

## **Obtención de biliproteínas de interés biotecnológico industrial mediante cromatografía de adsorción en lecho expandido**

Manuel A. Felipe y Ruperto Bermejo

*Programa de Doctorado “Metodología y Técnicas de Investigación en Química Física y Analítica”. Departamento de Química Física y Analítica. Universidad de Jaén. Escuela Universitaria Politécnica (E.U.P.) de Linares, C/ Alfonso X El Sabio 28, 23700, Linares (Jaén).*  
[rbermejo@ujaen.es](mailto:rbermejo@ujaen.es)

### **Resumen**

C-ficocianina y aloficocianina (ficocianinas) son biliproteínas que se encuentran formado parte de la microalga *Spirulina platensis*. Debido a su alta eficiencia fluorescente y a su único e intenso color azul, estas proteínas se utilizan como marcadores fluorescentes y reactivos químicos, y poseen un gran potencial de utilización como colorantes naturales en las industrias de alimentación y cosmética. Las metodologías convencionales de purificación de ficocianinas constan de múltiples etapas y operaciones. Cada una de estas etapas afecta al proceso de recuperación global, así como a la economía del mismo, aumentando los costes de operación y el tiempo de procesado, y disminuyendo el rendimiento. En este trabajo, se presenta una nueva metodología preparativa y escalable, para la obtención de ficocianinas, basada en las ventajosas propiedades de la cromatografía de adsorción en lecho expandido (CALE).

Inicialmente las biliproteínas, se liberan del interior celular mediante choque osmótico y son capturadas por aplicación directa de la suspensión celular (extracto crudo de ficocianinas), en una columna de lecho expandido, rellena con un intercambiador aniónico (Streamline-DEAE) y equilibrada con tampón de fosfato 50 mM, pH 7.0. Después de la etapa de adsorción, la columna se lava en formato expandido, eliminando el material particulado y las moléculas no adsorbidas en el relleno. Posteriormente, se procede a la etapa de elución en formato empaquetado de las ficocianinas adsorbidas. Con esta nueva metodología el rendimiento medio de la etapa de CALE se estima alrededor de un 74 % de las ficocianinas contenidas en la biomasa de partida. El seguimiento del proceso, se ha realizado mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y análisis espectroscópico.

### **INTRODUCCIÓN**

Las biliproteínas son macromoléculas con grupos prostéticos tetrapirrólicos (bilinas) enlazados a la cadena de la apoproteína. Estas proteínas forman complejos captadores de luz (ficobilisomas) y actúan como pigmentos fotosintéticos accesorios en microalgas (Glazer, 1988, *Methods Enzymol.* 167:291-303). Las biliproteínas se pueden clasificar, atendiendo a sus características espectroscópicas, en tres grupos principales: ficocianinas, ficoeritrinas y aloficocianinas (Glazer, 1999, *En Cohen, Z. (Ed.) Taylor and Francis Ltd. UK.* 262-280). La principal aplicación de las biliproteínas es su utilización como marcadores fluorescentes de células y macromoléculas en investigación biomédica y técnicas fluorescentes altamente sensibles (Glazer and Stryer, 1984, *Trends Biochem. Sci.* 9:423-427). También han mostrado poseer valor terapéutico debido a su actividad inmunomoduladora y

anticarcinogénica (Iijima and Shimamatsu, *US patent*. Ref:1150-726-A82679). Además, estas macromoléculas pueden utilizarse como colorantes naturales en las industrias de alimentación y cosmética, reemplazando a los colorantes sintéticos (Arad and Yaron, 1992, *Trends Food Sci. Technol.* 3: 92-97).

Las metodologías convencionales para la purificación de biliproteínas, constan de múltiples operaciones unitarias, y cada etapa afecta a la economía del proceso y produce la correspondiente disminución del rendimiento de recuperación global. Estos esquemas convencionales, obtienen extractos de biliproteínas mediante la combinación de diferentes procesos no escalables. De esta forma, se han venido utilizando dos etapas principales: una primera, consistente en el pretratamiento de la muestra para liberar el material intracelular y una segunda que consiste en la utilización de cromatografía convencional para obtener las biliproteínas. Los pretratamientos consisten en la ruptura de la pared celular utilizando diferentes métodos: ultrasonidos, ruptura mecánica, extracción con acetona o tratamiento con lisozima, rivanol y tritón X-100 (Bermejo et al., 2001, *J. Chromatogr. A* 917:135-145). Después de la ruptura celular todos los métodos siguen con operaciones de precipitación, centrifugación y diálisis de las muestras para obtener un extracto crudo preparado para la siguiente etapa. Esta segunda etapa, involucra uno o más pasos cromatográficos convencionales basados en cromatografía de exclusión, intercambio iónico, adsorción, etc (Bermejo et al., 1997, *J. Chromatogr. A* 778:441-450).

