



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

TESIS DOCTORAL

**OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE
FICOERITRINA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA
DE ADSORCIÓN EN LECHO EXPANDIDO.
ESCALADO DEL PROCESO,
CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y
APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL**

**PRESENTADA POR:
ESMERALDA RUIZ ORTEGA**

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

JAÉN, 14 DE FEBRERO 2012

**ISBN 978-84-8439-656-7
DEPÓSITO LEGAL J-1187-2012**

UNIVERSIDAD DE JAÉN
Departamento de Química Física y Analítica
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE LINARES



TESIS DOCTORAL

OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FICOERITRINA MEDIANTE
CROMATOGRFÍA DE ADSORCIÓN EN LECHO EXPANDIDO.
ESCALADO DEL PROCESO, CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA
Y APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL

Esmeralda Ruiz Ortega

Linares, 2012

D. RUPERTO BERMEJO ROMÁN

CERTIFICA:

Que el trabajo desarrollado en la presente Memoria, con el título **“Obtención y purificación de ficoeritrina mediante cromatografía de adsorción en lecho expandido. Escalado del proceso, caracterización fisicoquímica y aplicación como colorante natural”**, que presenta D^a Esmeralda Ruiz Ortega 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 la presente en Linares, a 9 de Diciembre de 2011.

El Director de la Tesis:

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

Tesis Doctoral presentada por D^a Esmeralda Ruiz Ortega, Ingeniera Química, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Jaén.

Fdo. D^a Esmeralda Ruiz Ortega

La presente Memoria se enmarca dentro del programa de Doctorado “Metodología y Técnicas de Investigación en Química Fundamental y Aplicada” y presenta parte de los resultados obtenidos mediante la ejecución del proyecto de investigación titulado “Desarrollo de un proceso para la obtención de colorantes naturales de interés biotecnológico a partir de microalgas”, Proyecto de Excelencia P06-TEP-01362, financiado por la Junta de Andalucía.

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento al Profesor Dr. D. Ruperto Bermejo, impulsor de esta Tesis, por descubrirme el mundo de la investigación y por ser mi guía en esta larga travesía, por confiar plenamente en mi trabajo y por sus valiosas enseñanzas, por su dedicación, su apoyo incondicional y su honestidad y por la amistad que siempre me ha transmitido a lo largo de estos años, tanto en el plano profesional como en el personal.

También quiero agradecer a Amparo su desinteresada ayuda y su continua prestación sobre todo en la fase final de este trabajo, a Rafi, por haber compartido conmigo buenas tardes de laboratorio, y a Carlos, Bea, Monaim, y Pilar, por su colaboración y compañía.

Expresar mi agradecimiento a los Profesores Dres. D. Gabriel Acién y D. José M^a Fernández de la Universidad de Almería por su colaboración y como no, a los Profesores Dres. D. Antonio Ortiz y D. Rafael Cuesta de la Universidad de Jaén por su gran apoyo y generosidad.

A mis padres, Amparo y Pedro, quienes me infundieron la ética y el rigor que guían mi vida, por estar siempre en el momento justo y porque mi triunfo es también de ellos.

A mi hermana, Diana, por su ejemplo de lucha, inteligencia y superación, por su compañía y su apoyo incondicional.

A mis abuelos, que han seguido con interés mi trabajo, por su ánimo constante.

A mi marido, Valentín, por ser mi compañero en la vida, mi gran apoyo, por su cariño y paciencia.

Y por último y no menos importante, a mi pequeño, Alejandro, por ser mi vida y porque su sonrisa es mi estímulo en los malos momentos.



INDICES

ÍNDICE GENERAL

1.- INTRODUCCIÓN. OBJETIVO DE LA MEMORIA.....	1
2.- ANTECEDENTES.	
2.1.-INTERÉS PRÁCTICO DE LAS MICROALGAS.....	5
2.1.1.-Las microalgas frente a cultivos convencionales	5
2.1.2.-Aplicaciones	9
2.2.-BILIPROTEINAS.....	21
2.2.1.-Generalidades.....	21
2.2.2.-Composición en subunidades	25
2.2.3.-Secuencia de aminoácidos.....	28
2.2.4.-Contenido y composición en bilinas	31
2.2.5.-Estados de agregación.....	33
2.2.6.-Propiedades relevantes para sus distintas aplicaciones.....	35
2.2.7.-Aplicaciones	40
2.3.-PURIFICACIÓN DE PROTEINAS.....	45
2.3.1.-Generalidades.....	45
2.3.2.-Purificación de biliproteínas.....	47
2.3.2.1.-Metodologías convencionales.....	47
2.3.2.2.-Metodologías basadas en adsorción en lecho expandido.....	48
2.4.-CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN EN LECHO EXPANDIDO.	50
2.4.1.-Principios de la adsorción en lecho expandido	53
2.4.2.-Características de diseño	55
2.4.3.-Características de funcionamiento	57
2.5.-ESTUDIOS DE COLOR.....	60
2.5.1.-La medida del color	62
2.5.2.-Expresión numérica del color. Espacios de color	63
2.5.2.1.-Espacio de color $L^*a^*b^*$	64
2.5.2.2.-Espacio de color $L^*C^*h^*$	67
2.5.2.3.-Espacio de color XYZ.....	68
2.5.3. Medida de la diferencia de color	69
2.5.4. Colorantes.....	71
2.5.2.1.-Tipos de colorantes	71
2.5.2.2.-Colorantes en alimentación	72
2.5.2.2.1.-Razones para el uso de colorantes.....	72
2.5.2.2.2.-Importancia de los colorantes naturales.....	73

4.2.1.-Tratamientos previos.....	132
4.2.1.1.-Optimización de la fase de extracción.	132
4.2.1.2.-Optimización de la fuerza iónica del medio de extracción.....	135
4.2.1.3.-Optimización de la exposición a ultrasonidos.	137
4.2.1.4.-Extracto enriquecido en B-PE previo a la cromatografía	138
4.2.2.-Cromatografía de adsorción en lecho expandido	140
4.2.2.1.-Cálculo de la capacidad de adsorción del relleno.	140
4.2.2.1.1.-Capacidad estática (Isotermas de adsorción).	141
4.2.2.1.2.-Capacidad dinámica (Curvas de ruptura).....	145
4.2.2.2.-Optimización de variables de trabajo.....	151
4.2.2.2.1.-Comportamiento hidrodinámico del sistema	153
4.2.2.2.2.-Influencia del grado de expansión.	154
4.2.2.2.3.-Influencia de la viscosidad.	157
4.2.2.3.-Escalado del proceso.	158
4.2.2.3.1.-Columna de 1'5 cm.	159
4.2.2.3.2.-Columna de 2'5 cm.	167
4.2.2.3.3.-Columna de 4 cm	173
4.2.2.3.4.-Columna de 6 cm.....	182
4.2.3.-Producción de B-PE ultrapura	193
4.2.3.1.-Cromatografía de intercambio iónico.	193
4.2.3.2.-Evaluación global del proceso de purificación.	197
4.2.4.-Identificación de la biliproteína purificada	198
4.2.4.1.-Análisis espectroscópico.	198
4.2.4.2.-Electroforesis.....	202
4.2.4.3.-Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	204
4.2.5.-Planta piloto para producción industrial de B-PE	205
4.2.5.1.-Columna de 9cm.	206
4.2.5.2.-Columna escala planta piloto para producción de ficoeritrina (15·130cm).	211

4.3.-CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE FICOERITRINA

Y SUS SUBUNIDADES.....	223
4.3.1.-Caracterización de la biliproteína purificada	224
4.3.1.1.-Determinación del peso molecular.....	224
4.3.1.2.-Determinación de los parámetros espectroscópicos.....	225
4.3.1.2.1.-Coeficiente de extinción molar	225

4.3.1.2.2.-Intervalo lineal intensidad de fluorescencia y concentración.....	227
4.3.1.3.-Estabilidad.....	229
4.3.1.3.1.-Estabilidad frente al pH.....	230
4.3.1.3.2.-Estabilidad frente a la temperatura.....	234
4.3.1.3.3.-Estabilidad frente al tiempo.....	236
4.3.1.4.-Caracterización estructural mediante espectroscopía.....	237
4.3.2.-Caracterización de las subunidades.....	241
4.3.2.1.-Obtención de subunidades mediante HPLC.....	241
4.3.2.2.-Caracterización de subunidades.....	243
4.4.-APLICACIÓN DE FICOERITRINA COMO COLORANTE NATURAL.....	247
4.4.1.-Ensayos de coloración.....	248
4.4.1.1.-Aplicación a matrices lácteas.....	248
4.4.1.1.1.-Batidos.....	248
4.4.1.1.2.-Yogures.....	260
4.4.1.1.3.-Yogures líquidos.....	269
4.4.1.1.4.-Helados.....	278
4.4.1.2.-Aplicación a otras matrices.....	284
4.4.1.2.1.-Bebidas isotónicas.....	284
4.4.1.2.2.-Licores sin alcohol.....	287
4.4.1.2.3.-Gaseosas.....	293
4.4.1.2.4.-Mostos.....	297
4.4.2.-Ensayos de estabilidad.....	301
4.4.3.-Factores de tinción.....	305
5.- CONCLUSIONES.....	309
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	311
7.- ANEXOS.....	331

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
Tabla 2.1.....	6
Tabla 2.2.....	7
Tabla 2.3.....	12
Tabla 2.4.....	13
Tabla 2.5.....	23
Tabla 2.6.....	27
Tabla 2.7.....	32
Tabla 2.8.....	36
Tabla 2.9.....	74
Tabla 2.10.....	80
Tabla 2.11.....	81
Tabla 3.1.....	100
Tabla 3.2.....	121
Tabla 3.3.....	126
Tabla 3.4.....	130
Tabla 4.1.....	131
Tabla 4.2.....	134
Tabla 4.3.....	136
Tabla 4.4.....	138
Tabla 4.5.....	144
Tabla 4.6.....	148
Tabla 4.7.....	153
Tabla 4.8.....	155
Tabla 4.9.....	158
Tabla 4.10.....	160
Tabla 4.11.....	162
Tabla 4.12.....	168
Tabla 4.13.....	170
Tabla 4.14.....	174
Tabla 4.15.....	175
Tabla 4.16.....	183
Tabla 4.17.....	185

Tabla 4.18.	192
Tabla 4.19.	194
Tabla 4.20.	197
Tabla 4.21.	201
Tabla 4.22.	206
Tabla 4.23.	209
Tabla 4.24.	210
Tabla 4.25.	213
Tabla 4.26.	214
Tabla 4.27.	215
Tabla 4.28.	221
Tabla 4.29.	226
Tabla 4.30.	228
Tabla 4.31.	234
Tabla 4.32.	248
Tabla 4.33.	249
Tabla 4.34.	251
Tabla 4.35.	253
Tabla 4.36.	259
Tabla 4.37.	261
Tabla 4.38.	262
Tabla 4.39.	263
Tabla 4.40.	264
Tabla 4.41.	268
Tabla 4.42.	270
Tabla 4.43.	271
Tabla 4.44.	272
Tabla 4.45.	273
Tabla 4.46.	277
Tabla 4.47.	279
Tabla 4.48.	280
Tabla 4.49.	283
Tabla 4.50.	285
Tabla 4.51.	289
Tabla 4.52.	294
Tabla 4.53.	299

Tabla 4.54.....	306
Tabla 4.55.....	307

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
Figura 2.1.....	33
Figura 2.2.....	51
Figura 2.3.....	52
Figura 2.4.....	56
Figura 2.5.....	59
Figura 2.6.....	61
Figura 2.7.....	62
Figura 2.8.....	65
Figura 2.9.....	66
Figura 2.10.....	67
Figura 2.11.....	68
Figura 2.12.....	69
Figura 2.13.....	70
Figura 3.1.....	101
Figura 3.2.....	103
Figura 3.3.....	106
Figura 3.4.....	108
Figura 3.5.....	110
Figura 3.6.....	114
Figura 3.7.....	123
Figura 4.1.....	139
Figura 4.2.....	143
Figura 4.3.....	144
Figura 4.4.....	147
Figura 4.5.....	154
Figura 4.6.....	156
Figura 4.7.....	165
Figura 4.8.....	166
Figura 4.9.....	173
Figura 4.10.....	181
Figura 4.11.....	191
Figura 4.12.....	195

Figura 4.13.	198
Figura 4.14.	200
Figura 4.15.	202
Figura 4.16.	203
Figura 4.17.	205
Figura 4.18.	208
Figura 4.19.	218
Figura 4.20.	227
Figura 4.21.	229
Figura 4.22.	231
Figura 4.23.	232
Figura 4.24.	235
Figura 4.25.	236
Figura 4.26.	238
Figura 4.27.	238
Figura 4.28.	241
Figura 4.29.	242
Figura 4.30.	244
Figura 4.31.	244
Figura 4.32.	245
Figura 4.33.	246
Figura 4.34.	256
Figura 4.35.	256
Figura 4.36.	267
Figura 4.37.	267
Figura 4.38.	276
Figura 4.39.	276
Figura 4.40.	282
Figura 4.41.	282
Figura 4.42.	286
Figura 4.43.	286
Figura 4.44.	291
Figura 4.45.	291
Figura 4.46.	296
Figura 4.47.	296

Figura 4.48.....	300
Figura 4.49.....	300
Figura 4.50.....	302
Figura 4.51.....	303
Figura 4.52.....	303
Figura 4.53.....	304
Figura 4.54.....	304

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen	Pág.
Imagen 2.1.....	9
Imagen 3.1.....	95
Imagen 3.2.....	105
Imagen 3.3.....	107
Imagen 3.4.....	112
Imagen 3.5.....	113
Imagen 3.6.....	116
Imagen 3.7.....	118
Imagen 3.8.....	120
Imagen 3.9.....	124
Imagen 3.10.....	129
Imagen 4.1.....	133
Imagen 4.2.....	135
Imagen 4.3.....	140
Imagen 4.4.....	145
Imagen 4.5.....	151
Imagen 4.6.....	152
Imagen 4.7.....	160
Imagen 4.8.....	168
Imagen 4.9.....	182
Imagen 4.10.....	183
Imagen 4.11.....	196
Imagen 4.12.....	199
Imagen 4.13.....	207
Imagen 4.14.....	212
Imagen 4.15.....	217
Imagen 4.16.....	219
Imagen 4.17.....	220
Imagen 4.18.....	223
Imagen 4.19.....	239
Imagen 4.20.....	243
Imagen 4.21.....	247

Imagen 4.22 257
Imagen 4.23 260
Imagen 4.24 268
Imagen 4.25 277
Imagen 4.26 283
Imagen 4.27 287
Imagen 4.28 292
Imagen 4.29 297
Imagen 4.30 301

