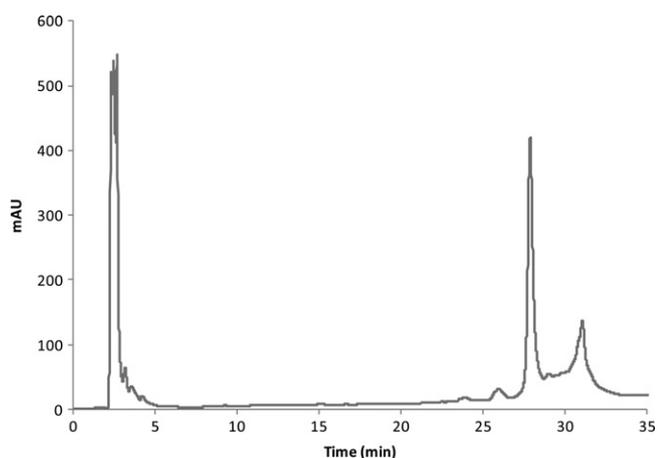


Fig. 8. HPLC separation of C-PC subunits using the gradient described in Section 2. The first peak corresponds to the injection whereas last peaks correspond to C-PC alfa and beta subunits. Signal absorbance (mAU) was monitored at 226 nm.

In addition, the dynamic capacity for C-PC using Streamline-DEAE is low due to the large size of these proteins, which limits the binding of most of the target protein onto the surface of the adsorbent [23,29]. These values are in agreement with other papers where adsorption capacity of the adsorbent is usually lower in the dynamic mode [30].

Once the dynamic capacity of the adsorbent is determined, the two main factors influencing the expanded bed operation (i) the expansion degree of the bed and (ii) the viscosity of the feedstock, must be optimized. Efficient expanded bed operation is achieved when the volume of the expanded bed is between 2 and 3 times the volume of the packed bed material, and the bed is stable. In these conditions the liquid flow through the bed is close to plug flow and the contact efficiency is close to packed bed conditions [31]. In this case, a maximum recovery of 84.6% was achieved when the expanded bed was twice the settled bed volume. To achieve this expansion degree the flow rate needed was 9.6 mL/min, corresponding to a linear liquid velocity through the cross section of the tube of 3.26 m/h. At expansion degrees lower than 2.2 the recovery of C-PC decreases sharply because at liquid flow rates below the optimum the expansion degree is low and the mass transfer resistance becomes a major factor hindering the process, leading to a poor product recovery and performance. On the contrary, at liquid flow rates above the optimum the excessive degree of bed expansion increases the distance between matrix particles and, in spite of the good mass transfer rate, the amount of protein adsorbed on the gel particles is reduced. The optimum value of the expansion degree determined experimentally is the same as in previous references [18,24,32], supporting the idea that an expanded bed operating with double its settled height provides the best results.

The viscosity of the sample is another important factor to be considered in the optimization of expanded bed operations. It is a common situation that the physical properties of the feedstock are unfavourable for effective processing in expanded beds. Such situations may occur when disrupted-cell preparations of high viscosity are pumped without dilution into the EBAC systems causing flow disturbance, unequal distribution of the sample and poor recovery of the target product [22]. Dilution of the feedstock before application to the bed is a possible solution to such problems although the consequent increase in the volume of liquid that needs to be applied to the bed may also reduce the efficiency of the expanded-bed step. The experiments presented here show that the yield increased when the viscosity of sample was decreased, obtaining a 91% recovery of C-PC when the viscosity was reduced to 1.020 mP. To reach this viscosity the sample had to be diluted with buffer, increasing the volume of sample and thus the time necessary to perform the operation. In spite of these disadvantages, the 7% yield increase indicates that dilution of the sample is necessary.

The elution is a key step for an adequate recovery of the C-PC from the bed. Although the elution from Streamline-DEAE can be performed in either expanded or packed bed mode, the latter was previously selected as optimal [24,33]. The experiments showed here display a sharp peak on the absorbance curve (Fig. 5A), which indicates a high elution efficiency. The UV-vis absorption spectrum of the obtained PCs rich solution corresponds to a phycobiliproteins mixture where C-PC predominates with slight APC contamination (Fig. 2). In addition, the purity ratio (A_{615}/A_{280}) was about 2.6, which is four times higher than of the crude extract ($A_{615}/A_{280} = 0.7$), although it does not still meet the purity standard of C-PC. It should be emphasized that the procedure was carried out to prioritize phycocyanin recovery rather than purity, since the procedure is intended to replace the low-resolution steps that normally result in phycobiliproteins losses.