La cromatografía de adsorción en lecho expandido (CALE) es una técnica alternativa de bioseparación, que reduce el número de operaciones en los procesos de purificación de proteínas, basándose en la adsorción de las mismas en una matriz, que captura las macromoléculas procedentes de un extracto de partida, sin necesidad de que éste precise de tratamientos previos complicados (Chase, 1994, *Trends Biotechnol.* 12:296-303). Esta metodología permite la concentración del producto deseado en una única operación con alto rendimiento y en un escaso intervalo de tiempo.

En este artículo, se ha desarrollado una nueva metodología basada en CALE, para la obtención de las ficocianinas (C-ficocianina y aloficocianina) procedentes de la microalga *Spirulina platensis*. En una primera etapa, se ha optimizado la extracción de las proteínas procedentes de la biomasa y a continuación las ficocianinas han sido recuperadas mediante CALE utilizando Streamline-DEAE. Se obtiene así una disolución concentrada que constituye un extracto rico en ficocianinas. Las etapas del proceso se han seguido mediante electroforesis (SDS-PAGE) y análisis espectroscópico. La principal ventaja de esta nueva metodología es la simplificación del proceso, reducción de la pérdida de producto e incremento en el rendimiento. Además, se reduce el tiempo de operación y el coste económico, si se compara con anteriores metodologías, y el nuevo proceso es fácilmente escalable pudiendo ser utilizado para la purificación a escala industrial de ficocianinas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Biomasa y productos químicos.** La microalga *Spirulina platensis* se cultiva en la costa tropical granadina y ha sido suministrada por la empresa IMADE S.L. (Granada, España). La biomasa fue recolectada de las piscinas de cultivo y crecimiento, mediante centrifugación y almacenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Así, la biomasa congelada es el material de partida del proceso. El cambiador iónico Streamline-DEAE y los reactivos necesarios para electroforesis han sido suministrados por Pharmacia (Uppsala, Sweden). Los patrones de peso molecular, las membranas y

pinzas de diálisis, así como el resto de reactivos han sido suministrados por Sigma (St. Louis, MO, USA). Para la determinación de las isothermas de adsorción se ha utilizado C-ficocianina previamente purificada por nuestro grupo de investigación utilizando otra metodología (Bermejo et al., 1997, *J. Chromatogr. A* 778:441-450).

**Métodos espectroscópicos.** Los espectros y medidas de absorbancia han sido obtenidos utilizando un espectrofotómetro ultravioleta visible Perkin-Elmer Lambda-20 (Beaconsfield, UK) equipado con células de 1 cm de camino óptico. Todas las medidas se han realizando a temperatura ambiente y las cantidades de ficocianinas en los diferentes extractos, se han calculado midiendo las absorbancias a 615, 652 y 730 nm y utilizando las ecuaciones que corrigen los solapamientos espectrales:

$$\text{C-ficocianina (mg mL}^{-1}\text{)} = [A_{615 \text{ nm}} - A_{730 \text{ nm}} - 0.47 (A_{652 \text{ nm}} - A_{730 \text{ nm}})] / 5.34$$

$$\text{Aloficocianina (mg mL}^{-1}\text{)} = [A_{652 \text{ nm}} - A_{730 \text{ nm}} - 0.208 (A_{615 \text{ nm}} - A_{730 \text{ nm}})] / 5.09$$