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación	Pág.
Ecuación 2.1.	70
Ecuación 2.2.	79
Ecuación 3.1.	96
Ecuación 3.2.	96
Ecuación 3.3.	96
Ecuación 3.4.	97
Ecuación 3.5.	98
Ecuación 3.6.	99
Ecuación 3.7.	99
Ecuación 3.8.	102
Ecuación 3.9.	102
Ecuación 3.10.	102
Ecuación 3.11.	117
Ecuación 3.12.	117
Ecuación 3.13.	117
Ecuación 3.14.	117
Ecuación 3.15.	118
Ecuación 3.16.	119
Ecuación 3.17.	122
Ecuación 4.1.	142
Ecuación 4.2.	143
Ecuación 4.3.	146
Ecuación 4.4.	255

ABREVIATURAS

AOT: Dioctilsulfosuccinato
APC: Aloficocianina
ATCC: American Type Culture Collection
B-PE: B-ficoeritrina
CALE: Cromatografía de adsorción en lecho expandido
CIE: Comisión Internacional de l'Eclairage
C-PC: C-ficocianina
C-PE: C-ficoeritrina
Da: Dalton
DBV: Dihidrobiliverdina
DEAE: Dietilaminoetil
 ϵ : Coeficiente de extinción molar
 Φ_F : Rendimiento cuántico de fluorescencia
EBA: Expanded bed adsorption
EFAs: Ácidos grasos esenciales
EFSA: European Food Safety Authority
FAO: Food and Agriculture Organization
FD: Factor de dilución
FDA: Food and Drug Administration
FD&C: Food, Drug, and Cosmetic
FI: Fuerza iónica
FRET: Transferencia resonante de energía por fluorescencia
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
Hz: Hercio
IDA: Ingesta diaria admisible
LOAEL: Lowest observed adverse effect level
NOAEL: Non observed adverse effects level
PCB: Ficocianobilina
PCC: Colección de cianobacterias Pasteur
PEB: Ficoeritrobilina
PUB: Ficourobilina
PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados

PXB: Ficobiliviolina
Pm: Peso molecular
R-PC: R-ficocianina
R-PE: R-ficoeritrina
Rpm: Revoluciones por minuto
RSD: Desviación típica relativa
SDS: Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SBV: Volumen de lecho sedimentado
TEMED: (N,N,N',N',-tetrametiletilendiamida)
TFA: Ácido trifluoroacético
UA: Unidades arbitrarias
UTEX: Universidad de Texas

AMINOÁCIDOS

A: Alanina
C: Cisteína
D: Ácido aspártico
E: Ácido 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 de 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 (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). Es importante resaltar que tanto ficocianinas y ficoeritrinas se están empleando en la actualidad en la obtención de nanopartículas biológicas bifuncionales, con posibles aplicaciones en los ámbitos biomédico y fotoquímico (Bermejo y col., 2011b).

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. Por ello, la Agencia de Seguridad Alimentaria Europea (EFSA) está finalizando la reevaluación del listado de colorantes admitidos para uso alimentario, habiendo sido eliminados algunos colorantes sintéticos que ahora se han demostrado tóxicos y que se han venido utilizando desde hace años (EFSA, 2011).

Sin embargo, el número de colorantes naturales y su gama de colores, son escasos en relación con las necesidades reales de este tipo de sectores industriales. 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 y constituyendo una alternativa real para el incremento y diversificación de la oferta actual de colorantes naturales existentes en el mercado (Akhilender y col., 1999, Ramos y col., 2010; 2011).

Hasta el momento, el gran potencial de aplicación que muestran la biliproteínas apenas ha podido ser aprovechado debido a la escasa disponibilidad de las mismas. Puede decirse que existen diversas microalgas que poseen estas macromoléculas, pero no hay métodos efectivos para el aislamiento y la purificación de las mismas. 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. En este sentido, 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 utiliza 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. 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 de las mismas.

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 estén buscando 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, obteniéndose las proteínas procedentes del extracto original sin necesidad de eliminar el material particulado que las acompaña (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 con 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 ficoeritrinas procedentes del alga roja *Porphyridium cruentum*. 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 la ficoeritrina purificada y se ha finalizado ensayando la capacidad colorante de esta macromolécula, estudiando el efecto de su adición a matrices reales constituidas por diferentes 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 (m²)	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 $2 \text{ gl}^{-1}\text{día}^{-1}$ (Acién y col., 1998; Pulz, 2001; Verma y col., 2010).



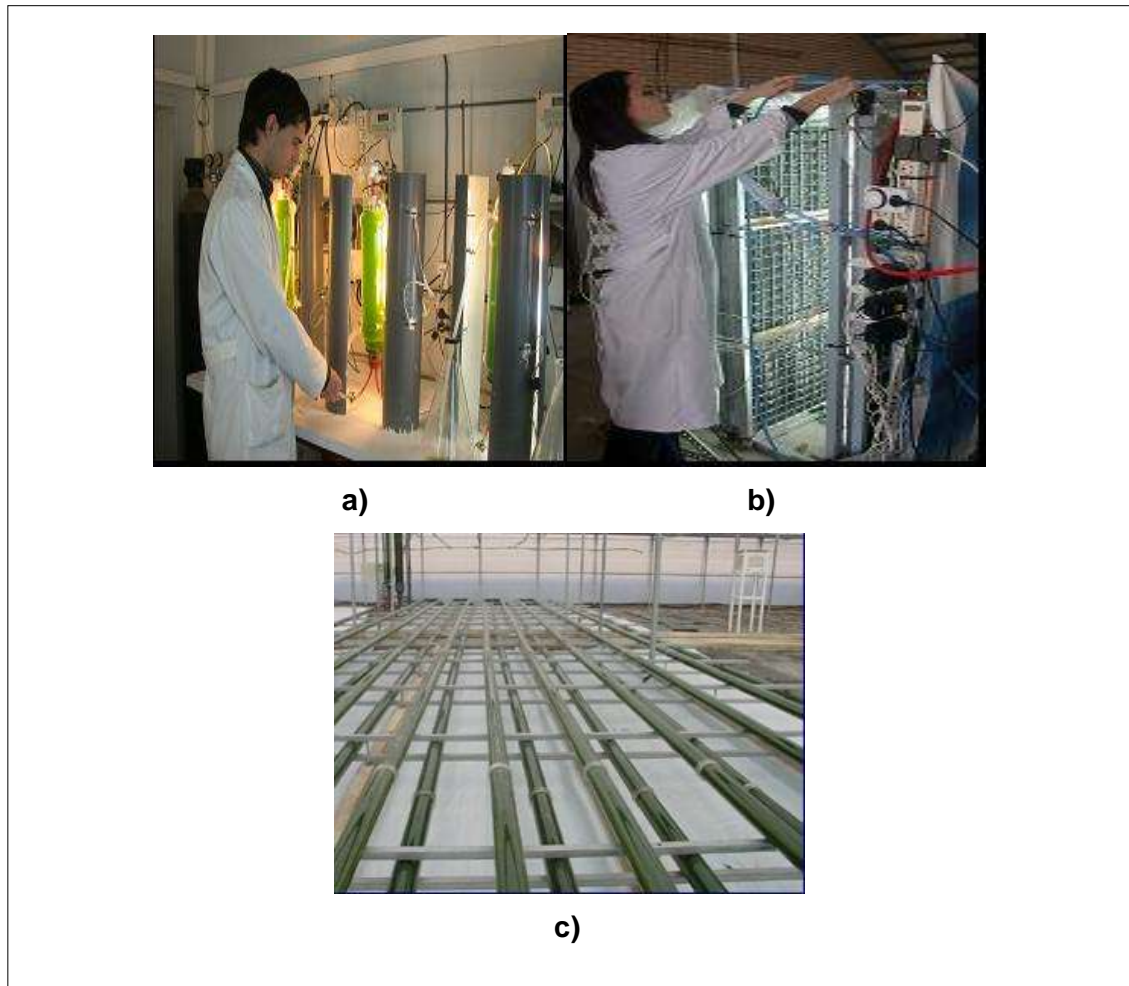


Imagen 2.1.

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 de alto valor.

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 verde-azulada *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	PROTEÍNAS	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 cilíndrica</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 máxima</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. Así, 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 (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 tamaños 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 y 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 aeruginum*, 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-O-metilxilosa, 3- y 4-O-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. Así, estos compuestos 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 Moraes, 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; Stephen 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), ficoeritrobilina (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 ficoeritrobilina (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 λ_{\max} (nm)	Emisión λ_{\max} (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. Así, 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 procariontes (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 ($\lambda_{\max} \approx 610-$



625nm) 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).

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

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

Subunidad β:				
10	20	30	40	50
MFDAFTKVVVS	QADTRGEMLS	TAQIDALSQM	VAESNKRLDA	VNRITSNAST
60	70	80	90	100
IVSNAARSLF	AEQPQLIAPG	GNAYTSRRMA	ACLRDMEIIL	RYVTVYAVFAG
110	120	130	140	150
DASVLEDRCL	NGLRETYLAL	GTPGSSVAVG	VGKMKEAALA	IVNDPAGITP
160	170			
GDCSALASEI	ASYFDRACAA	VS		



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 CLRDLDYLR 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 CIRDLDYLR YATYAMLAGD				
110	120	130	140	150
PSILDERVLN GLKETYNLSG VPIGATVQAI QAMKEVTAGL VGADAGKEMG				
160				
IYFDYICSGL S				



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

Subunidad α :

10	20	30	40	50
MKTPITEAIA TADNQGRFLS NTELQAVNGR YQRATASLTA AKALTGSAQR				
60	70	80	90	100
LITGAAQAVY NKFPYTTQMP GPAYASSAIG KAKCARDIGY YLRMVITYTLV				
110	120	130	140	150
VGGTGPMDEY LVAGLEEINR SFDLSPSWYI EALQYIKNSH GLSGQVANEA				
160				
NAYIDY AINT SL				

Subunidad β :

10	20	30	40	50
MLDAFAKVVAQADARGEFLS NTQIDALSKM VKEGNQRLDI VNKVTSNASA				
60	70	80	90	100
IVTNSARALF AEQPQLIQPG GNAYTSRNMA ACLRDMEIVL RYVSYAMLAG				
110	120	130	140	150
DSSVLDDRCL NGLRETYQAL GTPGSSVAVA IQKMKDASVA LANDTTGTPI				
160	170			
GDCSSLVAEL AGYFDRAAVS VV				



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

Subunidad α :

10	20	30	40	50
MKSVITTVVS	AADAAGRFP	NSDLESIQGN	IQRSAARLEA	AEKLAGNHEA
60	70	80	90	100
VVKEAGDACFAKYAYLKNPGEAGENQEKIN	KCYRDVDHYM	LVNYDLVVG		
110	120	130	140	150
GTGPLDEWGI	AGAREVYRTL	NLPTSAYVAS	IAYTRDRLCV	PRDMSAQAGV
160				
EFSAYLDYLI	NALS			

Subunidad β :

10	20	30	40	50
MLDAFSRVVV	NSDAKAA YVG	GSDLQALKSF	IADGNKRLDA	VNSIVSNASC
60	70	80	90	100
MVSDAVSGMI	CENPGLISPG	GNCYTNRMA	ACLRDGEIIL	RYVSYALLAG
110	120	130	140	150
DASVLEDRCL	NGLKETYIAL	GVPTNSSIRA	VSIMKAQAVA	FITNTATERK
160	170			
MSFAAGDCTS	LASEVAS YFD	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.

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



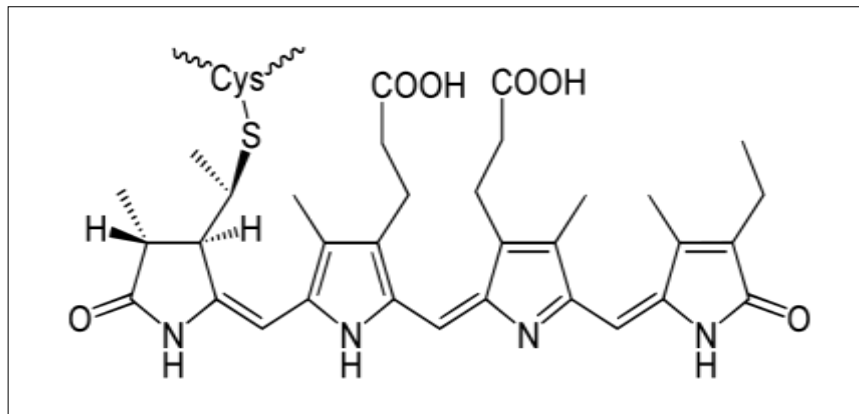


Figura 2.1.

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 absorción 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)-carbodiimida (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 alofococianinas 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.

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	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	281000	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	240000	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 esto 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 esto 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 (λ_{maxF}) 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, ésto 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).



Punto isoeléctrico y estabilidad de los oligómeros

Los puntos isoeléctricos 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

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). Esto 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).

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 Guard-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 NH_2 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).



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).

También se están utilizando actualmente las biliproteínas para la obtención de nanopartículas biológicas bifuncionales, uniéndolas a ferritina. De esta forma se consiguen nanopartículas que por un lado son magnéticas, debido a la ferritina



y por otro lado luminiscentes, debido a las biliproteínas (Bermejo y col., 2011a; 2011b).

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 han 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 esto 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 viene 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*, *Spirulina platensis*, *Anabaena marina* y *Synechocystis aquatilis* (Bermejo y col., 2003a; 2006; 2007; 2008; 2009; Niu y col., 2007, Ramos y col., 2010, 2011).

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.



