

PROCESO PARA LA PURIFICACION DEL COLORANTE PROTEICO B-FICOERITRINA PRODUCIDO POR *PORPHYRIDIDIUM CRUENTUM*

PROCESS TO PURIFY THE COLORED PROTEIN B-PHYCOERYTHRIN PRODUCED BY *PORPHYRIDIDIUM CRUENTUM*

T. Hernández-Míreles, J. Benavides y M. Rito-Palomares *

Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Centro de Biotecnología, Departamento de Biotecnología e Ingeniería de Alimentos, Ave. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Monterrey, NL 64849, México.

Recibido 30 Noviembre 2005; Aceptado 19 Junio 2006

Resumen

Se presenta el desarrollo de un proceso simplificado para la purificación de B-ficoeritrina (BFE) producida por *Porphyrididium cruentum* explotando el uso de sistemas de dos fases acuosas (SDFA) y precipitación isoelectrica. La evaluación del efecto de dos métodos de ruptura celular sobre la liberación de las proteínas intracelulares de *P. cruentum*, demostró que sonicación fue superior a maceración manual debido a que se obtuvo un incremento de cinco veces en la concentración de BFE liberada. Se realizó la evaluación del comportamiento de BFE en SDFA con poli-etilen-glicol (PEG)-sulfato, PEG-fosfato y PEG-dextrano para determinar bajo que condiciones BFE y los contaminantes se podrían concentrar en fases opuestas. El SDFA con PEG de peso molecular 1000 g/mol y fosfato permitió, después de precipitación isoelectrica a pH 4.0, la recuperación de BFE purificada (definida como una relación de absorbancias a 545 y 280nm mayor a 4.0) con un valor comercial de \$50 dólares/mg. La etapa de extracción de SDFA seleccionada (29.5% p/p de PEG1000, de 9.0% p/p de fosfato, relación de volumen de las fases (Vr) igual a uno y pH de 7.0,) conteniendo una concentración de extracto crudo (generado por precipitación) equivalente al 40% p/p del sistema de extracción, permitió recuperar BFE con un rendimiento del 72% y una pureza de 4.1±0.2. La pureza de BFE del extracto original se incrementó 5.9 veces después de la precipitación isoelectrica y SDFA. Los resultados de este estudio demuestran los beneficios de la aplicación práctica de la precipitación isoelectrica en conjunto con los SDFA para el desarrollo de un proceso que permita la purificación de BFE producida por *Porphyrididium cruentum*.

Palabras clave: sistemas de dos fases acuosas, B-ficoeritrina, Porphyrididium cruentum, recuperación de proteínas.

Abstract

A simplified process for B-phycoerythrin (BPE) purification from *Porphyrididium cruentum* exploiting aqueous two-phase systems (ATPS) and isoelectric precipitation was developed. The effect of two different methods of cell disruption upon the release of the intracellular proteins produced by *P. cruentum* was evaluated. Cell disruption by sonication proved to be superior over manual maceration since a five time increase in the concentration of BPE released was achieved. The evaluation of partition behaviour of BPE in poly-ethylene-glycol (PEG)-sulphate, PEG-dextran and PEG-phosphate ATPS was carried out to determine under which conditions the BPE and contaminants concentrated to opposite phases. ATPS formed with PEG of molecular weight of 1000 g/mol and phosphate proved to be suitable, after isoelectric precipitation at pH 4.0 for the recovery of highly purified BPE (defined as the absorbance ratio of A_{545nm} to A_{280nm} greater than 4.0) with a potential commercial value of \$50 USD/mg. An ATPS extraction stage comprising PEG1000 29.5% w/w, phosphate 9.0% w/w, volume ratio (Vr) equal to 1.0, system pH of 7.0, loaded with BPE extract generated by precipitation (equivalent to the 40% w/w of the total extraction system), allowed BPE recovery with a purity of 4.1±0.2 and an overall product yield of 72% (w/w). The purity of BPE from the crude extract increased 5.9 fold after isoelectric precipitation and ATPS. The results reported herein demonstrated the benefits of the practical application of isoelectric precipitation together with ATPS for the development of a process to purify BPE produced by *Porphyrididium cruentum*.

Keywords: aqueous two-phase systems, B-phycoerythrin, Porphyrididium cruentum, protein recovery.

*Autor para correspondencia: E-mail: mrito@itesm.mx
Tel: (52) 8183284132, Fax: (52) 8183284136

1. Introducción

La creciente importancia comercial de colorantes de origen microbiano para ser utilizados en la industria de alimentos, cosméticos, detergente y de genética molecular, ha despertado un enorme interés de las compañías biotecnológicas por el desarrollo de procesos eficientes y de fácil escalamiento para llevar al mercado estos productos (Arad y Yaron, 1992; Ayyagari y col., 1995; Bermejo y col., 2002, Qiu y col., 2004). El reducido número de protocolos reportados para la recuperación primaria de colorantes proteicos intracelulares involucran; la liberación del producto de interés mediante métodos mecánicos y posterior recolección por centrifugación. La suspensión resultante es fraccionada para purificar el colorante proteico mediante un excesivo número de operaciones unitarias. El protocolo completo en la mayoría de los casos es complicado por las multi-etapas cromatográficas necesarias para obtener la proteína de interés con los niveles de pureza necesarios. La necesidad de multi-etapas que demandan los protocolos convencionales comúnmente resulta en bajos rendimientos y altos costos de procesos (Ranjitha y Kaushik, 2005). Consecuentemente, el escalamiento potencial de este tipo de procedimientos es percibido negativamente desde el punto de vista económico. Para minimizar las desventajas atribuidas a los protocolos de purificación establecidos para colorantes proteicos, se ha propuesto la reducción de etapas cromatográficas (Liu y col., 2005) y el uso de técnicas de recuperación alternativas, tales como sistemas de dos fases acuosas (SDFA) (Benavides y Rito-Palomares, 2005). En este contexto, B-ficoeritrina (BFE), un colorante proteico presente en la naturaleza (cianobacterias, algas eucariotas, etc.) (Koller y col., 1977; Ritter y col., 1999), representa un caso de estudio muy atractivo. La BFE esta formada por tres subunidades α , β , y γ (en una relación molar de 6:6:1) de peso