**Extracción de proteínas.** El método para la obtención de ficocianinas consta de dos etapas (Fig. 1). En la primera de ellas, la ruptura celular se ha realizado utilizando diferentes condiciones: choque osmótico usando tampón acetato 1 M pH 5 y tampón fosfato 1 M pH 7, choque osmótico con agua destilada, congelación-descongelación, ultrasonidos y tratamiento con lisozima. Los mejores resultados fueron obtenidos por choque osmótico con tampón acetato, usando una relación tampón/biomasa de 1 (v/p) y homogeneizando la mezcla mediante agitación a velocidad constante durante 20 minutos con un motor Heidolph RZR1 (Schwabach, Germany). El homogeneizado resultante se transfiere a tubos de centrifuga y se centrifuga a 5000 rpm durante 10 minutos. El procedimiento se repite dos veces más con los residuos y los sobrenadantes procedentes de las tres centrifugaciones, se reúnen y dializan frente a tampón fosfato 50 mM pH 7, obteniendo una disolución (extracto rico de ficocianinas) que se almacena a 4 °C para su utilización en la siguiente etapa de CALE.

**Obtención de ficocianinas.** Inicialmente, los parámetros de adsorción sobre la matriz cromatográfica Streamline-DEAE, fueron obtenidos utilizando C-ficocianina pura y extracto crudo de ficocianinas. Se usaron tubos de 15 mL conteniendo C-ficocianina pura (ensayando entre 0 y 9 mg proteína/mL adsorbente) y diluciones del extracto crudo de ficocianinas (ensayando entre 0 y 0.75 mg proteína/mL adsorbente), en 5 mL de tampón fosfato 50 mM pH 7. Los tubos se colocaron en un baño termostático con agitación a 26 °C y se les adicionó 1 mL de Streamline-DEAE. Después de esperar 24 horas para el equilibrio, el contenido se analizó y la concentración proteica de equilibrio en el sobrenadante, se determinó espectroscópicamente calculando la cantidad de ficocianina enlazada por mL de matriz cromatográfica, mediante balance de masa.

Para las experiencias de CALE, se utilizaron dos columnas diferentes: una de 2.5 x 50 cm (conteniendo 74 mL de Streamline-DEAE) y otra de 1.5 x 50 cm (conteniendo 27 mL de Streamline-DEAE). Ambas fueron equilibradas utilizando tampón fosfato 50 mM pH 7 utilizando una bomba peristáltica Heidolph PD-5001 para regular el caudal. En las experiencias con la columna de 2.5 cm, se utilizó siempre un mismo volumen de muestra (190 mL) pero con diferente relación proteína/mL adsorbente (0.8-1.7 mg/mL). El grado de expansión se mantuvo constante e igual al doble de la altura de lecho sedimentado ( $H/H_0 = 2$ ). En un típico experimento, 190 mL de extracto rico en ficocianinas se bombean en sentido ascendente a través de la columna con un caudal de 203 cm h<sup>-1</sup> y se procede al lavado con el tampón de equilibrio hasta que la absorbancia a 615 nm es

inapreciable. Para los experimentos con la columna de 1.5 cm, se utilizó un mismo volumen de 100 mL con una relación proteína/mL adsorbente constante e igual a 1.3. En este caso se ensayaron diferentes grados de expansión ( $H/H_0 = 1.8-2.8$ ) utilizando para ello diferentes caudales ( $200-407 \text{ cm h}^{-1}$ ).