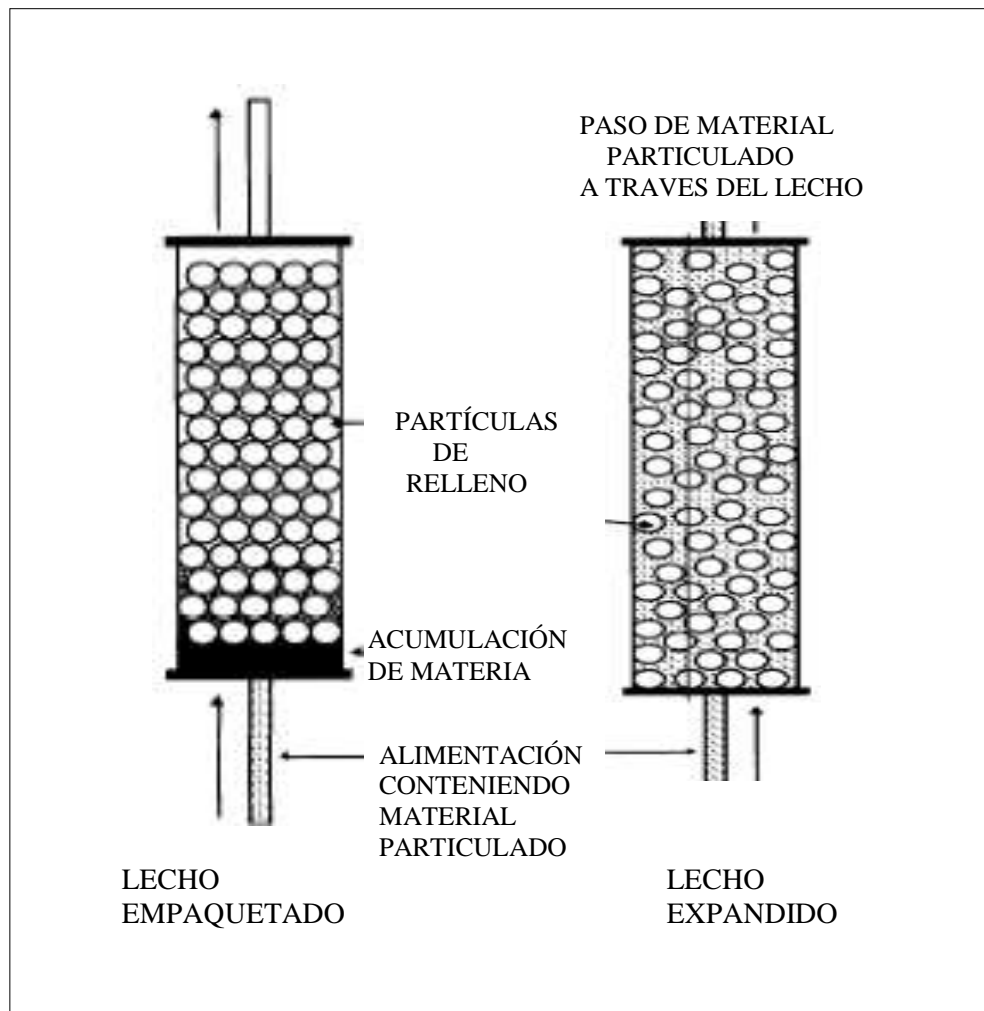


Figura 2.2.

Comparación entre los sistemas cromatográficos de lecho empacado y lecho expandido.

La eficacia en este tipo de lecho expandido es muy similar a la obtenida en un lecho empacado, 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 expandidos 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).

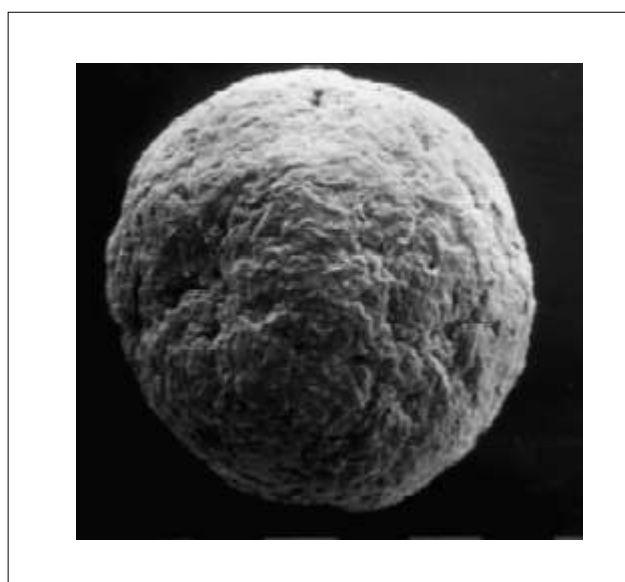


Figura 2.3.

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 empacado (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.).

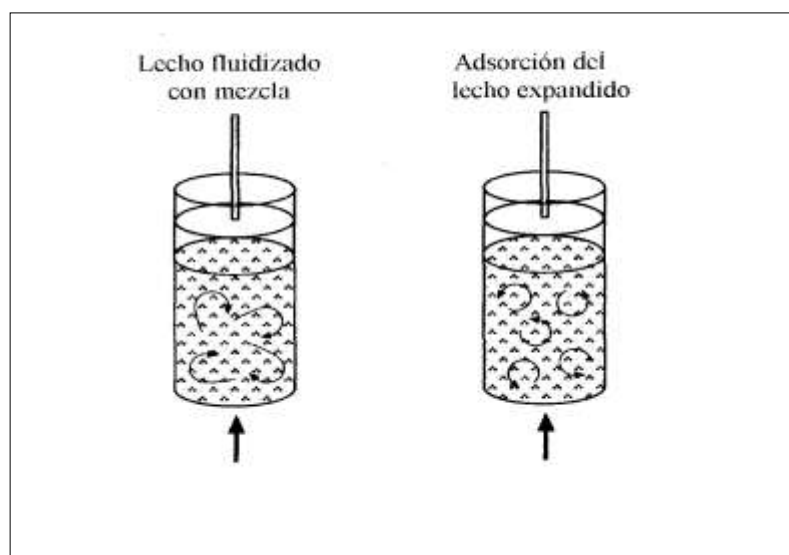


Figura 2.4.

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.

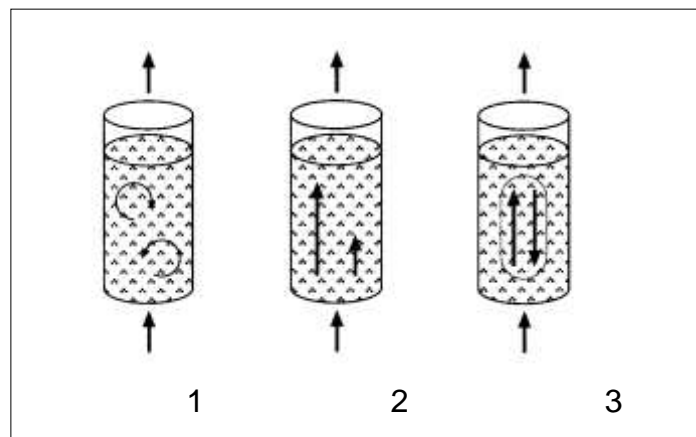


Figura 2.5.

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.-ESTUDIOS DE 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 2.6.) 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 ($630 < \lambda < 750 \text{nm}$).

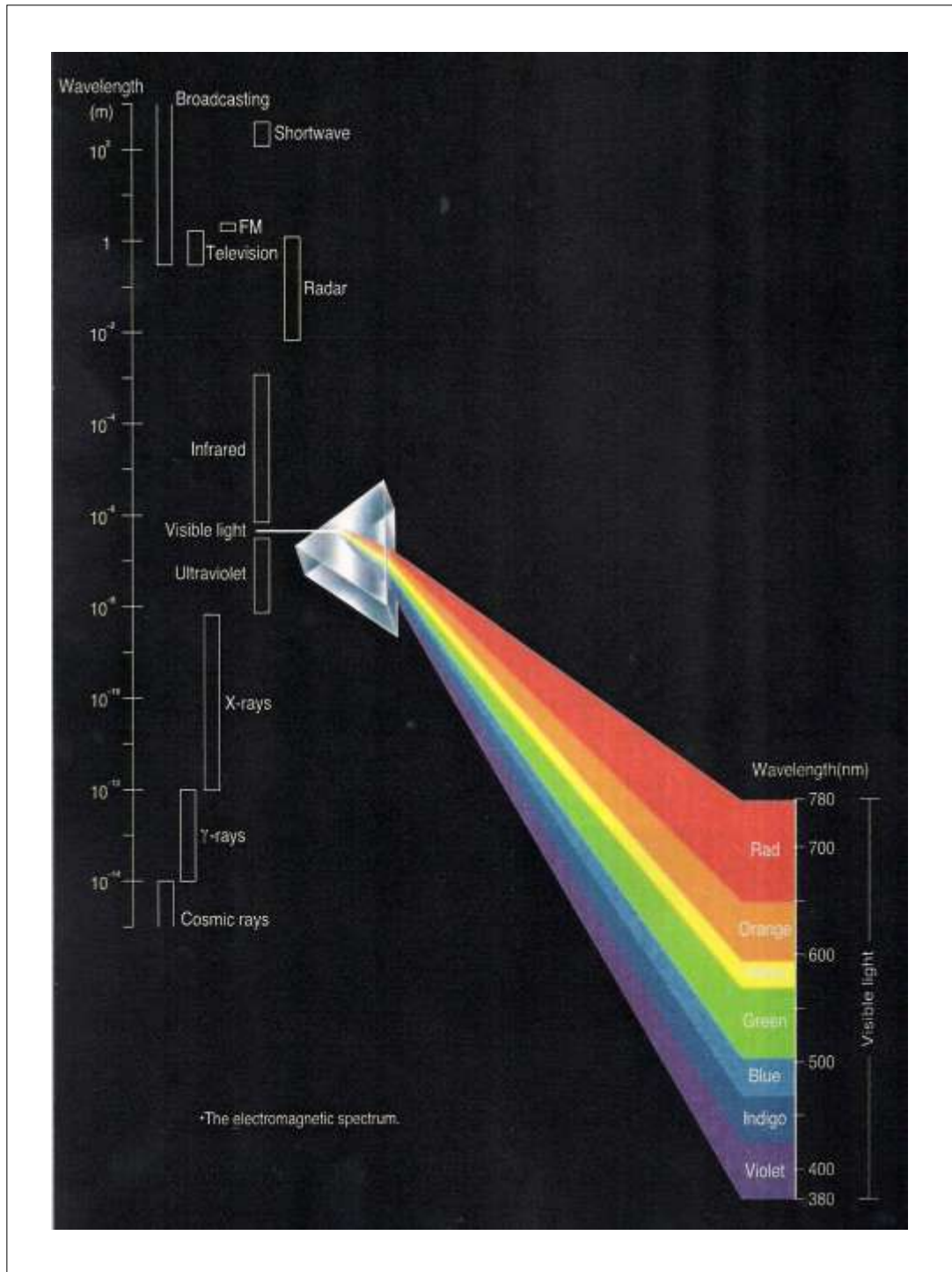


Figura 2.6.
Espectro electromagnético.

2.5.1.-LA MEDIDA DEL COLOR

Los principales atributos del color de los objetos son el tono-matiz, 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 (Figura 2.7.).

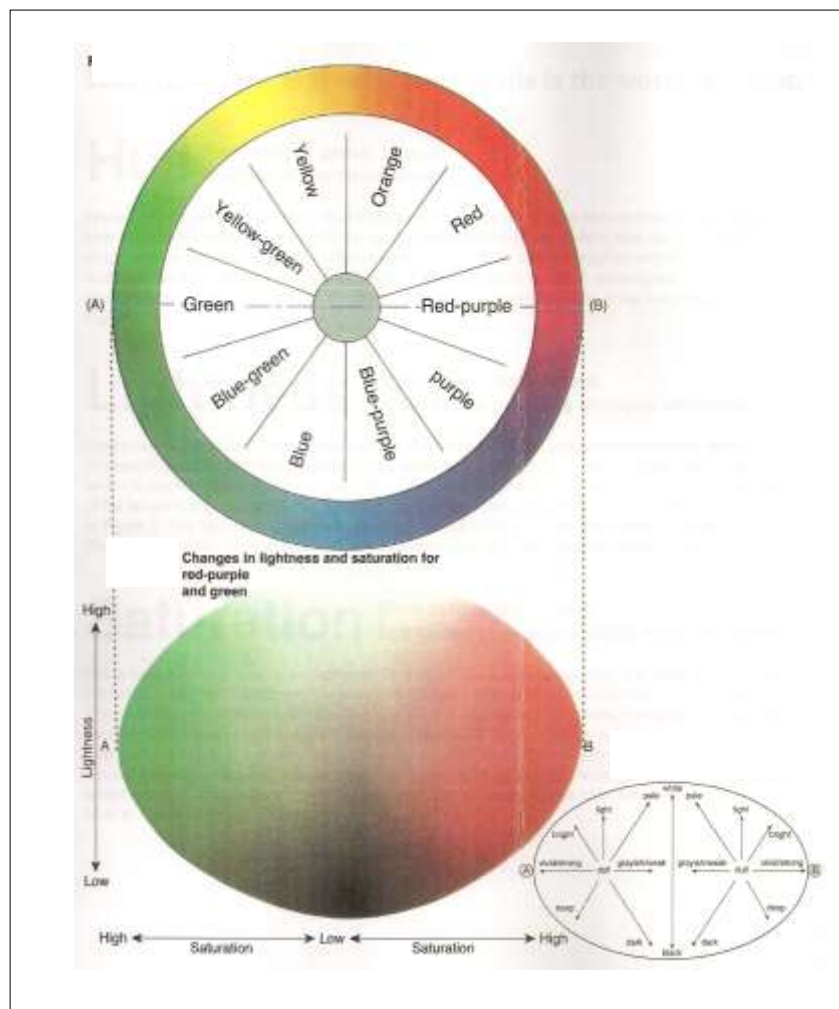


Figura 2.7.

Rueda del color.

La evaluación del color por inspección visual, es una medida subjetiva que depende de quien la realiza. 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. 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 la conforma 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).

2.5.2. EXPRESIÓN NUMÉRICA DEL COLOR. ESPACIOS DE COLOR

La colorimetría es la medida del color con instrumentos fotoeléctricos usando tres (o cuatro) luces coloreadas. Por otro lado, los métodos espectroscópicos usan luces monocromáticas para iluminar el objeto. La reflectancia espectral del objeto es medida a cada longitud de onda del espectro visible y todos estos 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 se utiliza para generar un conjunto de números que describen el color, por ejemplo las coordenadas de color (Konica Minolta, 2007).

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.

A lo largo de la historia, muchos investigadores han intentado inventar sus propios métodos para expresar el color cuantitativamente. Estos métodos proporcionaron una forma de expresar el color numéricamente que eran aproximadamente igual a como expresamos la longitud o el peso. Por ejemplo, en 1905 el artista americano A. H. Munsell ideó un método de expresión del color



utilizando un gran número de fichas de papel de diferentes colores (Color de Munsell), claridad (Valor Munsell), y saturación (Chroma Munsell) para comparar visualmente con una muestra de color. Este método fue la base del Sistema Actualizado Munsell, que es el utilizado hoy día. En este sistema, cualquier color se expresa mediante una combinación de letras y números (H V/C) en términos de Color (H), valor (V) y croma o pureza (C).

Otros métodos para la expresión numérica del color, fueron también desarrollados por una organización internacional, la Comisión Internacional de l'Eclairage (CIE). Lo más ampliamente conocido de este método son el espacio de color Y_{xy} ideado en 1931 y basado en los valores XYZ definidos por CIE, y el espacio $L^*a^*b^*$, aparecido en 1976, que proporciona diferencias de color uniforme en relación con las diferencias visuales. Tras varias mejoras realizadas, dichos espacios de color son ampliamente utilizados en todo el mundo para la expresión del color.