molecular igual a 18,000, 18,000 y 29,000 g/mol, respectivamente (Benavides y Rito-Palomares, 2004). El punto isoeléctrico de BFE se ha reportado alrededor de 4.2 – 4.4 (Koller y col., 1977). El valor comercial de BFE altamente pura (definida como una relación de absorbancias a 545 y 280nm mayor a 4.0) ha sido reportado en \$50 dólares/mg (Martek Corporation, 2005; Haugland, 1996). Este elevado valor comercial justifica los intentos previos (Bermejo y col. 2002, 2003) por desarrollar procesos eficientes para la recuperación y purificación de BFE.

SDFA ha sido sugerido como una alternativa atractiva para minimizar o eliminar algunas de las desventajas atribuidas a los protocolos de purificación de BFE establecidos. La técnica de SDFA ha demostrado tener un enorme potencial para la recuperación y purificación de compuestos biológicos (Rito-Palomares, 2004; Rito-Palomares y col., 2000^a; Rito-Palomares y Lyddiatt, 2000; He y col., 2005). La recuperación y purificación parcial de BFE producida por *Porphyridium cruentum* utilizando SDFA ha sido reportada anteriormente (Benavides y Rito-Palomares, 2004). Sin embargo, el proceso potencial propuesto no permitió obtener BFE de alta pureza (pureza mayor a 4.0) y resultó en BFE parcialmente purificada (pureza igual a 2.9).

En este trabajo, se evaluó el beneficio del uso de métodos de ruptura celular para la liberación de BFE. Se examina el uso potencial de SDFA con PEG-sulfato, PEG-dextrano y PEG-fosfato para el desarrollo de etapas de extracción que permitan el incremento en la pureza de BFE. Adicionalmente, se evaluó el uso de una etapa de precipitación isoeléctrica después de ruptura celular para aumentar la pureza de BFE proveniente del extracto crudo y aumentar la eficiencia de las etapas de extracción subsecuentes utilizando SDFA. La precipitación isoeléctrica en conjunto con SDFA fueron explotadas a fin de establecer

un proceso de separación simple para obtener BFE pura (pureza mayor a 4.0) a partir de extracto celular de *Porphyridium cruentum*.

2. Materiales y métodos

2.1. Cultivo y ruptura celular de *Porphyridium cruentum*

El cultivo de *Porphyridium cruentum* se realizó utilizando el medio de cultivo previamente definido por Bermejo (Bermejo y col., 2002). Brevemente, el medio de cultivo estaba compuesto por nitrato de sodio (170 mg/L), fosfato monobásico de sodio (13.8 mg/L), EDTA (9.9 mg/L), citrato de hierro (4.5 mg/L), principalmente. El alga se creció en un cultivo en lote (en matraces Erlenmeyer de 1000 mL) a 22-25°C, bajo condiciones de luz natural, se proporcionó agitación y aireación con un flujo de aire de 3.2 cm³/seg., utilizando una bomba peristáltica (ELITE 799, México). El crecimiento de las células se mantuvo por 30 días y posteriormente fueron recuperadas por centrifugación (Eppendorf 5415C) a 3500 rpm por 5 minutos. Después de la recuperación de las células, se realizó la ruptura celular utilizando dos métodos diferentes (maceración manual o sonicación) a fin de establecer cual de los dos métodos permitía obtener la mejor concentración de BFE liberada en el extracto crudo resultante. La ruptura celular por maceración manual se realizó utilizando un mortero bajo condiciones de refrigeración utilizando un baño de hielo seco. Biomasa húmeda, perlas de vidrio y agua de-ionizada (4 cm³/g biomasa húmeda) se adicionaron al mortero y se maceraron por 10 minutos/g biomasa húmeda. La ruptura celular por sonicación se realizó en un tubo de vidrio de 50 cm³ y diámetro 2.2 cm, utilizando un sonicador (Branson 1510). Biomasa húmeda y agua de-ionizada (4 cm³/g biomasa húmeda) se agregó al tubo de vidrio y el tiempo de sonicación fue de 10 minutos/g de biomasa

húmeda. Durante la sonicación, el contenido del tubo fue constantemente mezclado a fin de evitar la sedimentación de la biomasa en la parte inferior del tubo. En ambos métodos, la ruptura celular se verificó utilizando un microscopio óptico (Olympus CK2). El extracto obtenido como resultado de la ruptura celular de la biomasa de *Porphyridium cruentum* se identificó en este trabajo como extracto crudo de BFE e incluye los fragmentos celulares generados.

2.2. Experimentos con sistemas de dos fases acuosas

Los experimentos con sistemas de dos fases acuosas se prepararon por conveniencia utilizando una base másica fija. A fin de lograr la formación de los sistemas de dos fases, se mezclaron las cantidades necesarias de las soluciones; de poli-etileno-glicol (PEG, Sigma Chemicals) de peso molecular nominal de 1000 y 1450 g/mol, de dextrano (peso molecular nominal de 40,000, 70,000 y 500,000 g/mol, Sigma Chemicals), o bien de sulfato de sodio o fosfato de potasio (reactivos grado analíticos obtenidos de Productos Químicos Monterrey, México) con extracto crudo de BFE (conteniendo 20% (peso húmedo/volumen) de suspensión proveniente de la ruptura celular de *Porphyridium cruentum*). Los experimentos se realizaron utilizando tubos de centrifuga de 2 mL, lo que permitió tener sistemas experimentales de 1.5 g de peso final. En los sistemas PEG/sulfato y PEG/fosfato, la composición (expresada en % peso/peso) del polímero y las sales fue de 18% /11% y 29.5% /9%, respectivamente. En el caso de los sistemas PEG/dextrano, las composiciones se ajustaron a un rango de 10-14% para el PEG y 11-13% para el dextrano. Las soluciones (PEG, dextrano, sulfato de sodio o fosfato de potasio y extracto crudo de BFE) se agitaron por 10 minutos para lograr la mezcla total de los compuestos. Cuando fue necesario se ajustó el pH a 7.0 mediante