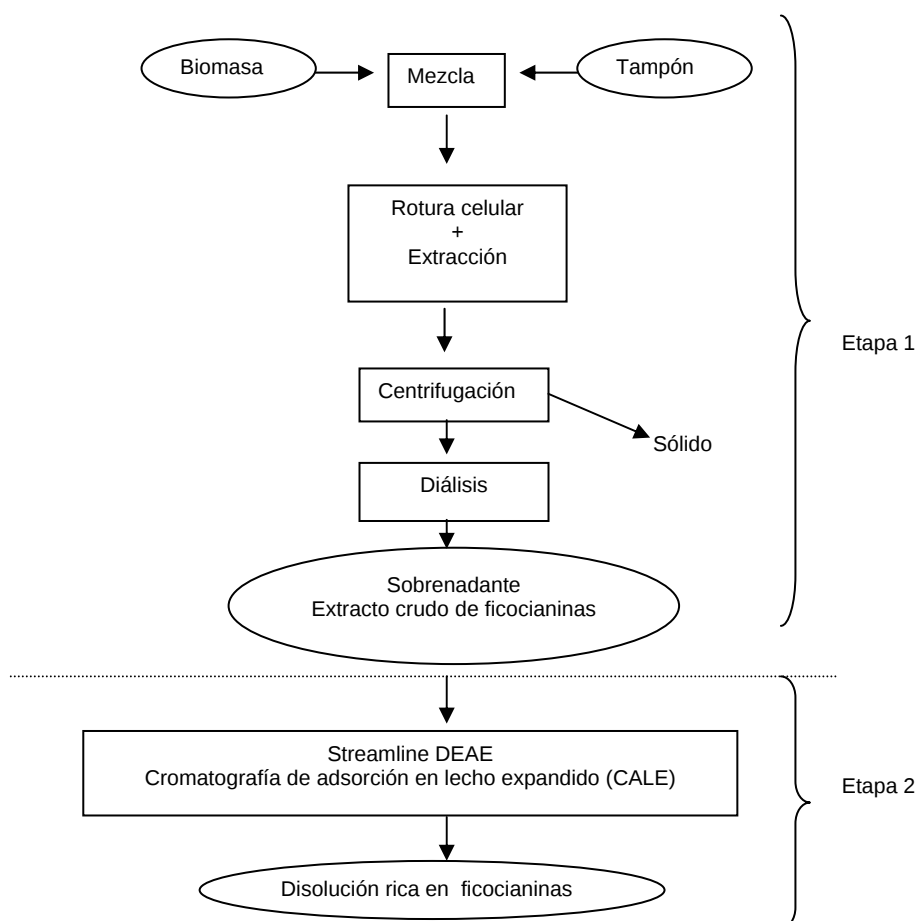


Figura 1.- Diagrama esquemático del proceso de obtención de ficocianinas.

Después del lavado de la columna en formato expandido, el flujo se corta y se deja que el lecho sedimente en ambas columnas. Entonces, las ficocianinas adsorbidas son eluidas utilizando tampón fosfato 500 mM pH 7, con un caudal de  $86 \text{ cm h}^{-1}$ . Se recogen fracciones de 16 mL con un colector Redifrac (Pharmacia Biotech). Las ficocianinas se cuantifican midiendo las absorbancias a 615 y 652 nm y las fracciones con color azul se reúnen constituyendo un extracto rico en ficocianinas. A continuación se desarrolla el protocolo de limpieza de la columna: tres volúmenes de columna de NaOH 0.05 M, 1 M NaCl, tres volúmenes de agua destilada, tres volúmenes de acético (25%) y tres volúmenes de agua destilada. La columna queda de esta forma preparada para otro nuevo experimento de CALE (Fig. 2).