2.5.2.1. Espacio de color $L^*a^*b^*$

El espacio de color $L^*a^*b^*$ (CIELAB), es uno de los métodos más populares para la medida de color, ampliamente usado en todos los campos. Así, es uno de los espacios uniformes de color definidos por CIE en 1976, con objeto de eliminar uno de los mayores problemas del espacio Y_{xy} ya que en este método, para las mismas distancias en "x", la "y" del diagrama de cromaticidad no corresponde a las mismas diferencias de color. En este espacio, "L" indica claridad y "a" y "b" son las coordenadas de cromaticidad. La Figura 2.8. muestra el diagrama de cromaticidad, donde a^* y b^* indican las direcciones del color. Así, $+a^*$ es la dirección hacia el rojo y $-a^*$ hacia el verde, $+b^*$ es la dirección hacia el amarillo y $-b^*$ hacia el azul. El centro es acromático de manera que, a medida que los valores de a^* y b^* aumentan y nos alejamos de los puntos centrales, la saturación del color aumenta (Konica Minolta, 2007). Las Figuras 2.8. y 2.9. representan el sólido de color para el espacio de color $L^*a^*b^*$ y una vista del sólido cortado horizontal y verticalmente.



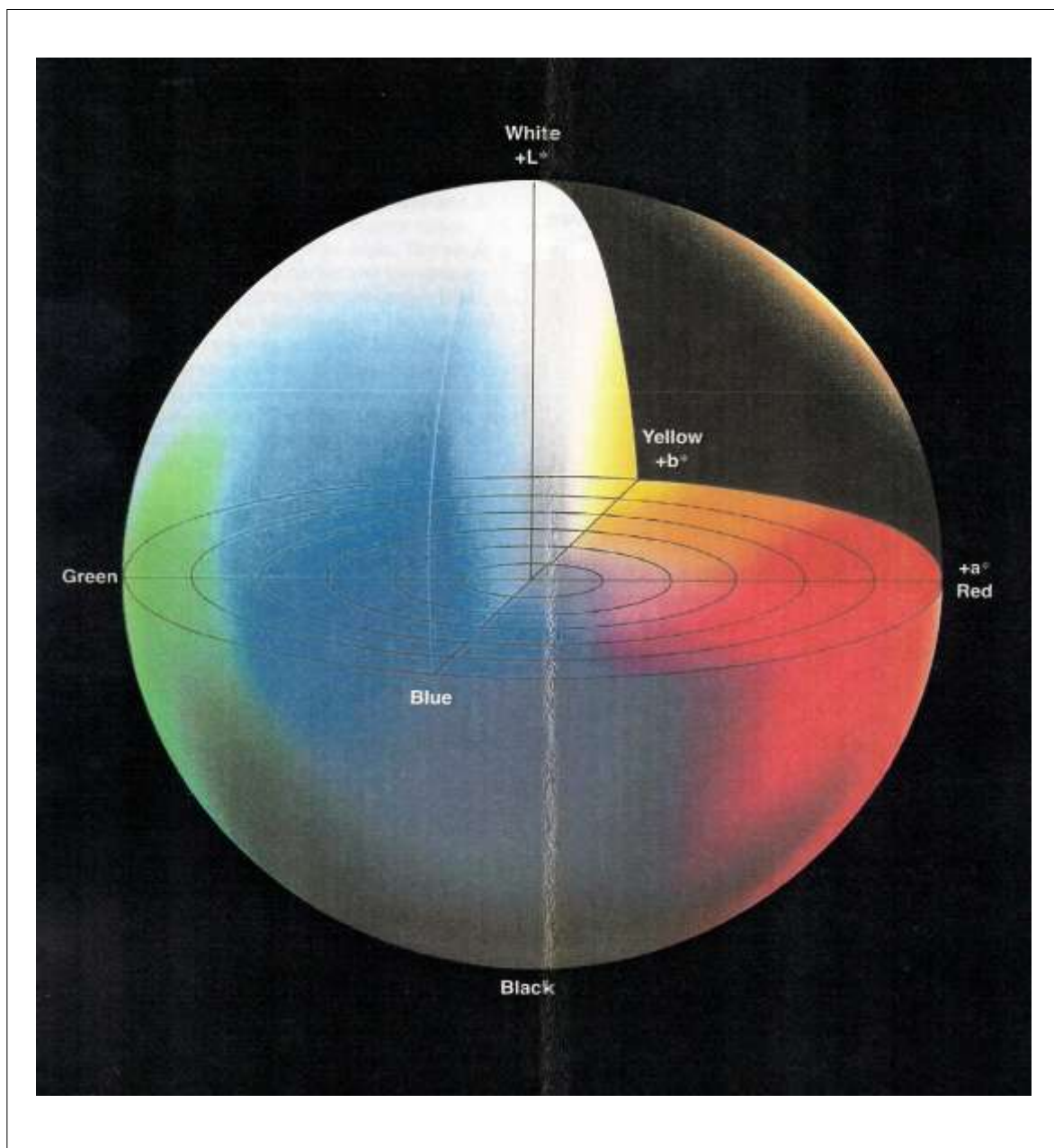


Figura 2.8.

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

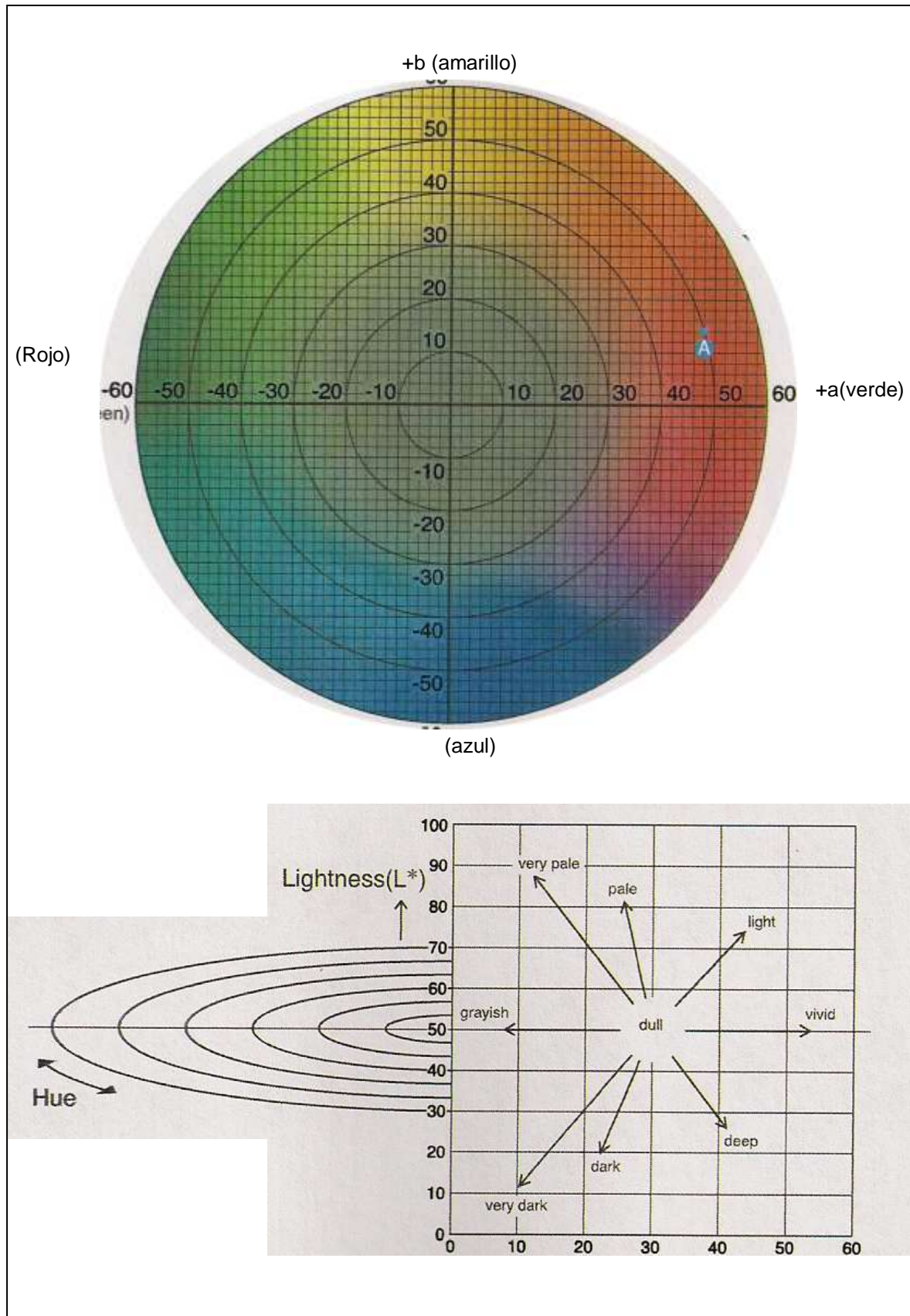


Figura 2.9.

Corte horizontal y vertical del Diagrama de cromaticidad del espacio de color $L^*a^*b^*$.

2.5.2.2. Espacio de color L*C*h*

El espacio de color L*C*h*, utiliza el mismo diagrama que el espacio L*a*b* con la diferencia de que aplica coordenadas cilíndricas en lugar de rectangulares. Para este espacio, L indica claridad al igual que el método anterior, C es cromaticidad y h es el ángulo de color. El valor de croma C, es cero en el centro y aumenta con la distancia al mismo. El ángulo de color h comienza en el eje +a y está expresado en grados. Así +a* (rojo) sería 0°, +b* (amarillo) 90°, -a* (verde) 180° y -b* (azul) 270° (Figura 2.10.).

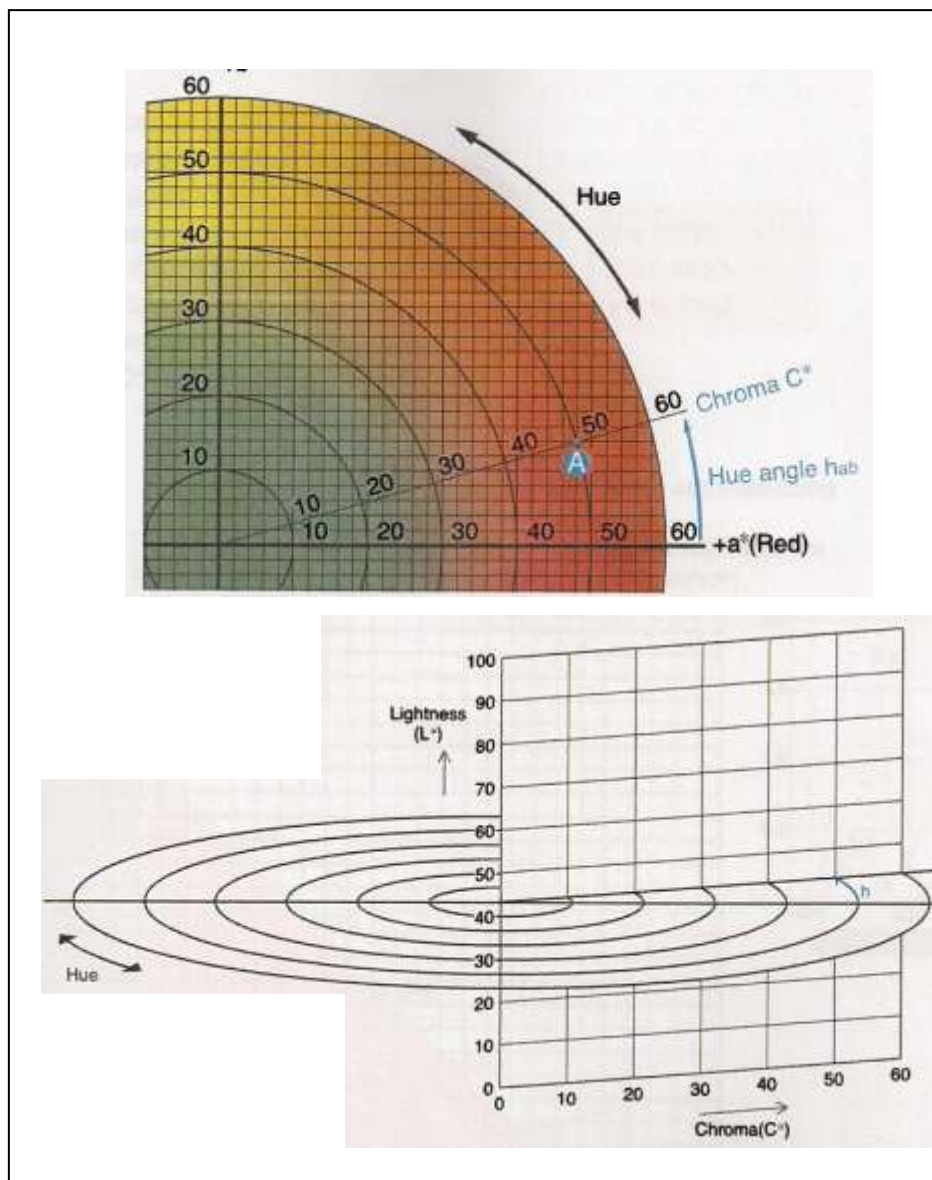


Figura 2.10.

Diagrama de cromaticidad del espacio de color L* C* h* (cortes horizontal y vertical).

2.5.2.3. Espacio de color XYZ

El concepto de valores triestímulo XYZ, está basado en la teoría de los tres componentes de la visión del color, que establece que el ojo posee receptores para los tres colores primarios (rojo, verde y azul) y que todos los demás colores son mezcla de estos tres. La CIE definió en 1931 el Observador Estándar, para obtener las funciones de combinación de colores $x(\lambda)$, $y(\lambda)$ y $z(\lambda)$ utilizadas para determinar los valores triestímulo XYZ. Estos valores XYZ son útiles para definir un color, pero el resultado no se visualiza fácilmente. Por esta razón la CIE definió también en 1931 un espacio de color, con gráficos de color en dos dimensiones independientes de la claridad. Este es el espacio Yxy en el cual Y es la claridad (idéntico al valor Y triestímulo) y x e y son las coordenadas de cromaticidad calculadas a partir de los valores triestímulo XYZ (Figura 2.11.). En este diagrama los colores acromáticos están en el centro y la cromaticidad aumenta hacia los bordes (Konica Minolta, 2007).