Finally, the operation of expanded bed adsorption chromatography optimized at small scale was scaled-up. The criterion for scale-up of expanded bed adsorption columns is to maintain the

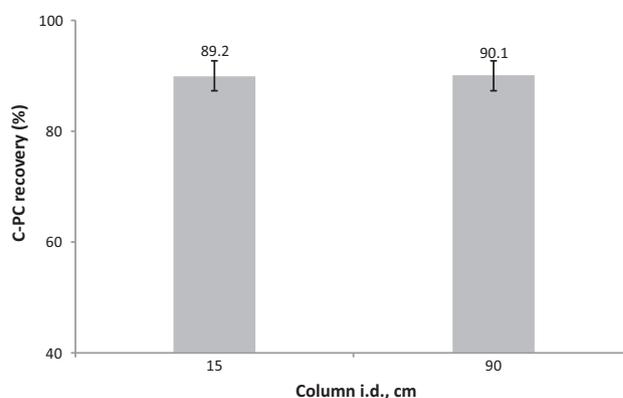


Fig. 9. C-PC recovery and standard deviation obtained using the proposed methodology at the smaller and larger scales tested, defined by column diameter.

form of the breakthrough curve constant. It is a function of the length of the column and the feedstock flow rate, thus both parameters must be kept constant on the larger scale. To verify this, experiments were performed using columns from 25 to 90 mm I.D. The results showed that the criterion for scale-up used was right since no influence of the column diameter on the recovery yield of C-PC was observed (Table 4). Actually, the chromatographic profiles obtained using the 60 mm I.D. column (Fig. 5B) and the 15 mm I.D. column (Fig. 5A) were identical. Moreover, the chromatographic profile of the eluates obtained from the different expanded bed runs performed using different columns was identical, with absorbance ratio values of $A_{615}/A_{280} \approx 2.61$. These results verify the consistency of the scale-up process used and the reproducibility of large scale Streamline-DEAE columns. To demonstrate the accuracy of the proposed methodology, a set of repeated trials were performed using the smaller and larger column utilized. Data, presented as mean values and standard deviation obtained from these experiments, are the same at both scales, with mean values of 89.2 and 90.1% respectively and a standard deviation of 3% (Fig. 9).

4.3. Purification and identification of C-PC

The C-PC concentrates obtained have a purity ratio $A_{615}/A_{280} \approx 2.61$, which is not enough for the requirements of some applications. To achieve higher purity ratios it is necessary to perform a second chromatography step. Thus, in order to obtain pure C-PC the eluate obtained from EBAC was subjected to anion-exchange chromatography in packed bed mode to eliminate A-PC and other colorless proteins (Fig. 6). It was demonstrated that this chromatography step must be performed using ionic strength discontinuous gradients. With this procedure, C-PC concentrates of a purity ratio greater than 4.0 are obtained. The purity of concentrates obtained in each step was verified by SDS-PAGE electrophoresis. It was observed that many of the unwanted proteins from the crude extract (line 2) were removed after EBA chromatography (line 3). Subsequently, after anion-exchange chromatography only two bands with similar intensities (line 4) corresponding to the α - and β -subunits of C-PC were detected. Comparing with the molecular markers, purified C-PC showed two bands corresponding to 17,783 and 20,100 Da respectively. These values agree with those reported earlier [24,34,35]. Regarding the absorption and fluorescence spectra of purified fractions, the absorption spectra of the trimeric and monomeric C-PC forms are only slightly affected by the aggregation changes in the protein. Thus, the absorption and fluorescence spectra from the dialyzed C-PC solutions in Fig. 7 agree with those published for pure C-PC [24,34,35], although it is not possible to recognize the aggregation

Table 5
Recovery and purity of fractions obtained during the proposed process.