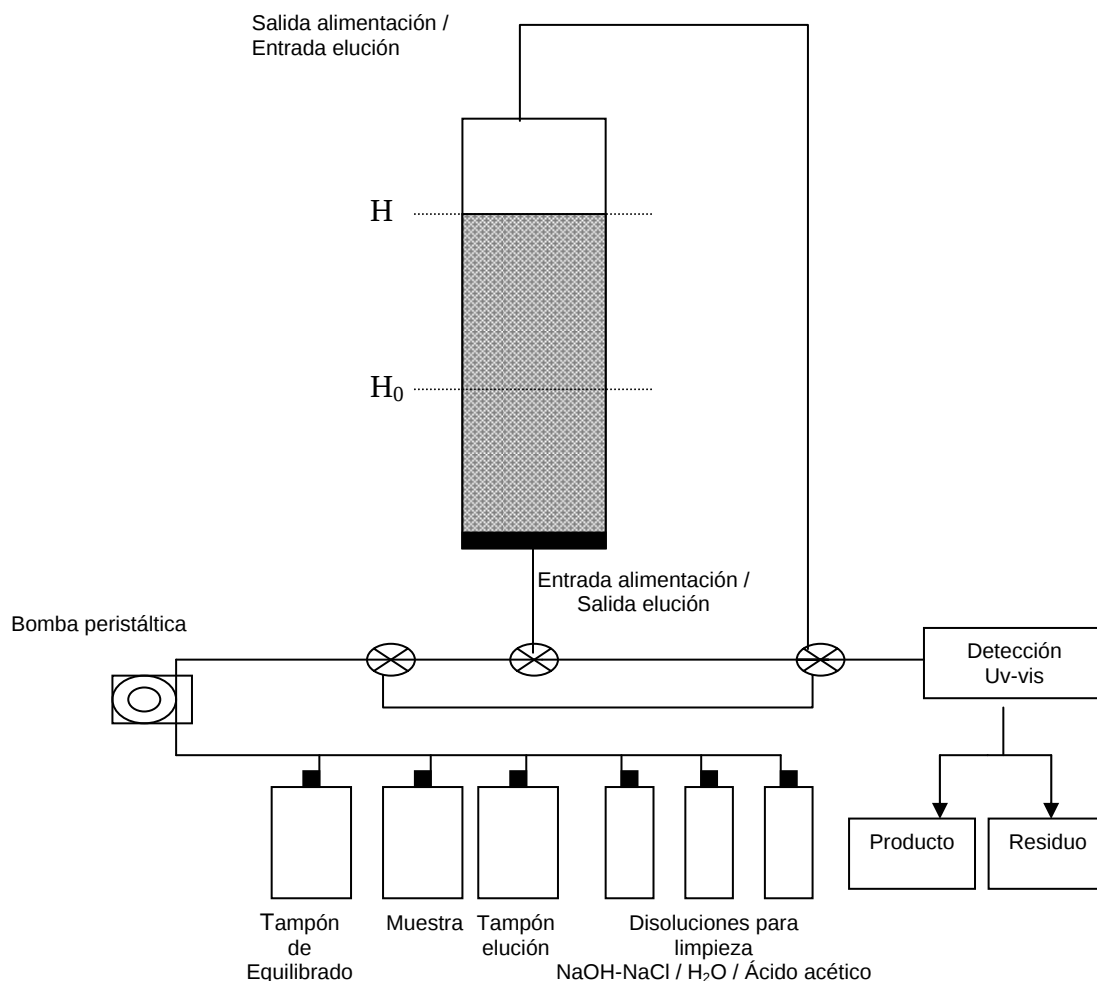


Figura 2.- Diagrama esquemático de las etapas del proceso de CALE.

**Electroforesis (SDS-PAGE).** Los ensayos de electroforesis se han realizado en un equipo de electroforesis vertical Miniprotean III de Bio-Rad (Milan, Italy), utilizando el método de Laemmli (Laemmli, 1970, *Nature* 277:680-686). Se utiliza un gel separador de un 12.5% de entrecruzamiento y un espesor de 0.75 mm, compuesto por 0.1 % (p/v) SDS y un gel apilador de un 4 % de entrecruzamiento. Las muestras se preincuban con 2% SDS (p/v), 10% (v/v) glicerol, 4.5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.025% (p/v) azul de bromofenol y tampón 60 mM Tris-HCl, pH 6.8, durante 5 minutos a 95 °C. Los geles se desarrollan a temperatura ambiente y se tiñen para su visualización con 0.1 % (p/v) azul de comassie R-250, 40 % (v/v) metanol y 7 % acético (v/v) durante 30 minutos y se destiñen en una disolución diluida de ácido acético. Los patrones de peso molecular utilizados han sido (en Kda): fosforilasa b (94.0), albúmina (67.0), ovoalbúmina (43.0), anhidrasa carbónica (30.0), tripsina inhibidora (20.0) y  $\alpha$ -lactoalbúmina (14.4).

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

**Extracción de proteínas.** La influencia de los métodos de ruptura celular en la recuperación de ficocianinas, se ha estudiado cuantificando el rendimiento de

recuperación proteica bajo diferentes condiciones. Los mejores resultados han sido obtenidos con tampón acetato 1 M, pH 5. El proceso de extracción se ha repetido tres veces para una recuperación exhaustiva de ficocianinas, de tal forma que en el sobrenadante de un cuarto proceso de centrifugación no se mide absorbancia representativa de las mismas. Así se puede estimar que el rendimiento de recuperación proteica en estos tratamientos previos es de alrededor del 100 %. Es bien conocido que la extracción a alta fuerza iónica libera los ficobilisomas intactos y permite por tanto la mejor recuperación de las biliproteínas presentes (Glazer, 1976, *Photochem. Photobiol. Rev.* 1:71-115). El sobrenadante así obtenido constituye un extracto crudo de ficocianinas listo para ser utilizado en CALE. El espectro de absorción de este extracto muestra máximos que corresponden a una mezcla de C-ficocianina y aloficocianina con otras proteínas contaminantes (Figura 3).