la adición de ácido ortofosfórico o hidróxido de sodio. Una vez que se logró la disolución total de los compuestos, la separación de las fases se logró mediante centrifugación a 1500 x g por 10 minutos. Los volúmenes de las fases superior e inferior fueron estimados por observación visual utilizando tubos graduados. Posteriormente se estimó la relación de volumen de las fases (V_r , definida como el volumen de la fase superior dividido por el volumen de la fase inferior). A fin de realizar los análisis necesarios, se extrajeron muestras de las fases. La recuperación proteica de la fase superior se estimó como la cantidad de BFE presente en la fase (volumen de la fase x concentración de BFE en la fase) y se expresó relativa a la cantidad original de BFE alimentada al SDFA. La recuperación proteica de la fase inferior no fue estimada debido a que la cantidad de BFE en dicha fase no fue detectable.

Adicionalmente se realizaron experimentos con SDFA utilizando extracto crudo de BFE obtenido por precipitación isoelectrica. En este caso la precipitación isoelectrica aplicada al extracto crudo de BFE obtenido de la ruptura celular de *Porphyridium cruentum* siguiendo el protocolo descrito por Zaman y col. (1999). Se colocaron muestras de 1.0 mL de extracto crudo de BFE en tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad y se acidificaron utilizando ácido clorhídrico (HCl; 0.1 M) para obtener pH finales en un rango de 1.5 a 6.5. Cada tubo se agitó inmediatamente, posteriormente se dejó precipitar la muestra por espacio de 15 minutos. El precipitado fue recuperado por centrifugación (a 4°C, 15 000 rpm por 20 minutos) y resuspendido utilizando buffer de fosfato (20 mM, pH 7.0). Muestras del precipitado y sobrenadante fueron analizadas para estimar la concentración y la pureza de BFE. El precipitado resuspendido que presentó la máxima pureza, se utilizó para preparar SDFA como se describió anteriormente. Los resultados reportados en este trabajo representan el promedio de tres

experimentos independientes y el error estándar fue estimado en un máximo de $\pm 10\%$.

2.3. Procedimientos analíticos

La concentración de proteína total de las muestras se estimó utilizando el método de Bradford (1976). La pureza de BFE se determinó como la relación entre las absorbancias a 545 y 280nm (pureza de BFE = $Abs_{545nm} / Abs_{280nm}$). Bermejo y col., (2002) reportaron el uso de la relación de las absorbancias a 545 y 280nm como una estimación de la pureza de BFE, debido a que el espectro de absorción de esta proteína exhibe un pico a 545nm. Bajo estas circunstancias una relación de estas absorbancias superior a 4.0 corresponde a BFE de alta pureza (defina como BFE comercialmente pura; Sigma). La concentración de BFE y las proteínas intracelulares adicionales, R-ficocianina (RFC) y aloficocianina (AFC), producida por *Porphyridium cruentum* se estimó mediante el uso de las absorbancias a 565, 620 y 650nm obtenidas y los sistemas de ecuación previamente reportados (Bermejo y col., 2002; Bennet y Bogorad, 1973). El fundamento de estas Ecs. se basa en el coeficiente de extinción constante que estas ficobiliproteínas (RFC, AFC y BFE) presentan en longitudes de onda de 565, 620 y 650, al encontrarse dentro de un rango de densidad óptica (OD) de 0.05-1.0 (Bennet y Bogorad 1973). Para las lecturas de absorbancia, se utilizó un espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible (Beckman DU650, Beckman Instruments) con celdas de cuarzo (Micro Cell 8mm; Beckman Instruments). Adicionalmente, se utilizaron muestras del extracto crudo, de las etapas de precipitación, de los SDFA y de un estandar comercial de BFE (Sigma Chemicals) para realizar geles de poliacrilamida utilizando la técnica de electroforesis descrita por Laemmli (1970).

3. Resultados y discusión

3.1. Estudios de ruptura celular

A fin de mejorar la etapa de ruptura celular, aumentando el porcentaje de liberación de BFE intracelular, en esta presente investigación, se realizó una comparación directa entre la ruptura celular por sonicación y por maceración manual (Tabla 1). Es claro que el método de ruptura celular por sonicación demostró ser superior para la liberación de los colorantes proteicos de *Porphyridium cruentum*. En particular, la concentración del producto de interés (BFE) liberado por sonicación, fue 5.5 mayor que la concentración obtenida utilizando maceración

manual (se obtuvo una concentración de 220 mg/L de BFE por sonicación y de 40 mg/L por maceración manual; Tabla 1). Zhu y col., (2005) reportaron que los colorantes proteicos intracelulares que se encuentran en el interior de los cloroplastos de las algas se encuentran unidos a la membrana tilacoidal. Aparentemente, las fuerzas constantes y uniformes generadas por sonicación fueron más efectivas que la naturaleza irregular de las fuerzas generadas por maceración manual, para liberar los pigmentos intracelulares de la membrana tilacoidal, como consecuencia se logró una mayor concentración de los productos intracelulares liberados.

Tabla 1. Efecto de los métodos de ruptura celular sobre la liberación de B-ficoeritrina, aloficocianina y R-ficocianina intracelular producidas por *Porphyridium cruentum*.