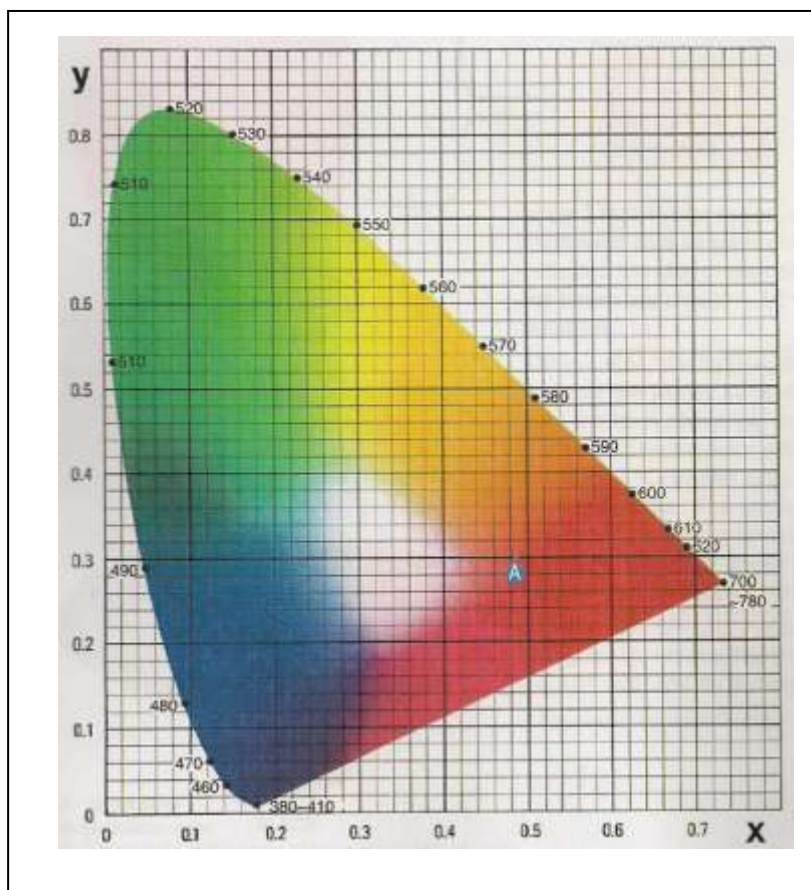


Figura 2.11.

Diagrama de cromaticidad xy para el espacio de color XYZ.

2.5.3. MEDIDA DE LA DIFERENCIA DE COLOR

Las pequeñas diferencias de color son el mayor obstáculo en el uso del color. Sin embargo, con un medidor de color hasta las más pequeñas diferencias pueden ser expresadas numéricamente de forma sencilla (Figura 2.12.).

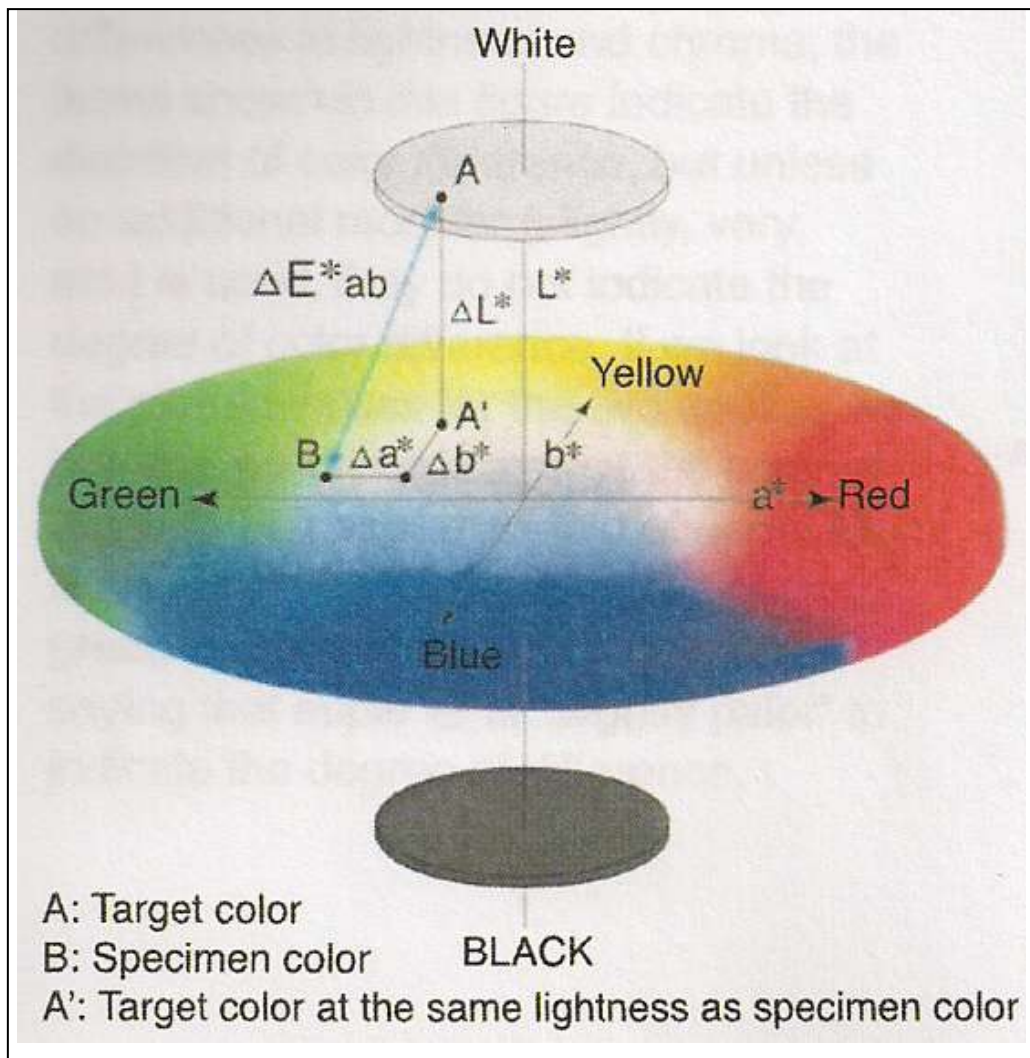


Figura 2.12.

Diferencias de color en el espacio $L^*a^*b^*$.

En el espacio de color $L^*a^*b^*$, las diferencias de color pueden ser expresadas con un único valor ΔE^*_{ab} , que indica el valor de la diferencia, pero no el camino en que se produce. ΔE^*_{ab} se define con la siguiente ecuación:

$$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

Ecuación 2.1.

A pesar de no ser tan exactas como los números, se pueden utilizar palabras para expresar diferencias de color (Konica Minolta, 2007). La Figura 2.13. muestra algunos términos utilizados para describir diferencias en claridad y croma o saturación. Sin embargo, estos términos indican dirección de la diferencia de color, por lo que es necesario introducir modificadores adicionales para aportar también el grado de esta diferencia.

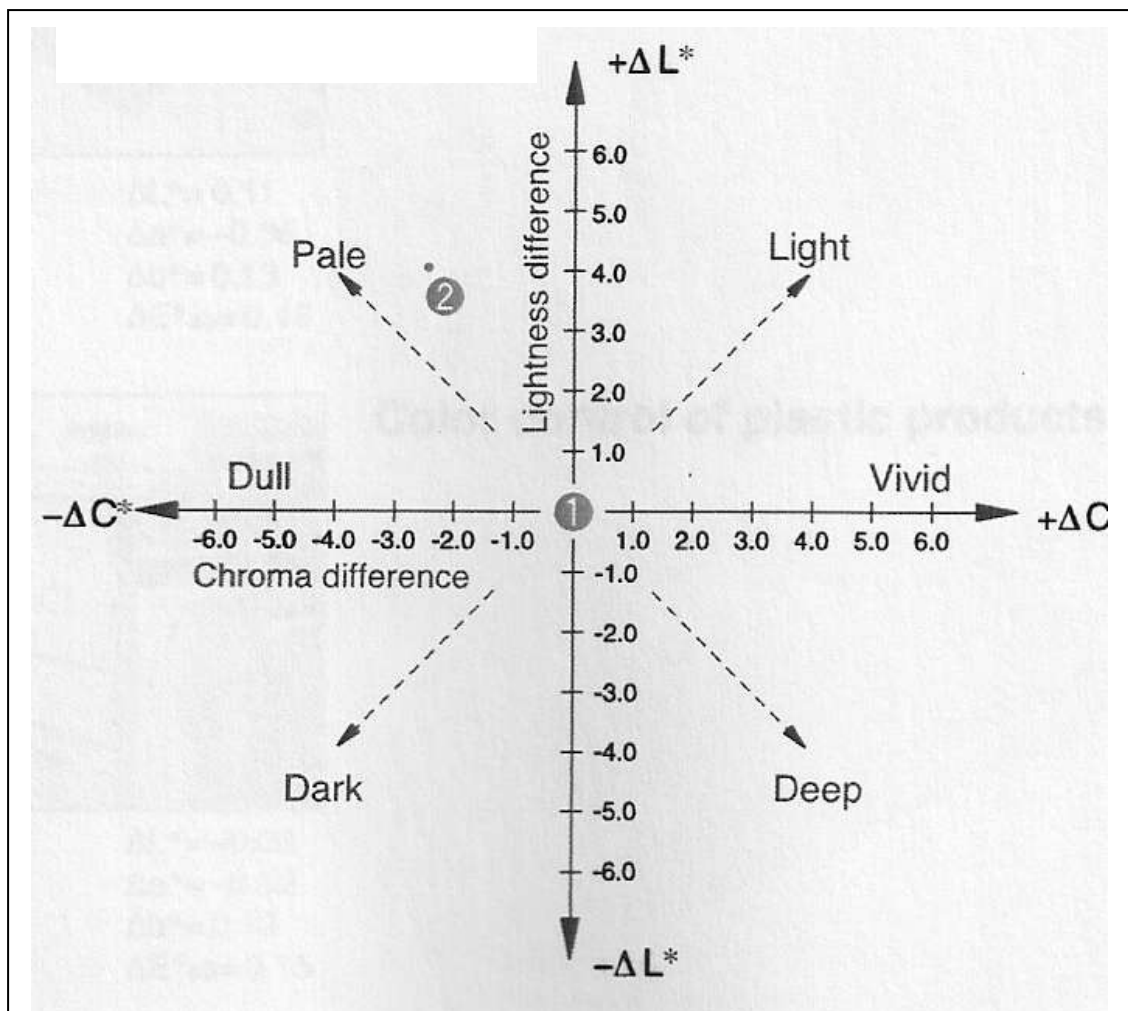


Figura 2.13.

Términos para describir diferencias de color en claridad y saturación.

2.5.4.-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.

2.5.2.1.-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 organismos 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 inoocuos en términos generales.

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).



2.5.2.2.- Colorantes en alimentación

2.5.2.2.1.-Razones para el uso de colorantes

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).

Los colorantes son aditivos que se utilizan en los alimentos por muchas razones: para compensar la pérdida de color que se produce por la exposición a la luz, aire, temperaturas extremas, humedad y condiciones de almacenamiento, corregir las variaciones naturales del color, realzar los colores naturales y proporcionar colores atractivos a aquellos alimentos que carecen de color. Así pues, sin los colorantes, la margarina no sería amarilla, el helado de menta no sería verde o la coca cola marrón. En la actualidad se reconoce a los colorantes como una parte importante de casi todos los alimentos procesados que consumimos.

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 transporte y conservación, dan lugar a que los colores naturales de los alimentos se modifiquen o deterioren. 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 sus parámetros característicos de tono, brillo y saturación. 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.



2.5.2.2.2. Importancia de los colorantes naturales

Desde las primeras civilizaciones, los colorantes se han utilizado para proporcionar un aspecto más atractivo a los productos elaborados por el hombre (Tabla 2.9.). La práctica de la coloración de alimentos tiene una larga tradición, ya que algunos productos naturales como el azafrán o la cochinilla, se conocen desde hace mucho tiempo. Esta práctica alcanzó su apogeo con el desarrollo de la industria de los colorantes orgánicos de síntesis en el siglo XIX.

La utilización de estos nuevos colorantes acarrió serios problemas de salud. Así, el uso de cromato de plomo y sulfato de cobre como colorante de caramelos y col fermentada, fue causa de muertes por la presencia de arsénico y otras impurezas tóxicas. Simultáneamente, se desarrollaron un amplio número de colorantes sintéticos procedentes del alquitrán y otros derivados del petróleo, utilizados no solo en alimentación sino en medicina y cosmética pero cuya importancia fue decayendo a lo largo de los años.

Actualmente, el mercado de los colorantes naturales ha crecido considerablemente. Se estima que los colorantes exentos de certificación suponen el 58% del mercado global de colorantes. Así, el uso de productos químicos para la producción de alimentos presenta un declive frente a los colorantes naturales, tendencia que según los expertos continuará durante los próximos 20 años.



Tabla 2.9.

Detalles de la evolución del uso de colorantes

Primeras civilizaciones	<p>Coloreado de caramelos (Egipcios, 1500 B.C.)</p> <p>Tinción del vino (400 B.C.)</p> <p>Uso de colorantes naturales para colorear productos artificiales. El azafrán se utiliza para la pigmentación de la mantequilla.</p> <p>Empleo de colorantes inorgánicos (Cromato de plomo, sulfato de cobre) en la producción de caramelos y col fermentada.</p>
Siglo XIX	<p>Síntesis del color púrpura o malva a partir de la destilación del carbón de hulla (1856).</p> <p>Síntesis de para rojo, lithal rojo y hansa amarillo como colorantes.</p> <p>Uso de colorantes procedentes del alquitrán y otros derivados del petróleo en alimentación, cosmética y medicina.</p>
1905	<p>Síntesis de Rojo 3 (Toluidine rojo)</p>
1938	<p>Alrededor de 200 colorantes sintéticos son catalogados por la FDA hasta 1960.</p>
1960-1970	<p>Crítica de los colorantes alimenticios.</p> <p>El mercado de los colorantes naturales se valora en 250 millones de dólares (US).</p>
1994	<p>El crecimiento anual del mercado de los colorantes naturales es del 5 al 10% mientras que el de los sintéticos del 3 al 5%.</p>
2002	<p>El mercado de los colorantes naturales está valorado en un billón de dólares.</p>



2.5.2.3.-Seguridad de los colorantes alimenticios

2.5.2.3.1.-Aspectos legales en la regulación de colorantes

Los colorantes han sido uno de los primeros productos regulados legalmente. Así, la coloración de productos lácteos fue el primer proceso sujeto a normativa. En 1904, Estados Unidos aprobó la creación de normas específicas para aditivos desarrollando para ello estudios toxicológicos dirigidos por científicos alemanes. De estos análisis se dedujo que 16 de los colorantes evaluados presentaban resultados dudosos, 8 eran inseguros y 16 inofensivos, que fueron probados en perros, ratones y humanos. Esta nueva legislación se aplicó a partir de 1906 de manera que solo 7 colorantes fueron catalogados como colorantes alimenticios.