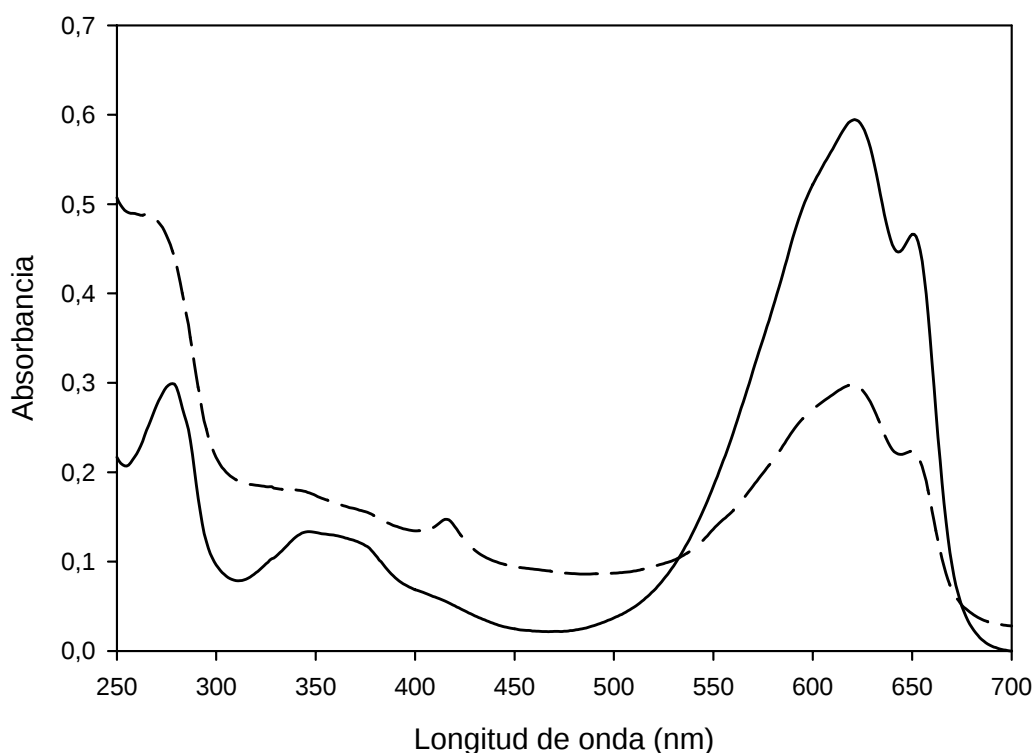


Figura 3.- Espectros de absorción uv-visible del extracto crudo procedente de los tratamientos previos (-----) y de la disolución rica en ficocianinas procedente de CALE ( — ).

**Cromatografía de adsorción (CALE).** Se han determinado las isotermas de adsorción tanto de C-ficocianina pura como del extracto crudo de ficocianinas sobre la matriz cromatográfica Streamline-DEAE y los resultados obtenidos se ajustan muy bien al modelo de Langmuir. Los parámetros de la isoterma implican una capacidad de enlace en el equilibrio de 11.7 y 0.8 mg C-ficocianina/mL adsorbente para C-ficocianina y el extracto crudo de ficocianinas respectivamente. Los datos indican que la capacidad del adsorbente disminuye considerablemente cuando existen proteínas contaminantes en el medio, como es el caso del extracto crudo.

Asimismo, ensayos preliminares utilizando Streamline-DEAE, indican que la

mayoría de las proteínas contaminantes eluyen utilizando tampón fosfato 50 mM pH 7 y por ello se utiliza como tampón de equilibrado el mismo. La transformación del lecho sedimentado en un lecho expandido estable, se consigue bombeando en sentido ascendente a través de la columna un determinado caudal de fase móvil hasta conseguir el grado de expansión deseado. Se han utilizado columnas con diferente diámetro interno (1.5 y 2.5 cm). La Figura 4 muestra el comportamiento hidrodinámico de ambas columnas.