Concentración de proteína intracelular liberada (mg/L)			
Método de ruptura celular	R-ficocianina	Aloficocianina	B-ficoeritrina
Maceración manual	20.0 ± 2.0	40.0 ± 3.5	40.0 ± 3.0
Sonicación	50.0 ± 4.0	130 ± 10.0	220 ± 20.0

Las concentraciones de las tres principales ficobiliproteínas intracelulares producidas por *Porphyridium cruentum*; R-ficocianina (RFC), aloficocianina (AFC) y B-ficoeritrina (BFE), liberadas son expresadas relativas al método de ruptura celular utilizado. Las concentraciones de RFC, AFC y BFE fueron estimadas como se describió en la sección de Materiales y métodos.

Es interesante resaltar que con los métodos de ruptura celular seleccionados, se obtuvieron patrones diferentes de la relación de BFE liberada con respecto a las otros dos colorantes proteicos (aloficocianina (AFC) y R-ficocianina (RFC)) presentes en el interior de las células de *Porphyridium cruentum* (Arad y Yaron, 1992). El uso de ruptura celular por sonicación dio como resultado un extracto crudo que presentó una mayor liberación de BFE con respecto a AFC y RFC en comparación con el extracto crudo obtenido por maceración manual. Es factible que las cavitaciones generadas por sonicación propicien la liberación de BFE (que encuentra en la parte final de las estructuras cilíndricas) mas fácilmente que los otros dos colorantes (AFC y RFC) (Swanson y Glazer,

1990). En contraste, el método de ruptura celular por maceración manual genera un alto impacto mecánico en la membrana principalmente, donde no se encuentra presente BFE. Como resultado, la cantidad de BFE liberada por sonicación con respecto a la liberada de AFC y RFC es mayor que la obtenida por maceración manual. Es importante observar que la pureza de BFE obtenida por ambos métodos de ruptura celular fue la misma (igual a 0.7; pureza de BFE = $Abs_{545nm} / Abs_{280nm}$). Lo cual implica que aun cuando los métodos dieron lugar a diferentes patrones de liberación de los colorantes intracelulares, la relación entre BFE y otras proteínas liberadas fue similar. Sin embargo la alta concentración de BFE liberada por sonicación permite eliminar la

etapa de precipitación con sulfato de amonio requerida para usar SDFA (Benavides y Rito-Palomares, 2004). Como consecuencia, sonicación se seleccionó como el método de ruptura celular para obtener extracto crudo de BFE para las subsecuentes etapas experimentales.

3.2. Recuperación de *B-ficoeritrina* (BFE) producida por *Porphyridium cruentum* en sistemas de dos fases acuosas (SDFA)

Para el diseño de un proceso particular de extracción con SDFA, con base en la experiencia o limitaciones de proceso se selecciona el tipo de polímero y sal a utilizar. Sin embargo, la concentración de polímero y sal, la relación de volumen de las fases y otras condiciones de proceso, necesitan ser definidas experimentalmente. Con el fin de evaluar el comportamiento de BFE en SDFA y beneficiar la etapa de extracción mediante un posible incremento en el porcentaje de recuperación y pureza, se seleccionaron SDFA cuya fase inferior estuviera compuesta por una sal (sulfato o fosfato) o dextrano. Las condiciones experimentales de los SDFA seleccionados fueron establecidas con base en reportes previos (Rito-Palomares y col., 2000b, 2001). Es claro que el uso de SDFA con sulfato no favoreció el incremento de la pureza o el porcentaje de recuperación de BFE de la fase superior (Tabla 2). Por el contrario, la pureza inicial del extracto crudo utilizado disminuyó ligeramente de 0.7 a 0.6 después de utilizar SDFA PEG1450- sulfato, como resultado el factor de purificación fue inferior a uno (0.86). Lo anterior puede ser explicado, como en el caso de *c-ficocianina* producida por *Spirulina maxima* en SDFA con sulfato (Rito-Palomares y col., 2001), por la contaminación de la interfase de los sistemas. Es posible que la acumulación de BFE y fragmentos celulares en la interfase o

la posible precipitación proteica sea la causa del bajo porcentaje de recuperación de BFE de la fase superior (21% en Tabla 2). En contraste, el uso de SDFA con fosfato a las condiciones óptimas (Benavides y Rito-Palomares, 2004), presentó un incremento de 0.7 a 1.8 en la pureza de BFE del extracto crudo. Como resultado se obtuvo un incremento de 2.6 veces en la pureza de BFE y un 90% de rendimiento (Tabla 2), resultados que están acordes con los publicados por Benavides y Rito-Palomares (2004). Sin embargo, a pesar de estos incrementos aun no se logró obtener BFE con una pureza superior a 4.0. Consecuentemente, se seleccionaron SDFA que utilizan dextrano como fase inferior a fin de buscar un incremento adicional en la pureza de BFE proveniente del extracto crudo. En general, el uso de SDFA con PEG y dextrano para el desarrollo de procesos de extracción para la recuperación de productos biológicos se encuentra limitado por razones económicas. La aplicación de SDFA PEG-dextrano se ha concentrado principalmente en la recuperación de productos de alto valor (por ejemplo, el cultivo de células de hibridomas (Zijlstra y col., 1996), adenovirus y retrovirus (Brass y col., 2000)) en los cuales el costo del dextrano utilizado en la etapa de extracción es justificado con base en el alto precio del producto final. El valor comercial de BFE altamente purificada (\$50 dólares/mg; Market Corporation, 2005) puede potencialmente justificar el uso de estos SDFA. El uso de SDFA PEG-dextrano dio como resultado un aumento en la pureza del extracto crudo inicial (Tabla 2). En particular, con el uso de SDFA PEG1450-dextrano500 se logró un aumento de 3 veces en la pureza de BFE (de 0.7 a 2.1; Tabla 2) y un rendimiento proteico del 70%. Sin embargo, a pesar de diversos intentos posteriores no se logró un aumento superior a 2.1 en la pureza de BFE.