A partir de 1936, se establece que la autoridad responsable de evaluación de colorantes antes de su comercialización es la FDA que retoca la nueva lista en 1938. Simultáneamente, se crea un catalogo de colores generado por colorantes solubles en agua obtenidos a partir de pigmentos sintéticos certificados y de hidróxido de aluminio. Entre 1936 y 1960 se realizaron nuevos estudios sobre la seguridad de estos pigmentos y se encontró que algunos de ellos no eran seguros. A partir de aquí, la FDA impuso una serie de restricciones químicas sobre los niveles de impurezas permitidas en los colorantes y comenzó a retirar aquellos lotes que no cumplieren las especificaciones. Otro ejemplo de actuación de la FDA, fue el etiquetado de colorantes que permitía dar nombre específico a cada uno de ellos (1990).

La FDA clasificó a los colores permitidos en dos grupos: los que necesitan certificación y los exentos de certificación. Igualmente ambos debían pasar rigurosos estándares de seguridad antes de ser aprobados e incluidos en las listas de productos autorizados para usarse en los alimentos.

Los colores certificados son producidos artificialmente y se usan ampliamente porque producen colores intensos, uniformes, son más económicos y se combinan más fácilmente para crear una amplia variedad de tonalidades.



Los colores alimenticios certificados no añaden sabores indeseables a los alimentos. Los colorantes que están exentos de certificación, incluyen a los pigmentos que se derivan de fuentes naturales como las verduras, los minerales o los animales. Los colorantes derivados de productos naturales son en términos generales más costosos que los artificiales y pueden producir sabores no deseados. Algunos ejemplos de estos colorantes son: extracto de annatto (amarillo), remolachas deshidratadas (rojo azulado o marrón), caramelo (amarillo a tostado), betacaroteno (amarillo a naranja) y extracto de hollejo de uva (rojo, verde).

La introducción de nuevos colorantes como aditivos alimenticios es una tarea difícil y costosa. Así, el colorante rojo nº 40 FD&C, es el único colorante sintético aprobado desde 1974 cuyo uso se sigue permitiendo y cuya evaluación costó 2'5 millones de dólares a la FDA.

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 los compuestos permitidos para la coloración de alimentos, así como sus criterios de pureza y niveles máximos autorizados.

En la actualidad, motivado por el desarrollo de una nueva normativa sobre aditivos alimentarios (Reglamento 1333/2008) la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) 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.

La agencia europea analiza los colorantes que se usan en refrescos, productos de panadería, postres, salsas, condimentos y encurtidos. En el último



año, la EFSA ha publicado, a través del Panel de Aditivos Alimentarios y Fuentes de Nutrientes añadidos a los Alimentos, datos sobre tres nuevos colorantes.

Para el colorante Negro Brillante BN (E 151), que puede usarse en diferentes alimentos como refrescos, productos de panadería y postres, el panel considera apropiada la ingesta diaria admisible (IDA) de cinco miligramos (mg) por kilogramo de peso corporal, establecido por el Comité Científico sobre la Alimentación humana en 1984. El panel concluye que sólo algunos niños que consumen de forma regular cantidades elevadas de alimentos que contienen el colorante, podrían exceder el nivel de ingesta.

En cuanto al colorante Marrón HT (E 155), que puede usarse también en refrescos, productos de panadería y confitería, así como en salsas, condimentos y encurtidos, el panel ha reducido a la mitad el IDA, hasta dejarlo en 1,5 mg/kg de peso corporal. Esto se debe a que se han constatado efectos adversos, como ligera reducción en la ganancia de peso en animales, tras un largo periodo de ingesta de este colorante en niveles inferiores a aquellos usados para determinar la IDA en evaluaciones previas (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003). Con base en los niveles máximos de uso permitidos de este colorante y en los datos de consumo de alimentos en diferentes países, el panel indica que la exposición al Marrón HT podría estar por encima del nuevo IDA en adultos y niños que consumen de manera habitual, grandes cantidades de alimentos que contienen el colorante.

Sin embargo, el panel de EFSA no fue capaz de llegar a una conclusión con relación a la seguridad del colorante Marrón FK (E 154) debido a la escasez de datos toxicológicos disponibles. El panel ya publicó en noviembre de 2009 opiniones sobre otros seis colorantes y debe realizar la reevaluación de los colorantes restantes en los próximos meses.

Así, la Comisión Europea, tendrá que debatir los resultados de estas revisiones de la EFSA, con vistas a reducir el uso de estos colorantes en los alimentos o limitar los alimentos para los que están autorizados su uso, de forma



que la ingesta de estos aditivos a través de la dieta no supere las nuevas IDAs fijadas.

2.5.2.3.2. Toxicología de los colorantes

Los estudios toxicológicos realizados a los colorantes tienen como objetivo el determinar qué posibles efectos adversos podrían tener así como encontrar las cantidades de los mismos que pueden ser añadidas a los alimentos sin que lleguen a ser perjudiciales para la salud humana.

A partir del año 1993, las sustancias evaluadas por la FDA se agruparon en tres niveles. Esta clasificación esta basada en la estructura química y las características toxicológicas conocidas. Los colorantes sintéticos se encuentran en el tercer nivel, que es el más riguroso y el que requiere de mayores test de evaluación. Para que un colorante sintético obtenga la aprobación de La FDA deben llevarse a cabo los siguientes estudios:

1. Estudio a corto plazo. Se alimenta a un no roedor, por ejemplo un perro, durante 90 días.
2. Ensayo de toxicidad en ratas.
3. Estudio a largo plazo. Se alimenta durante al menos 24 a 30 meses a dos especies animales.
4. Estudio teratológico.
5. Estudio de reproducción de varias generaciones en ratones.
6. Test in vitro para estudiar cambios mutagénicos.

Por otro lado, algunos colorantes naturales se han clasificado en niveles menos exigentes que los sintéticos. Por esta razón, la información toxicológica de los pigmentos naturales es más escasa que la de los colorantes sintéticos (Tabla 2.10. y Tabla 2.11.) siendo el caramelo, el único colorante exento de certificación que ha sido más ampliamente estudiado.

Actualmente, tanto los colorantes certificados como los exentos, están sujetos a ensayos toxicológicos y se debe establecer para cada uno de ellos su



cantidad diaria recomendada (ADI). Para obtener el valor de ADI, es necesario determinar la dosis a la cual no existen efectos nocivos. Esta dosis se llama “nivel sin efecto adverso observable” (NOAEL). Otro valor también determinado, es el LOAEL o “nivel mínimo de efecto adverso observable”. Ambos valores se obtienen realizando estudios con animales, por lo que habrá que tener en cuenta que sus metabolismos no son iguales a los del ser humano. Incluso, dentro de una misma especie, las respuestas pueden variar de un individuo a otro. Todos estos factores habrá que tenerlos en cuenta a la hora de calcular el factor ADI. Por esta razón, para determinar su valor se divide el valor del nivel sin efecto adverso observable, por un factor de seguridad que comúnmente es de 100 (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003). Este factor de seguridad se obtiene como el producto de otros dos factores, un factor de variación entre especies (en este caso de animales a humanos) cuyo valor es 10 y otro factor de variación dentro de la misma especie del mismo valor.

$$ADI = \frac{NOAEL}{FACTOR}$$

Ecuación 2.2.



Tabla 2.10.

Estudios de toxicidad y seguridad de algunos colorantes certificados realizados en ratas.

Colorante	Condiciones	Resultados
Amaranto	30 mg /día/ 545 días, administración oral	Distrofia vacuolar y degeneración grasa en el hígado.
Amarillo ocase	250 mg/kg, 2 veces al día, subcutánea, 3 días	Ningún efecto.
Tartracina	0, 0'5, 1, 2, 5% de la dieta, 2 años	Diarrea entre el 2 y el 5% y aparición de material arenoso en la pelvis renal en el 5%.
Rojo cochinilla A	250 mg/kg/día/ 3 días, subcutánea	Ningún efecto.
Azul brillante	20 o 30 mg/ inyección/ 1 o 2 inyecciones/semana, 45 semanas o 2 años, subcutánea	Fibrosarcomas en el lugar de inyección solo tras la dosis de 2 años, atribuida a trauma y regeneración más que a carcinogénesis química.
Carmín Índigo	0'5, 1, 2, 5% de la dieta, 2 años	Inhibición del crecimiento entre el 2 y el 5%.
Eritrosina	0, 0'25, 1, 4% de la dieta/ 3 generaciones	Disminuye el peso del cuerpo en el nivel 4% aunque el consumo alimenticio es normal. No se producen efectos adversos en fertilidad y gestación.



Tabla 2.11.

Estudios de toxicidad y seguridad de algunos colorantes exentos de certificación realizados en ratas.

Colorante	Condiciones	Resultados
Annato	250-500 mg/kg bw/ 3 generaciones.	Ningún efecto.
B-caroteno	1000 ppm/2 años	Ningún efecto
Antocianinas	7'5 o 15% de la dieta/ multigeneraciones	Ningún efecto en la reproducción
Caramelo	5, 10 o 15% y 2, 4, 6% de la dieta/ 104 semanas	Disminuyen los valores de hemoglobina, hematocritos y leucocitos.
Carmín	50, 150 o 500 mg/kg bw/día/ 3 generaciones	Ningún efecto.
Betatina	2 generaciones: 17 g en I padres y 24g en la primera generación.	Fibroadenomas mamarios

2.5.2.4.-Clasificación y características de los colorantes alimentarios

2.5.2.4.1. Colorantes sintéticos

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 ocazo (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 cochinilla 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 cochinilla (E120).
- **Rojo Allura AC (E129):** Su uso está restringido en los productos cárnicos y en los de confitería.
- **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.

- **Quinoleínas:** los colorantes de quinoleínas 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 **carmín índigo (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.

2.5.2.4.2. Colorantes naturales

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 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.





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.
- 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.
- 2-β-Mercaptoetanol. Sigma.
- Metanol. Probus y Merck uvasol.
- Patrones de pesos moleculares para electroforesis (14400-94000 Da).



Pharmacia.

- Persulfato amónico. Panreac.
- Perclorato sódico. 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 de estado estacionario:

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 termostatable 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.

- 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 μl . 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 $\pm 0'15$ °C y precisión de $\pm 0'8$ °C. Tiene capacidad para 3 columnas de 30 cm. Los volúmenes internos de los intercambiadores derecho e izquierdo son 6 y 3 μl 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 < 1 nm. 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 μ l, 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 μ m. La fase estacionaria es una densa monocapa de dimetil-n-octilsilano.
- Mediterranea Sea4 de Teknokroma, de dimensiones 250·10'0mm, 5 μ m.
- Vydac protein C4 de Grace, de dimensiones 250·4'6mm, 5 μ m.

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

- Centrífugas:

Se han utilizado tres modelos de centrífugas. 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 ± 0.1 mg y el tiempo de respuesta de 3 seg.

- Granatario:

Se ha utilizado un Granatario Scaltec modelo SAC 51 (Genesys Instrumentación) ($200 \text{ g} \pm 0.01 \text{ g}$).

- 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 (diámetro x altura):

- 1.5 · 50 cm (Pobel).
- 2.5 · 50 cm (Pobel)
- 4 · 50 cm (Pobel)
- 6 · 50 cm (Pobel)
- 9 · 50 cm (Pobel)



- 15 · 130 cm (Pobel)

Para el caso de la cromatografía de intercambio iónico convencional se ha utilizado una columna de 9 · 50 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).

- 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 1'5 cm 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 International). El cierre hermético de dichas membranas se ha conseguido mediante pinzas de 8 cm suministradas por Spectrum Medical Industries y pinzas 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 μl y una Agilent de 50 μl de capacidad. Para la aplicación de muestras proteicas en gel de electroforesis se han usado microjeringas Hamilton (capacidad de 10 μl).

3.1.3.-MATERIAL BIOLÓGICO**- Microalga:**

Para la obtención de B-PE se ha utilizado la microalga roja *Porphyridium cruentum*. Ésta ha sido cultivada en los correspondientes fotobiorreactores por el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería y liofilizada para su transporte (Imagen 3.1.).



Imagen 3.1.

Biomasa liofilizada de la microalga *Porphyridium cruentum*.

- Muestras de alimentos y bebidas:

Las muestras alimenticias utilizadas para los ensayos de colorimetría han sido: batidos comerciales, yogures, yogures líquidos, bebidas gaseosas, mostos, bebidas isotónicas, licores sin alcohol y helados de diferentes marcas comerciales existentes en el mercado.

3.2.-METODOS

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.)

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

Ecuación 3.1.

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

Ecuación 3.2.

$$I = \frac{1}{2} (\sum Z_i^2 \cdot m_i)$$

Ecuación 3.3.

Disoluciones tampón fosfato pH 7

El segundo pK_a del ácido fosfórico es 7'097 y el equilibrio implicado es:



Entonces la expresión de la constante de equilibrio vendría dada por:

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



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

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

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).

$$7.097 = pH - \log \frac{m_{HPO_4^{2-}}}{m_{H_2PO_4^-}} - \log \frac{\gamma_{HPO_4^{2-}}}{\gamma_{H_2PO_4^-}}$$

$$7.097 = pH - \log \frac{m_{HPO_4^{2-}}}{m_{H_2PO_4^-}} - (\log \gamma_{HPO_4^{2-}} - \log \gamma_{H_2PO_4^-})$$

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

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

Por tanto, sustituyendo los correspondientes valores de carga queda:

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

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 $m_{H_2PO_4^-}$):

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

Ecuación 3.4.

Además, 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 :



$$I = \frac{1}{2} (2^2 \cdot m_{\text{HPO}_4^{2-}} + 2 \cdot 1^2 \cdot m_{\text{Na}^+} + 1^2 \cdot m_{\text{K}^+} + 1^2 \cdot m_{\text{H}_2\text{PO}_4^-})$$

$$I = m_{\text{KH}_2\text{PO}_4} + 3 \cdot m_{\text{Na}_2\text{HPO}_4}$$

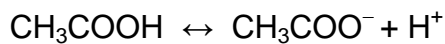
Ecuación 3.5.

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.

Disoluciones de tampón acetato pH 5'5

Análogamente, 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, y el equilibrio implicado es:



Por tanto, haciendo un desarrollo similar al anterior:

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

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

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

Sustituyendo el valor de $\text{pK}_a = 4'7$ y las actividades por su expresión $a = c \cdot \gamma$ ($c =$ concentración y $\gamma =$ coeficiente de actividad).

$$4'7 = \text{pH} - \log \frac{m_{\text{CH}_3\text{COO}^-}}{m_{\text{CH}_3\text{COOH}}} - \log \frac{\gamma_{\text{CH}_3\text{COO}^-}}{\gamma_{\text{CH}_3\text{COOH}}}$$



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

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

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

Sustituyendo los correspondientes valores de carga queda:

$$4.7 = pH - \log \frac{m_{CH_3COO^-}}{m_{CH_3COOH}} - ([-0.511 \cdot \left[\left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \right) - 0.3 \cdot I \right]] - [-0.510 \cdot \left[\left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \right) - 0.3 \cdot I \right]])$$

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 $m_{CH_3COO^-}$):

$$-0.8 = -\log \frac{m_{CH_3COO^-}}{m_{CH_3COOH}} - [-0.511 \cdot \left[\left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \right) - 0.3 \cdot I \right]] \quad \text{Ecuación 3.6.}$$

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 :

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

$$I = m_{CH_3COOH} + m_{CH_3COONa} \quad \text{Ecuación 3.7.}$$

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.