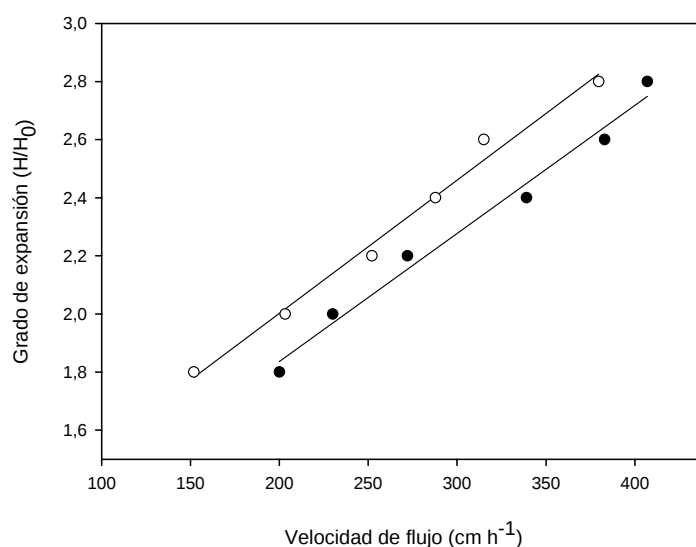


Figura 4.- Comportamiento hidrodinámico de las columnas de CALE. (o) Columna de 50 x 2.5 cm y (●) columna de 50 x 1.5 cm.

*CALE en columna de 2.5 x 50 cm.* La aplicación de disoluciones de extracto crudo sin diluir, provoca lechos expandidos inestables, turbulencia y formación de canales preferentes en los mismos, debido a la viscosidad de la muestra (Chase, 1994, *Trends Biotechnol.* 12:296-303). Por esto, se ha estudiado la influencia de la viscosidad de la muestra en el comportamiento del sistema cromatográfico, ensayando diferentes muestras con distinta carga proteica. En todos los experimentos se bombearon 190 mL de extracto crudo de ficocianinas con relación proteína/mL adsorbente comprendida entre 0.8-1.7, basándonos en los datos obtenidos con las isoterms y sabiendo que la capacidad dinámica de adsorción es muy superior a la determinada de forma estática (Güzeltunc and Ulgen, 2001, *J. Chromatogr. A* 914:67-76). En estas experiencias, se ha utilizado un grado de expansión igual a 2 que ha generado buenos resultados en sistemas similares. Como se puede observar en la Figura 4, para obtener un grado de expansión adecuado es necesario utilizar un caudal de 203 cm h<sup>-1</sup>. Los datos que se muestran en la Tabla 1, indican que el rendimiento de recuperación proteica, tiene un valor máximo de una relación proteína/adsorbente igual a 1.3. Cuando la relación es inferior o superior a este valor el rendimiento decrece. Es claro que la disminución en la difusión provocada por el aumento de la viscosidad debe afectar a la adsorción de las moléculas sobre la matriz cromatográfica, mientras que una excesiva dilución de la muestra produce también disminución en el rendimiento.

*Tabla 1. Influencia de la carga proteica en el % de recuperación de ficocianinas tras elución en CALE. Volumen de muestra cargado = 190 mL. Columna = 50 × 2.5 cm,  $H/H_0 = 2$  y velocidad de flujo = 203 cm h<sup>-1</sup>.*

| Ficocianinas cargadas<br>(mg) | C-PC/adsorbent ratio<br>(mg / mL) | % recuperación<br>ficocianinas |
|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| 231                           | 1.7                               | 76.5                           |
| 178                           | 1.3                               | 87.5                           |
| 137                           | 1.0                               | 85                             |
| 110                           | 0.8                               | 81                             |

Las ficocianinas adsorbidas se eluyen utilizando tampón fosfato 500 mM pH 7 en formato empaquetado que resultó ser el más efectivo ya que generaba una muestra 4 veces más concentrada que si la elución se realizaba en formato expandido. El espectro de absorción de la disolución procedente de la elución muestra máximos de absorbancia y relaciones entre ellos típicos de una mezcla de C-ficocianina y aloficocianina (Figura 3). El rendimiento de recuperación se calculó como el porcentaje total de la cantidad de proteína cargada presente en el eluido tras CALE. En el método aquí descrito, se necesitan aproximadamente 3 horas para completar la etapa de CALE: equilibrado (30 min) + carga de la muestra (12 min) + lavado de la columna (120 min) + elución (20 min) (Figura 5).