Purification step	C-PC recovery on step (%)	Purity ratio A_{615}/A_{280}
Extraction	100	0.70
EBA chromatography	91	2.61
Streamline-DEAE		
Packed bed chromatography	76	>4
cellulose DE-52		
Overall C-PC recovery	69	

state from these spectra. The easiest and most explanatory spectroscopic test to determine the aggregation state of biliproteins is to record the excitation fluorescent steady-state anisotropy spectrum (data not shown). Since energy transfer between chromophores modulates the fluorescent properties of these proteins, a dramatic increase in the anisotropy spectra has been observed when the aggregation state of the biliproteins changes from trimers to monomers [16,24,36], due to the chromophores uncoupling, which altered the pathways for energy transfer between them. The spectra shapes and the quantitative values of the C-PC are similar to those published earlier for trimeric C-PC from *S. platensis* [16,24].

5. Conclusions

In this work a scalable methodology for the efficient recovery and purification of C-PC from the cyanobacteria *S. aquatilis* is demonstrated. The proposed methodology involves an extraction step followed by expanded bed adsorption chromatography using Streamline-DEAE, complemented by conventional chromatography in DEAE-cellulose. The optimal extraction conditions were the use of sodium phosphate buffer 50 mM pH 7.0 in repeated single contact and the optimum number of contact steps was three. The optimal conditions of expanded bed adsorption chromatography were an expansion degree equal to two and the viscosity of crude extract was adjusted to 1.020 mP by dilution. Finally pure C-PC was recovered by conventional chromatography in DEAE-cellulose with ionic strength discontinuous gradient using 0.290 M sodium phosphate buffer pH 7.0. Data show that the C-PC overall recovery measured using the proposed method was 69%, 100% of C-PC recovery by extraction, 91% of recovery for EBAC step and 76% of packed bed chromatography (Table 5). This value is higher than the value obtained previously for C-PC from *S. platensis* involving EBA chromatography [24,25,33]. Moreover the proposed method allows obtaining C-PC solutions in trimeric aggregation state.

It is also demonstrated that expanded bed for C-PC purification can be adequately scaled up from small scale data. The results show that the scale-up of expanded bed chromatography is feasible, making possible to obtain large quantities of C-PC minimizing the product losses. This technology allows maintaining a high protein recovery while reducing both processing cost and time when compared to other conventional processes based on many unit operations (precipitation, centrifugation, dialysis, ion-exchange chromatography, etc.) which result in a unit production cost (fixed capital) 70% higher. The use of expanded bed methodology greatly reduces the need of major equipment and labour, while doubling the recovery yield. Thus, the conjunction of both

factors allows concluding that expanded bed methodology will greatly contribute to reduce the unit cost of producing C-PC as long as adequate optimization and scale-up of the processes are achieved.

Acknowledgements

Financial support from Junta de Andalucía (Spain) (Proyecto de Excelencia P06-TEP-01362) is gratefully acknowledged. A. Ramos thanks the Junta de Andalucía for her grant.