Tabla 2. Pureza y recuperación de B-ficoeritrina (BFE) de la fase superior de sistemas de dos fases acuosas (SDFA).

Sistema	Pureza de B-ficoeritrina	Recuperación de B-ficoeritrina de la fase superior (%)	Factor de purificación
PEG-sal			
PEG1450-sulfato	0.60 ± 0.01	21 ± 0.5	0.86
PEG1000-fosfato	1.8 ± 0.01	91 ± 4.0	2.6
PEG-dextrano			
PEG1450-dextrano 40	0.9 ± 0.09	32 ± 3.0	1.3
PEG1450-dextrano 70	1.2 ± 0.10	27 ± 2.0	1.7
PEG1450-dextrano 500	2.1 ± 0.20	70 ± 3.0	3.0

Los sistemas compuestos por PEG1450 (18% p/p)-sulfato (11.0% p/p) y PEG1000 (29% p/p)-fosfato (9% p/p) con una relación de volumen de las fases igual a uno fueron seleccionados para evaluar la pureza y la recuperación de B-ficoeritrina en sistemas PEG-sal. Para los sistemas PEG-dextrano, el uso de 40, 70 y 50 representan el peso molecular del dextrano; 40,000, 70,000 y 500,000 g/mol. Las características de estos sistemas fueron tales que permitieran obtener un V_r cercano a uno. El pH fue de 7.0 y la concentración del extracto crudo en los SDFA represento el 40% p/p del total del sistema. La recuperación de B-ficoeritrina (BFE) de la fase superior se expresa relativa a la cantidad inicial de BFE alimentada en los SDFA. La pureza de BFE es definida como la relación de las absorbancias a 545 y 280 nm (pureza de BFE igual a A_{545nm} / A_{280nm}) y el factor de purificación es la pureza de BFE de los SDFA dividida por la pureza del extracto crudo (igual a 0.7). Los datos indican el error estándar.

3.3. Recuperación de B-ficoeritrina (BFE) producida por *Porphyridium cruentum* con precipitación isoeléctrica y sistemas de dos fases acuosas (SDFA)

Diferentes estrategias de bioingeniería pueden ser adoptadas, a fin de optimizar un proceso determinado de recuperación y purificación. Para el caso de la recuperación de BFE, a fin de obtener un producto con un nivel de pureza elevado, se consideraron dos enfoques prácticos. El primer enfoque involucró el procesamiento adicional de la fase superior rica en PEG que contiene BFE parcialmente purificada para obtener una pureza superior a 4.0. Un enfoque adicional consideró el procesamiento del extracto crudo de BFE obtenido de la etapa de ruptura celular antes de la etapa de extracción con SDFA. Considerando el éxito obtenido con el procesamiento del colorante proteico c-ficocianina producido por *Spirulina maxima* (Rito-Palomares y col., 2001), se decidió procesar la fase superior rica en PEG mediante una etapa de ultrafiltración a fin de eliminar el PEG y proteínas contaminantes.

Sin embargo, después de diversos intentos no se obtuvo un incremento en la pureza de BFE, debido probablemente al tamaño molecular similar de la proteína de interés y los contaminantes. Como consecuencia, se evaluó la estrategia de procesar el extracto crudo resultante de la etapa de ruptura celular con el objetivo de incrementar la pureza y concentración de BFE. De las distintas técnicas utilizadas comúnmente en las etapas iniciales de un proceso de recuperación y purificación para la concentración y purificación parcial de proteínas, en esta investigación se seleccionó la precipitación isoeléctrica para procesar el extracto crudo de BFE. La precipitación isoeléctrica, es una técnica bien establecida, y resulta atractiva porque es fácilmente adaptable a gran escala, utiliza equipo relativamente simple y puede ser utilizada con un riesgo muy bajo de dañar la estabilidad de los productos biológicos (Glatz, 1990).

Los resultados de la precipitación isoeléctrica de BFE (Fig. 1), muestran que la máxima pureza de la proteína de interés (1.8) se obtuvo a un pH de 4.0 (cercano al punto

isoeléctrico de BFE; 4.2 – 4.4 (Koller y col., 1977). Esto representa un aumento de 2.6 en la pureza del extracto crudo proveniente de la etapa de ruptura celular. A pesar de que el sobrenadante de la precipitación isoeléctrica fue examinado, la pureza de BFE no se incrementó con respecto a la del extracto crudo inicial. Por lo tanto el precipitado obtenido a un pH de 4.0 se seleccionó para ser procesado por SDFA. Los SDFA PEG1450-dextrano500 y PEG1000-fosfato fueron seleccionados con base en los resultados de este trabajo y reportes previos de nuestro grupo de investigación (Benavides y Rito-Palomares, 2005), respectivamente. Es claro que los resultados de pureza de BFE obtenidos con SDFA PEG-fosfato fueron superiores a los obtenidos por SDFA PEG-dextrano después de la etapa de precipitación isoeléctrica (Tabla 3).

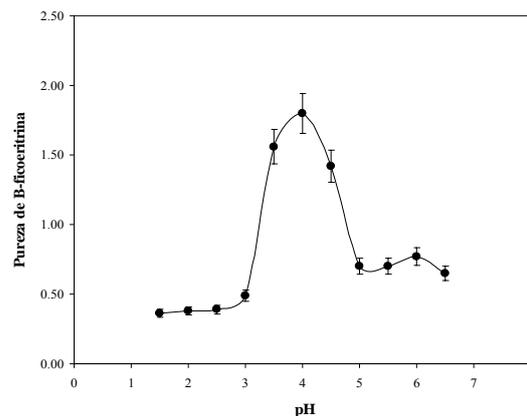


Fig. 1. Pureza de B-ficoeritrina (BFE) producida por *Porphyridium cruentum* proveniente del precipitado isoeléctrico.