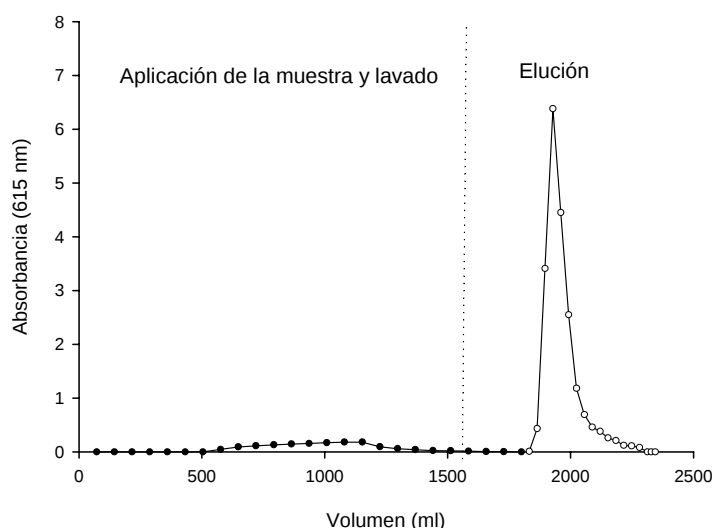


Figura 5.- Absorbancia a 615 nm del efluente de la columna de CALE. Volumen de muestra = 190 mL de extracto crudo de ficocianinas (1.3 mg CPC/mL adsorbente). Velocidad de flujo en la aplicación = 203 cm h<sup>-1</sup>, velocidad de flujo en la elución = 86 cm h<sup>-1</sup>. En la etapa de elución la absorbancia se midió tras la conveniente dilución de las muestras por lo que los valores representados en ordenadas resultan de multiplicar la absorbancia por el correspondiente factor de dilución.

CALE en columna de 1.5 × 50 cm. El efecto de la geometría de la columna sobre el proceso de recuperación proteico, se ha ensayado utilizando una columna

de 1.5 cm de diámetro interno. En estos experimentos se cargaron siempre 100 mL de muestra (1.3 mg C-ficocianina/mL adsorbente) utilizando diferente grado de expansión ( $H/H_0 = 1.8-2.8$ ) y por tanto diferentes caudales (200-407  $\text{cm h}^{-1}$ ) (ver Fig. 4). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2, donde se aprecia que el valor óptimo es de 2.2 para el grado de expansión, pues es el que genera mayor rendimiento de recuperación proteico. El rendimiento disminuye cuando aumenta el grado de expansión, debido a la mayor distancia entre las partículas de relleno cromatográfico que provocan una disminución de la adsorción de las proteínas de interés. Estos resultados indican que el proceso podría ser fácilmente escalado incrementando el diámetro de columna y conservando constantes variables tales como la carga proteica y el grado de expansión. Es importante resaltar que el rendimiento medio del proceso de purificación desarrollado es del 74 %, valor muy superior al obtenido previamente por otros autores (Hilditch et al., 1991, *Phytochem.* 30:3515-3517).

Los resultados obtenidos mediante electroforesis corroboran los obtenidos mediante análisis espectroscópico, indicando que la mayor parte de proteínas contaminantes presentes en el extracto crudo procedente de los tratamientos previos son eliminadas tras el proceso de CALE.

Por tanto, la nueva metodología desarrollada basada en CALE utilizando Streamline-DEAE, es válida para la obtención de ficocianinas procedentes de *Spirulina platensis*, precisando de una etapa inicial de pretratamiento sencilla y económica. Este procedimiento simplifica el proceso de obtención proteica, reduce el tiempo de procesamiento necesario y el consumo de productos e instrumentación, incrementando el rendimiento total de recuperación.

Tabla 2. Influencia del grado de expansión en la recuperación de ficocianinas tras elución en CALE. En todos los experimentos se utilizó un volumen de muestra de 100 mL y una relación mg C-ficocianina/mL adsorbente = 1.3 en columna de  $50 \times 1.5$  cm.

| $H/H_0$ | Velocidad de flujo<br>( $\text{cm h}^{-1}$ ) | % Recuperación<br>ficocianinas |
|---------|----------------------------------------------|--------------------------------|
| 1.8     | 200                                          | 55.5                           |
| 2.0     | 230                                          | 73.4                           |
| 2.2     | 272                                          | 74.2                           |
| 2.4     | 339                                          | 71.7                           |
| 2.6     | 383                                          | 70.1                           |
| 2.8     | 407                                          | 76.0                           |

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración prestada y el suministro de microalga *Spirulina platensis* como materia prima, a la empresa IMADE S.L.