Es importante resaltar que 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.

A título de ejemplo, la Tabla 3.1. muestra las cantidades necesarias de ambas sales para preparar disoluciones de tampón acetato pH 5'5 de diferentes valores de fuerza iónica.

Tabla 3.1.

Concentraciones necesarias de los reactivos implicados para preparar las disoluciones de tampón acetato pH 5'5 con diferentes valores de fuerza iónica.

Fuerza iónica (mM)	Acetato sódico (g/l) Pm= 82'03 g/mol	Ácido acético (g/l) Pm= 60 g/mol
1000	72'92	6'66
500	72'04	7'30
100	70'11	8'71
50	69'41	9'22

3.2.2.-TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

En este apartado se describe el proceso utilizado para la extracción y purificación de B-PE procedente de *Porphyridium cruentum*. La metodología desarrollada se muestra en la Figura 3.1.



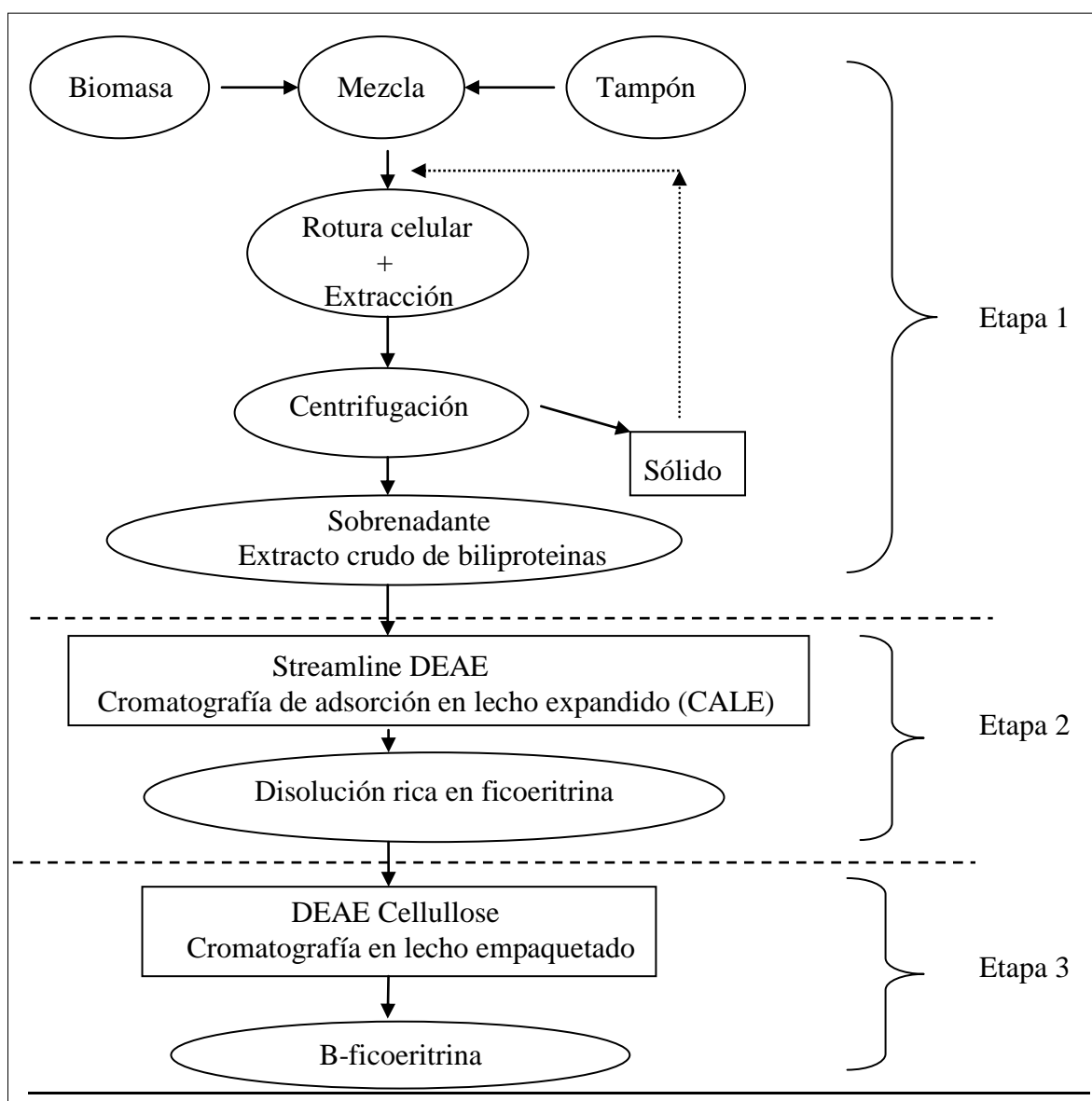


Figura 3.1.

Esquema del proceso de extracción y purificación de B-PE.

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 la especie microalgal liofilizada y añadiéndoles 40 ml de tampón. 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 del interior celular. Una vez concluida la agitación, se centrifugó la mezcla a 12000 rpm durante 15 min, obteniéndose un sobrenadante granate y un sólido

marrón oscuro. Se retiró el sobrenadante y se cuantificó mediante medidas de absorbancia la cantidad de biliproteína añadiendo sobre el residuo sólido otros 30 ml de tampón, volviéndose a repetir el proceso. Este proceso se repitió tantas veces como fue necesario para la completa extracción de las biliproteínas utilizando tampón acetato pH 5'5 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. Para ello se midió la absorbancia del sobrenadante de cada extracción a las longitudes de onda características de cada biliproteína y se aplicaron las ecuaciones siguientes (Bennett y Bogorad, 1973; Bryant y col., 1979):

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

Ecuación 3.8.

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

Ecuación 3.9.

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

Ecuación 3.10.

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. Así, se estudió con cual de ellos se extraía mayor cantidad de biliproteínas. Las extracciones se llevaron a cabo mezclando 2 gramos de la biomasa microalgal liofilizada, 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 granate y un residuo sólido marrón. Se retiró el sobrenadante y se cuantificó por medidas de absorbancia, añadiendo sobre el residuo sólido otros 40 ml de tampón, volviéndose a repetir el proceso hasta llevar a cabo tres extracciones (Figura 3.2.).

Análogamente a como se ha descrito con anterioridad, 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 3.10.

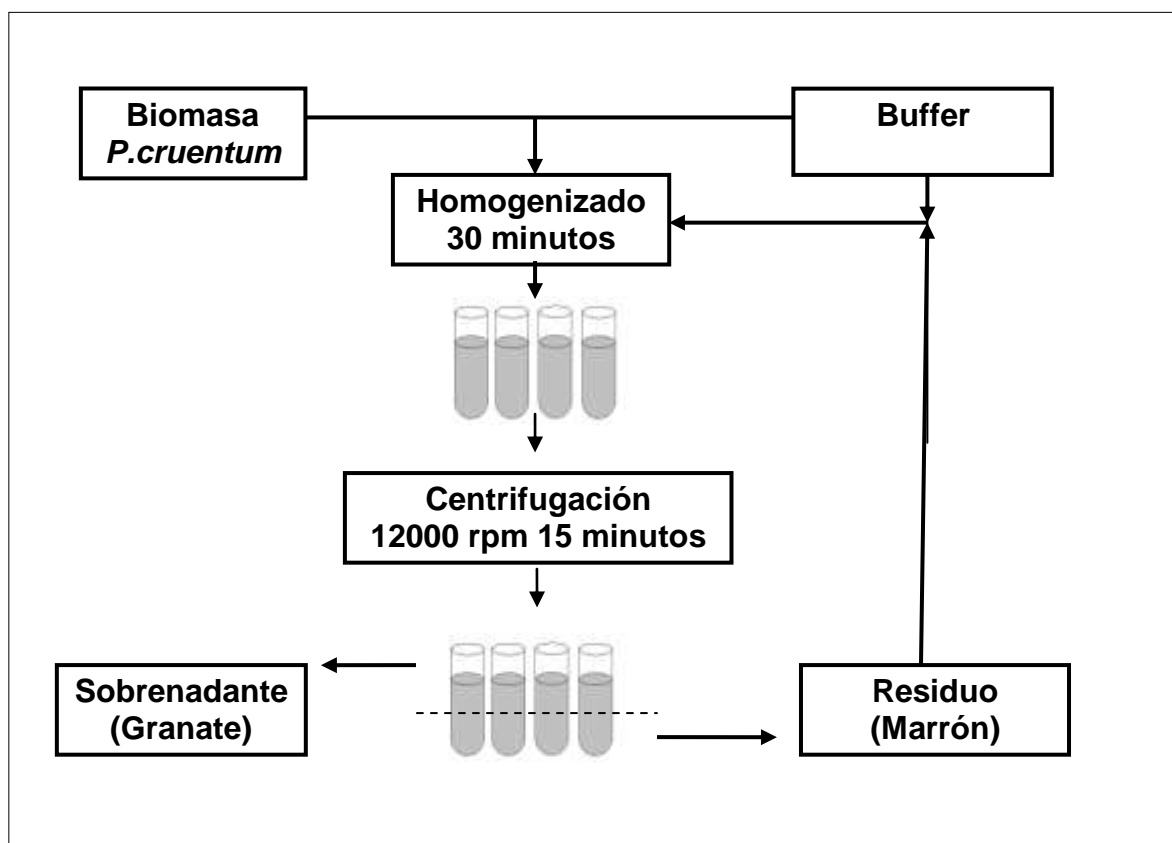


Figura 3.2.

Esquema de los tratamientos previos para purificación de B-PE de *Porphyridium cruentum*.

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: acetato pH 5'5 de fuerzas iónicas correspondientes a 1000 mM, 500 mM, 100 mM y 50 mM.

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 de extracción en la biomasa microalgal. Para ello se pesaron 12 gramos de biomasa y se mezclaron con 240 ml de tampón acetato pH 5'5 50mM. 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, 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 3.10.

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 una buena cantidad de extracto de B-PE 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 *Porphyridium cruentum* (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 B-PE 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 complementarias 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 B-PE, obtenido en los tratamientos previos y además B-PE pura, obtenida con anterioridad por nuestro grupo de investigación (Bermejo y col., 2003a).

A tal efecto, se prepararon dos series de disoluciones conteniendo B-PE de diferentes concentraciones, en tampón acetato 50 mM y pH 5'5: una serie partiendo de extracto crudo de B-PE (0-350 mg/l) y otra utilizando B-PE pura (0-230mg/l).

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 acetato pH 5'5 (50mM). Se colocaron todos los tubos 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 B-PE 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 3.3.).

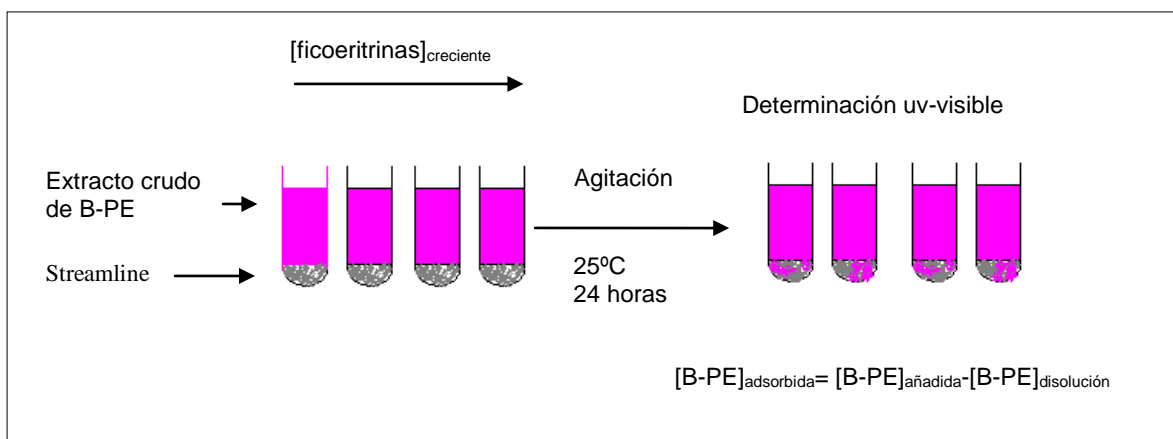


Figura 3.3.

Esquema del proceso seguido para la determinación de la capacidad estática de adsorción de ficoeritrinas sobre Streamline DEAE (Isoterma de adsorción).

Curva de ruptura

La capacidad dinámica se calculó a partir del perfil cromatográfico de la curva de ruptura. Para la realización de la curva de ruptura, se preparó un extracto crudo de B-PE con una concentración igual a 0'033 mg/ml para la alimentación de una columna de lecho expandido de 50 · 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 198 cm·h⁻¹. La fase móvil que abandona la columna se recoge en fracciones de 28 ml, las cuales se analizaron espectroscópicamente para determinar la concentración de B-PE (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 B-PE eluida de la columna en cada instante y C_0 la concentración del extracto crudo de B-PE que alimenta la columna. La experiencia se da por concluida cuando C/C_0 es aproximadamente $\geq 0'4$.