La pureza de B-ficoeritrina (BFE) del precipitado isoeléctrico (producido como se describió en Materiales y métodos) es expresada relativa al pH utilizado. La pureza de BFE es definida como la relación de las absorbancias a 545 y 280 nm (pureza de BFE igual a A_{545nm} / A_{280nm})

Tabla 3. Pureza y recuperación de la fase superior de B-ficoeritrina en sistemas de dos fases acuosas alimentados con extracto crudo de *Porphyridium cruentum* obtenido por precipitación isoeléctrica

Sistema	Pureza de B-ficoeritrina	Recuperación de B-ficoeritrina de la fase superior (%)	Factor de purificación
PEG1000-fosfato	4.1 ± 0.2	95 ± 3.0	5.9
	3.7 ± 0.2	88 ± 2.0	5.3
PEG1450-dextrano 500	1.8 ± 0.1	95 ± 2.0	2.6
	2.1 ± 0.2	92 ± 2.0	3.0

Los sistemas utilizados representan composiciones (expresadas en peso/peso) de PEG1000 (29.5%)-fosfato (9%) y PEG1450 (10%)-dextrano (13%). Para todos los sistemas, el pH y la concentración de extracto crudo de B-ficoeritrina (BFE) en los SDFA se mantuvo constante a 7.0 y 40% p/p, respectivamente. La relación de volumen de las fases Vr para todo los SDFA se mantuvo constante y cercano a uno. La recuperación de BFE de la fase superior se expresa relativa a la cantidad inicial de BFE alimentada en los SDFA. La pureza de BFE es definida como la relación de las absorbancias a 545 y 280 nm (pureza de BFE igual a A_{545nm} / A_{280nm}) y el factor de purificación es la pureza de BFE de los SDFA dividida por la pureza del extracto crudo proveniente de ruptura celular (pureza igual a 0.7). Los datos indican el error estándar.

Para el caso de los SDFA con PEG y dextrano, a pesar de que se obtuvo un alto porcentaje de recuperación de BFE (92-95% en Tabla 3), no se logró un beneficio considerable en la pureza de la proteína. La pureza de BFE obtenida de los SDFA PEG-dextrano después de la etapa de precipitación isoeléctrica se mantuvo constante (1.8 – 2.1) con respecto a la obtenido sin precipitación

isoeléctrica (ver Tabla 2). En contraste, las extracciones con SDFA PEG-fosfato permitieron un incremento en la pureza de BFE de 5.3 - 5.9 veces con respecto a la pureza del extracto crudo proveniente de ruptura celular. En particular el uso del SDFA compuesto por 29.5% p/p de PEG1000, 9.0% p/p de fosfato, con una relación de volumen de las fase de 1.0, pH

7.0 y alimentado con precipitado de BFE (equivalente al 40% p/p del sistema total), permitió recuperar en esta etapa de extracción 95% de BFE altamente purificada (pureza superior a 4.0). Aparentemente, la adición de la etapa de precipitación dio como resultados la eliminación de contaminantes proteicos adicionales (aumentando la pureza del extracto crudo), lo que permitió un mejor desempeño de la etapa de extracción con SDFA PEG-fosfato. El tratamiento adicional de las muestras provenientes del extracto crudo y de las etapas del proceso con la técnica de electroforesis (Fig. 2), sugiere que el uso de precipitación y SDFA con fosfato permitió la remoción de las proteínas contaminantes presentes en el extracto crudo (representadas por las bandas identificadas con azul de coomasie). Se identifica de manera cualitativa una banda alrededor de los 18 KDa (18,000 g/mol) que por comparación directa con el estándar, corresponde a las subunidades α y β de la BFE. La banda correspondiente a los 29 KDa no se observa en la BFE purificada por el método aquí propuesto (Fig. 2). Lo anterior puede deberse a que la proporción de la subunidad γ (banda a los 29 KDa) con respecto a las subunidades α y β (bandas a los 18 KDa) es mucho menor (1 a 6) en la estructura completa de la BFE. Como consecuencia es posible suponer que la importancia de la subunidad γ de la BFE en la pureza y funcionalidad de la proteína es mínima. En el caso del estándar de BFE se observa una banda alrededor de 37 KDa, esta banda puede ser resultado de la formación de un dímero $\alpha\beta$ resultado del procedimiento de preparación de las muestras para la técnica de electroforesis (Laemmli, 1970). Por otro lado, en el caso de los SDFA PEG-dextrano es posible suponer que se alcanzó la máxima capacidad del sistema de acumular BFE en la fase superior.

Es importante considerar que el mecanismo que gobierna la partición de BFE en SDFA PEG-dextrano no está definido y

estudios adicionales son necesarios para extender el conocimiento sobre este fenómeno. Sin embargo, considerando que se obtuvo el objetivo general de recuperar y purificar BFE, se decidió no realizar experimentos adicionales involucrando PEG-dextrano.

El proceso general propuesto para la recuperación de BFE producida por *Porphyridium cruentum* con alto nivel de pureza (Fig. 3) es un proceso simplificado, caracterizado por tres operaciones unitarias para producir BFE con una pureza de 4.1. A pesar de que el proceso reportado por Bermejo y col. (2003) también considera tres operaciones unitarias para obtener BFE purificada, dos de estas operaciones involucran pasos cromatográficos que pueden generar desventajas relacionadas con los aspectos económicos y la naturaleza compleja del proceso.

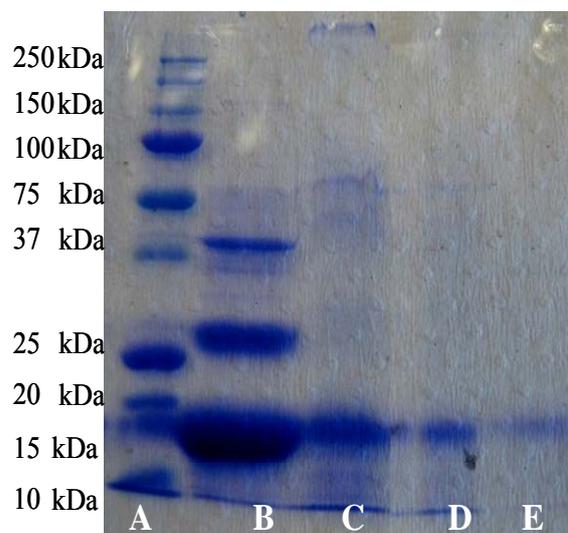


Fig. 2. Gel de poliacrilamida obtenido por electroforesis de las muestras del proceso de extracción y recuperación de B-ficoeritrina (BFE) producida por *Porphyridium cruentum*.