References

- [1] A.N. Glazer, *Methods Enzymol.* 167 (1988) 291.
- [2] A.N. Glazer, *Chemicals from Microalgae*, Taylor and Francis Ltd., UK, 1999, p. 262.
- [3] M.N. Kronick, P.D. Grossman, *Clin. Chem.* 29 (9) (1983) 1582.
- [4] A.N. Glazer, *J. Appl. Phycol.* 6 (2) (1994) 105.
- [5] A.N. Glazer, *Methods Enzymol.* 106 (1984) 359.
- [6] M.H. Chowdhury, K. Ray, K. Aslan, J.R. Lakowicz, C.D. Geddes, *J. Phys. Chem. C* 111 (51) (2007) 18856.
- [7] S. Arad, A. Yaron, *Trends Food Sci. Technol.* 3 (1992) 92.
- [8] M.S. Ayyagari, R. Pande, S. Kamtekar, H. Gao, K.A. Marx, J. Kumar, *Biotechnol. Bioeng.* 45 (2) (1995) 116.
- [9] R. Bermejo, D. Tobaruela, E.M. Talavera, A. Orte, J.M. Alvarez-Pez, *J. Colloid Interface Sci.* 263 (2) (2003) 616.
- [10] D. Ramirez, A. González, N. Merino, R. González, O. Ancheta, C.C. Romay, *Drug Dev. Res.* 48 (2) (1999) 70.
- [11] V. Rimbau, A. Camins, C. Romay, R. González, M. Pallás, *Neurosci. Lett.* 276 (2) (1999) 75.
- [12] S. Benedetti, S. Rinalducci, F. Benvenuti, S. Francogli, S. Pagliarini, L. Giorgi, *J. Chromatogr. B* 833 (1) (2006) 12.
- [13] V.B. Bhat, K.M. Madyastha, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275 (1) (2000) 20.
- [14] V. Rimbau, A. Camins, D. Pubill, F.X. Sureda, C. Romay, R. González, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 364 (2) (2001) 96.
- [15] R. Ficner, K. Lobeck, G. Schmidt, R. Huber, *J. Mol. Biol.* 228 (3) (1992) 935.
- [16] R. Bermejo, E.M. Talavera, J.M. Alvarez-Pez, J.C. Orte, *J. Chromatogr. A* 778 (1–2) (1997) 441.
- [17] R. Bermejo Román, J.M. Álvarez-Pez, F.G. Acien Fernández, E. Molina Grima, *J. Biotechnol.* 93 (1) (2002) 73.
- [18] R. Bermejo, F.G. Acien, M.J. Ibáñez, J.M. Fernández, E. Molina, J.M. Alvarez-Pez, *J. Chromatogr. B* 790 (1–2) (2003) 317.
- [19] S. Boussiba, A.E. Richmond, *Arch. Microbiol.* 120 (2) (1979) 155.
- [20] A. Herrera, S. Boussiba, V. Napoleone, A. Hohlberg, *J. Appl. Phycol.* 1 (4) (1989) 325.
- [21] S.T. Silveira, L.K. De Menezes, C.A.V. Burkert, S.J. Kalil, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 31 (5) (2008) 477.
- [22] H.A. Chase, *Trends Biotechnol.* 12 (8) (1994) 296.
- [23] R.H. Clemmitt, H.A. Chase, *Biotechnol. Bioeng.* 67 (2) (2000) 206.
- [24] R. Bermejo, M.A. Felipe, E.M. Talavera, J.M. Alvarez-Pez, *Chromatographia* 63 (1–2) (2006) 59.
- [25] J. Niu, G. Wang, X. Lin, B. Zhou, *J. Chromatogr. B* 850 (1–2) (2007) 267.
- [26] H. Siegelman, J.H. Kycia, *Algal Biliproteins*, Cambridge University Press, London, 1978, p. 71.
- [27] U.K. Laemmli, *Nature* 277 (1970) 680.
- [28] L. Campanella, G. Crescentini, P. Avino, L. Angiello, *Ann. Chim.* 90 (3–4) (2000) 153.
- [29] M.Y.T. Ng, W.S. Tan, N. Abdullah, T.C. Ling, B.T. Tey, *J. Chromatogr. A* 1172 (1) (2007) 47.
- [30] R. Rosano, N. Húngaro, A. D'Ambrosio, G.M. Luzzi, P. Riccio, *J. Biotechnol.* 101 (2003) 289.
- [31] A.K. Barnfield, R. Hjorth, A. Hammarstrom, *Biotechnol. Bioeng.* 44 (8) (1994) 922.
- [32] H.A. Chase, N.M. Draeger, *Sep. Sci. Technol.* 27 (14) (1992) 2021.
- [33] A. Ramos, F.G. Acien, J.M. Fernández-Sevilla, C.V. González, R. Bermejo, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85 (2010) 783.
- [34] M. Duerring, G.B. Schmidt, R. Huber, *J. Mol. Biol.* 217 (3) (1991) 577.
- [35] M.C. Santiago-Santos, T. Ponce-Noyola, R. Olvera-Ramírez, J. Ortega-López, R.O. Cañizares-Villanueva, *Process Biochem.* 39 (12) (2004) 2047.
- [36] M. Mimuro, R. Rumbeli, P. Füglistaller, H. Zuber, *BBA Bioenergetics* 851 (3) (1986) 447.