La columna A corresponde al estándar de pesos moleculares (expresados en Kilodaltones (KDa)), la B al estándar de BFE, la C al extracto proveniente de sonicación, la D al extracto resultante de la precipitación isoeléctrica y la columna E corresponde a la BFE purificada en SDFA PEG-fosfato.

En contraste, el proceso propuesto que utiliza SDFA involucra operaciones unitarias (precipitación y SDFA) simples y fácil de implementar a gran escala. La información del porcentaje de recuperación y pureza de BFE después de cada etapa de proceso (Tabla 4) consideran el incremento en volumen causado por la adición de HCl y los componentes que forman las fases en las etapas de precipitación y extracción con SDFA, respectivamente. Este trabajo de investigación presenta un proceso de recuperación y purificación que permite

incrementar la pureza de BFE en 5.9 veces con respecto a la pureza del extracto crudo inicial, recuperando el 72% de la BFE con una pureza de 4.1 (Tabla 4) y un valor comercial de \$50 dólares/mg. Una comparación directa de este proceso con el protocolo existente que involucra etapas cromatográficas (Bermejo y col., 2003) evidencia la superioridad del enfoque aquí propuesto. Este proceso simplifica enormemente la manera mediante la cual BFE producido por *Porphyridium cruentum* puede ser recuperada.

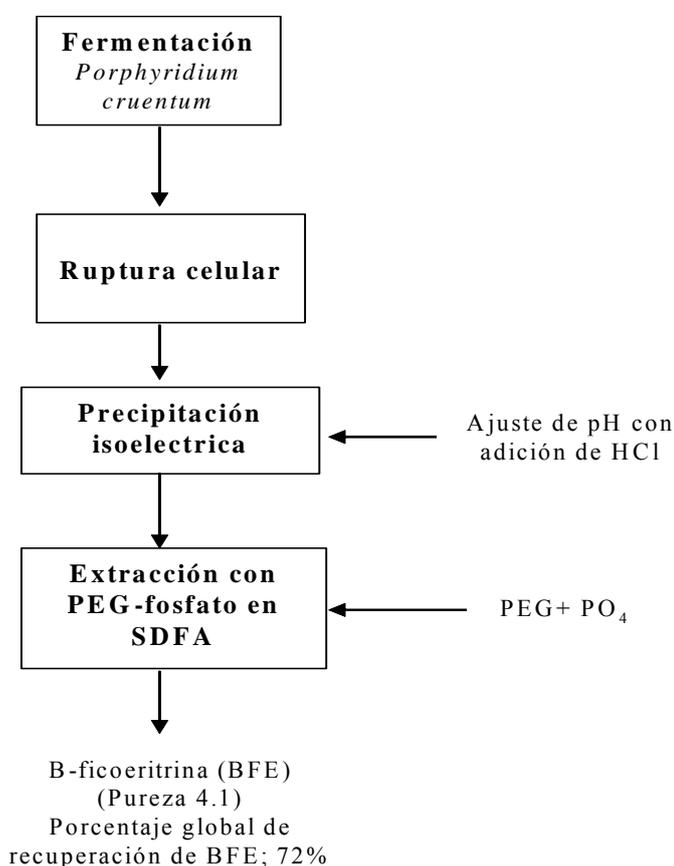


Fig. 3. Representación simplificada del proceso propuesto utilizando precipitación isoelectrica y sistemas de dos fases acuosas para la purificación de B-ficoeritrina producida por *Porphyridium cruentum*.

La biomasa es recuperada por centrifugación, re-suspendida y procesada por sonicación para lograr la ruptura celular. La precipitación isoelectrica fue lograda mediante la reducción de pH con HCl (0.1 M). Después de la precipitación, se agregaron soluciones de PEG y fosfato para lograr la extracción con sistemas de dos fases acuosas. La información de las corrientes de cada operación unitaria se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4. Recuperación y pureza proteica de cada operación unitaria del proceso propuesto para la recuperación de B-ficoeritrina (BFE).

Etapa de proceso	Corriente de entrada	Corriente de salida	Recuperación de cada etapa (%)	Recuperación de proceso (%)	Factor de purificación
Ruptura celular					
Volumen total (L)	0.10	0.10			
Concentración de BFE (mg/L)		220			
Pureza BFE ($A_{545/280}$)		0.70			
Cantidad de BFE (mg)		22.0	100	100	1.0
Precipitación					
Adición de HCl	0.01				
Volumen total (L)	0.10	0.11			
Concentración de BFE (mg/L)	220	140			
Pureza BFE ($A_{545/280}$)	0.70	1.80			
Cantidad de BFE (mg)	22.0	17.0	77.0	77.0	2.6
Extracción con PEG y fosfato					
Adición de PEG y PO_4 (L)	0.16				
Volumen total (L)	0.11	0.27			
Concentración de BFE (mg/L)	140	50.0			
Pureza BFE ($A_{545/280}$)	1.80	4.1			
Cantidad de BFE (mg)	17.0	16.0	95.0	72.0	5.9

La pureza, concentración y recuperación de BFE para cada etapa de proceso se estimó como se describió en Materiales y métodos. El factor de purificación es la relación de las purezas de BFE después y antes de cada operación unitaria.

Conclusiones

El uso de precipitación isoelectrica y sistemas de dos fases acuosas (SDFA) permitió la recuperación de B-ficoeritrina (BFE) altamente purificada (pureza superior a 4.0 definida como la relación de las absorbancias a 545 y 280nm) con un rendimiento de 72%. Se observó que la ruptura celular por sonicación fue superior al uso de maceración manual para la liberación de BFE de *Porphyridium cruentum*, debido a que se incrementó cinco veces la concentración de BFE liberada. Los SDFA PEG-sulfato y PEG-dextrano fueron inadecuados para el desarrollo de un proceso que permitiera la recuperación de BFE purificada. En contraste, el uso de SDFA PEG-fosfato, después de una etapa de precipitación isoelectrica, dio como resultado la recuperación de BFE purificada. Las condiciones de operación establecidas para el proceso permitieron concentrar BFE y los contaminantes en fases opuestas. En general,

los resultados reportados aquí demuestran el potencial de la aplicación en conjunto de SDFA y precipitación isoelectrica para la recuperación y purificación de BFE como una primera etapa para el desarrollo de un proceso biotecnológico para la purificación de un colorante proteico.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer el apoyo económico de CONACYT (39645) y de la Cátedra de Investigación del ITESM (CAT 005).

Referencias

- Arad S y Yaron A. (1992). Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends Food Science and Technology* 3, 92-97.
- Ayyagari M, Pande R, Kamtekar S, Gao H, Marx K, Kumar J, Tripathy S, Akkara J y Kaplan D. (1995). Molecular assembly of proteins and conjugated polymers: Towards

- development of biosensors. *Biotechnology and Bioengineering* 45, 116-121.
- Benavides J y Rito-Palomares M. (2004). Bioprocess intensification: a potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *Journal of Chromatography B* 807, 33-38.
- Benavides J y Rito-Palomares M. (2005). Potential aqueous two-phase processes for the primary recovery of colored proteins from microbial origin. *Engineering in Life Science* 5, 259-266.
- Bennet A y Bogorad L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green algae. *Journal of Cell Biology* 58, 419-435.
- Bermejo R, Alvarez-Pez JM, Acien-Fernandez FG y Molina-Grima E. (2002). Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology* 93, 73-85.
- Bermejo R, Acien FG, Ibáñez MJ, Fernández JM, Molina E y Alvarez-Pez JM. (2003). Preparative purification of b-phycoerythrin from microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B* 790,317-325.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brass G M F, Simon G W y Lyddiatt A. (2000). Recovery in aqueous two-phase systems of nanoparticulates applied as surrogate mimics for viral gene therapy vectors. *Journal of Chromatography B* 743, 409-419.
- Glatz C E. (1990). Precipitation. In *Downstream Processing Biotechnology*. Asenjo J. Ed. Marcel Dekker. Nueva York.
- Haugland RP. (1996). *Handbook of Fluorescent and Research Chemicals*. 6th ed. Molecular Probes, Eugene.
- He C, Li S, Liu H, Li K y Liu F. (2005). Extraction of testosterone and epitestosterone in human urine using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt. *Journal of Chromatography A*, 1082, 143-149.
- Koller KP, Wehrmeyer W. y Schneider H. (1977). Isolation and characterization of disc-shaped phycobilisomes from the red alga *Rhodella violacea*. *Archives of Microbiology* 112, 61-67.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Liu LN, Chen XL, Zhang XY y Zhou BC. (2005). One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. *Journal of Biotechnology* 116, 91-100.
- Market Corporation, 2005, web page: <http://www.marketbio.com>. (consultada en Octubre 2005).
- Qiu J, Madoz-Gurpide J, Misek DE, Kuick R, Brenner DE, Michailids G, Haab BB, Omenn GS, y Hanash S. (2004). Development of natural protein microarrays for diagnosing cancer based on an antibody response to tumor antigens. *Journal of Proteome Research* 3, 261-267.
- Ranjitha K y Kaushik BD. (2005). Purification of phycobiliproteins from *Nostoc muscorum*. *Journal of Scientific and Industrial Research* 64, 372-375.
- Rito-Palomares M, Dale C y Lyddiatt A. (2000a). Generic application of an aqueous two-phase process for protein recovery from animal blood. *Process Biochemistry* 35 665-673.
- Rito-Palomares M, Negrete, Galindo E y Serrano-Carreón L. (2000b). Aroma compounds recovery from micelial cultures in aqueous two-phase processes. *Journal of Chromatography, B* 743, 403-408.
- Rito-Palomares M y Lyddiatt A. (2000) Practical implementation of aqueous two-phase processes for protein recovery from yeast. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 75, 632-638.
- Rito-Palomares M, Nuñez L y Amador D. (2001). Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycoerythrin recovery from *Spirulina maxima*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76, 1272-1280.
- Rito-Palomares M. (2004). Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. *Journal of Chromatography B* 807, 3-11.

- Ritter, S., Hiller, R. G., Wrench, P. M., Welte, W. y Diederichs, K. (1999). Crystal structure of a phycourobilin-containing phycoerythrin at 1.90-Å resolution. *Journal of Structural Biology* 126, 86-97.
- Swanson RV y Glazer AN. (1990). Separation of phycobiliproteins subunits by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 188,295-299.
- Zaman F, Kusnadi A R y Glatz C E. (1999). Strategies for recombinant protein recovery from canola by precipitation. *Biotechnology Progress* 15, 488-492.
- Zhu BH, Wang GC y Tseng CK. (2005). Interaction between phycobilisomes from *Porphyridium cruentum* and thylakoid membranes from *Gymnodinium sp* or spinach. *Russian Journal of Plant Physiology* 52, 288-293.
- Zijlstra G M, de Gooijer C D, van der Pol L A y Tramper J. (1996). Design of aqueous two-phase systems supporting animal cell growth: a first step towards extractive bioconversion *Enzyme Microbial Technology* 19, 2-8.