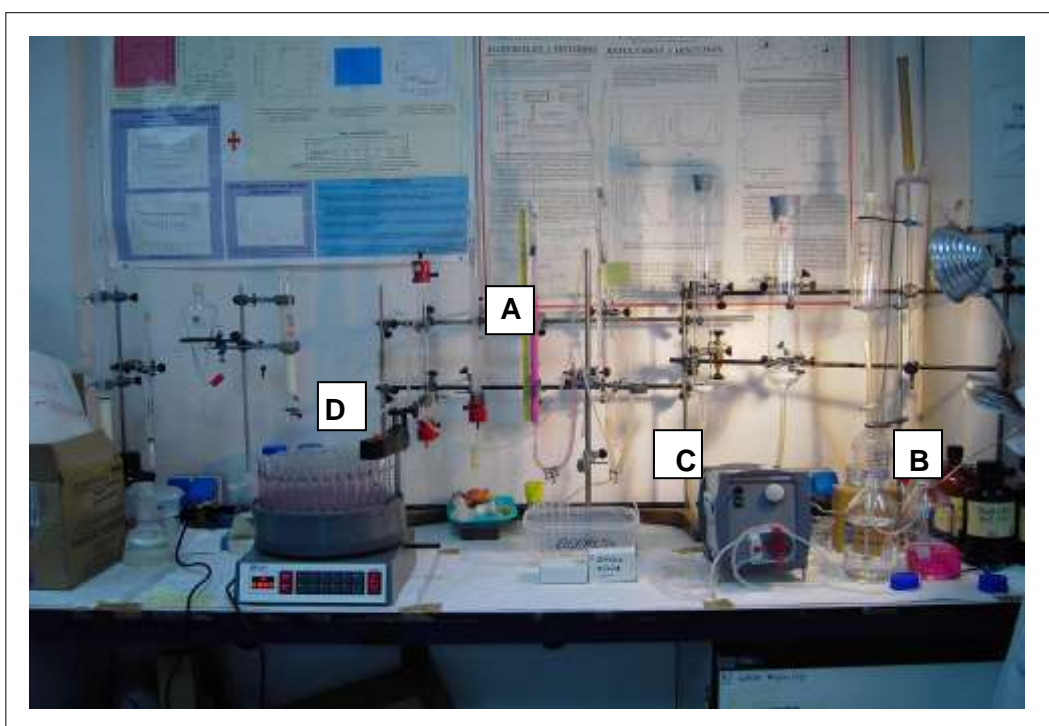


Imagen 3.3.

Sistema experimental para la determinación de la capacidad dinámica de adsorción, mediante realización de la curva de ruptura. a) Columna de CALE; b) Muestra: extracto crudo de B-PE; 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 $50 \cdot 2'5$, $50 \cdot 4$, $50 \cdot 6$, $50 \cdot 9$ y $130 \cdot 15$ cm (altura · diámetro). En el interior de la columna se ha colocado relleno cromatográfico hasta alcanzar una altura de lecho sedimentado de 15 cm (H_0) (50 cm para el caso de la planta piloto, columna $130 \cdot 15$). El relleno, convenientemente diluido con tampón acetato pH 5'5 (50 mM), 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 3.4.).

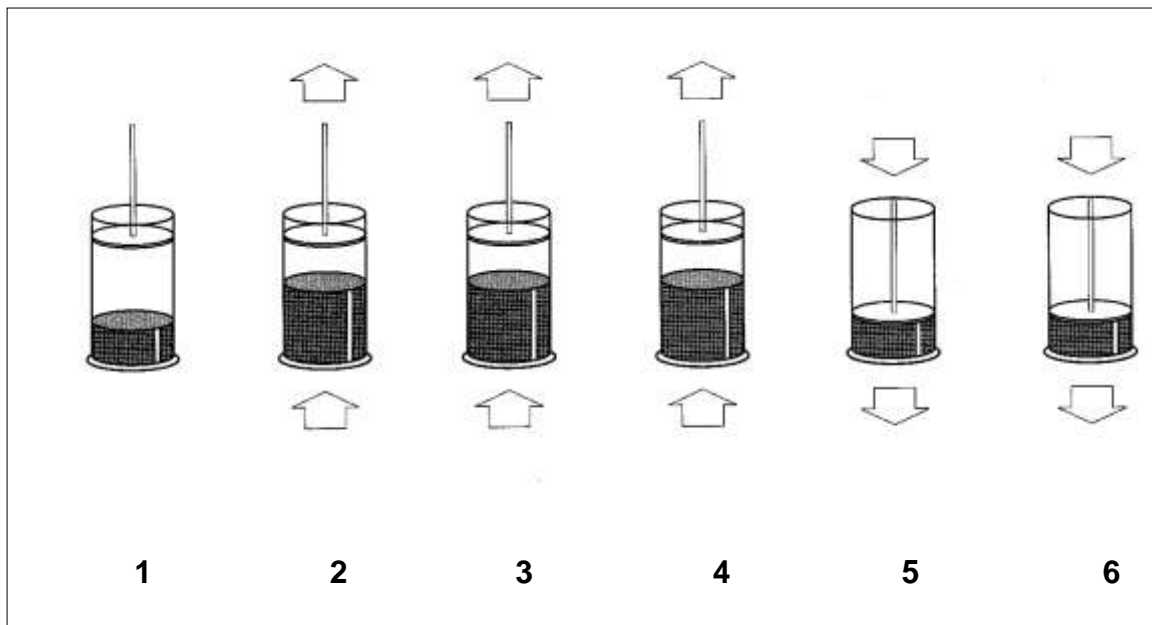


Figura 3.4.

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. Etapas 2, 3 y 4 en formato expandido y etapas 5 y 6 en formato empaquetado.

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 acetato pH 5'5 (50 mM)). 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 acetato pH 5'5 (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 acetato pH 5'5 (250 mM)) en sentido descendente.

La muestra eluída constituye un extracto rico en B-PE, 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 3.5. se muestra un diagrama esquemático del proceso de cromatografía de adsorción en lecho expandido.



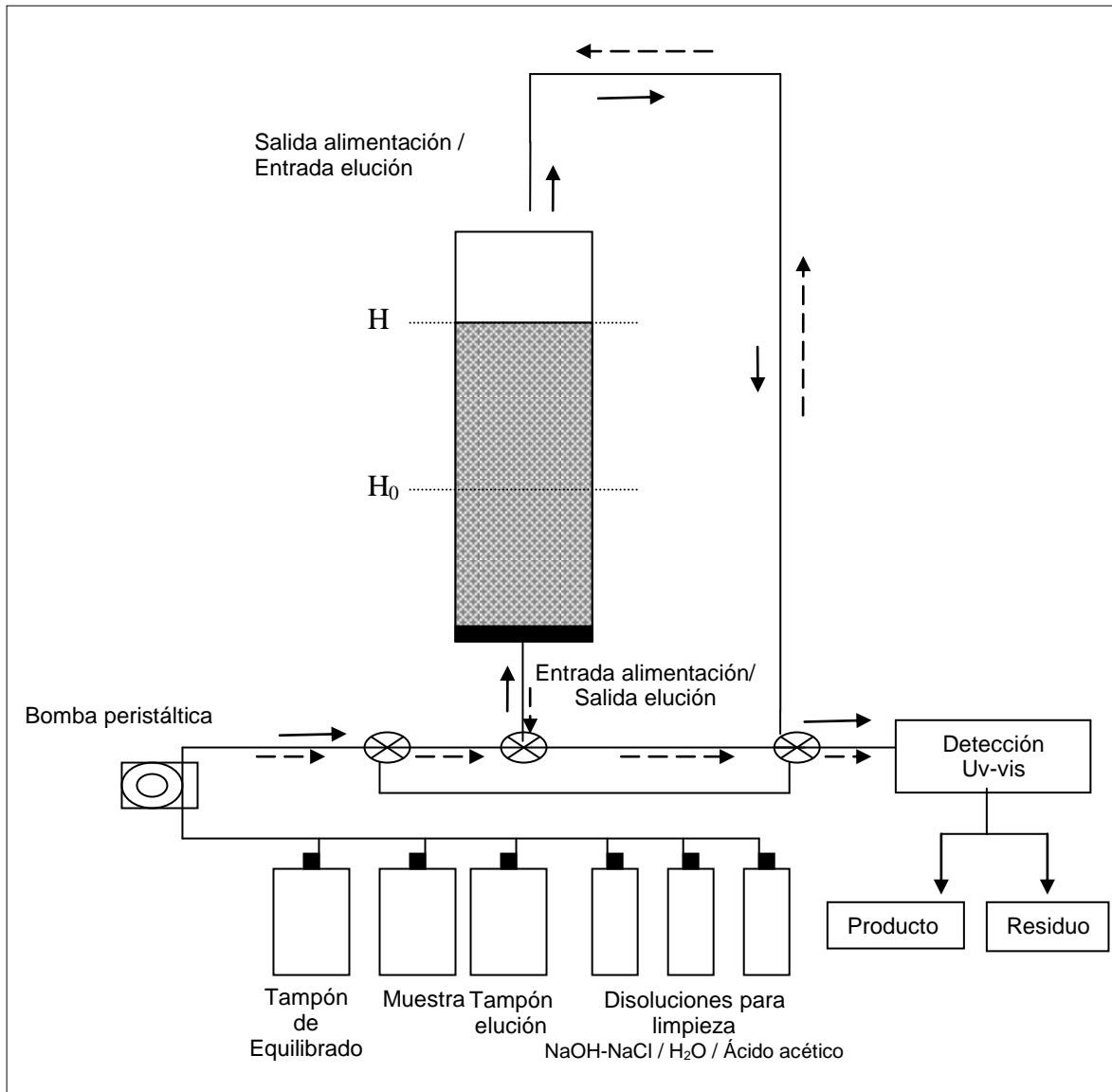


Figura 3.5.

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 (H/H_0) 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 0'88 mg B-PE/ml adsorbente, valor obtenido a través de la correspondiente curva de ruptura. El volumen de muestra utilizado ha sido de 710 ml. Se realizaron experiencias con valores de H/H_0 comprendidos entre 1'6 y 2'8, que fueron alcanzados utilizando

velocidades de flujo de fase móvil comprendidos entre 112 y 333 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$. Tras los diferentes experimentos, se evaluó el rendimiento de recuperación de B-PE 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 · 1'5 cm, con una altura inicial $H_0 = 15$ cm, volumen de relleno de 26'5 ml y carga proteica 0'88 mg B-PE/ml adsorbente. Se realizaron experiencias con valores de viscosidad de la muestra comprendidos entre 1'009 y 1'068 mP, obtenidos mediante dilución con tampón acetato pH 5'5 (50 mM) del extracto crudo procedente de los tratamientos previos de [B-PE] igual a 0'504 mg/ml.

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 y optimizados todos los parámetros de trabajo, las fracciones seleccionadas espectrofotométricamente, se reúnen y tratan convenientemente (Bermejo y col., 2003a), constituyendo un extracto rico en B-PE que será la muestra de partida para la tercera y última etapa de purificación basada en cromatografía de tipo convencional o en lecho empaquetado.



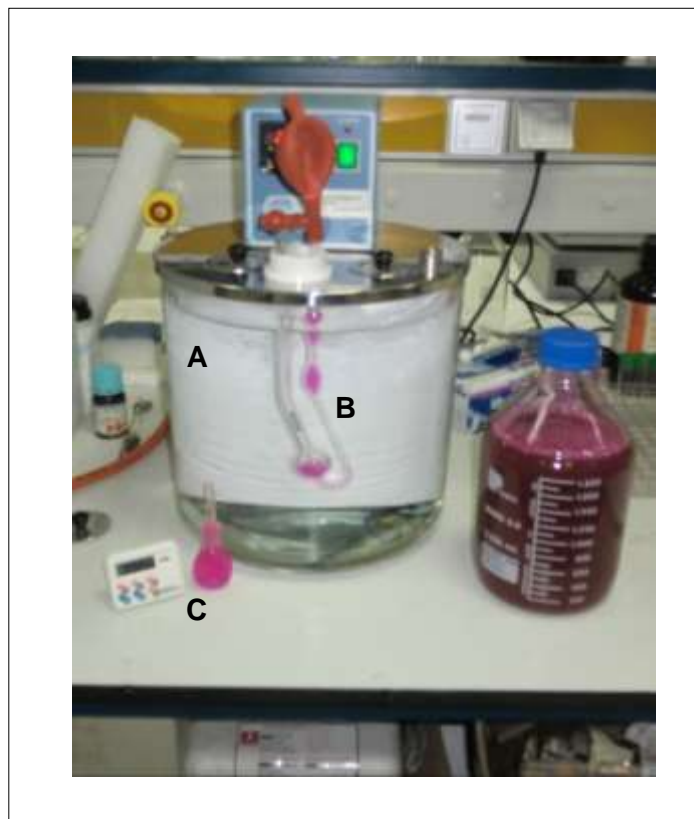


Imagen 3.4.

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

3.2.2.4.-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 acetato 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 acetato pH 5`5 (500mM) 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 (45 · 9 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 acetato pH 5'5 (50mM) (Imagen 3.5.).

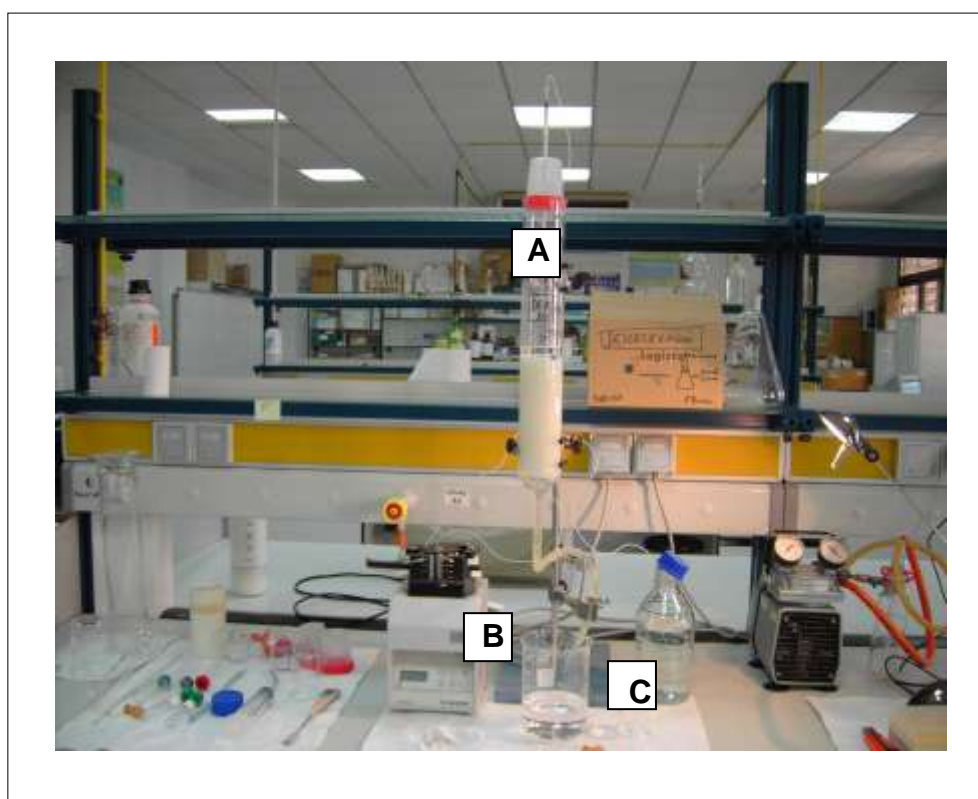


Imagen 3.5.

Sistema experimental para cromatografía de intercambio iónico. a) Columna cromatográfica (45 · 9 cm); b) Bomba peristáltica; c) Buffer.

La disolución enriquecida en B-PE procedente de CALE, se aplicó a la columna de intercambio iónico en diferentes experiencias, en las que el volumen de muestra cargado en columna fue de 40 ml (concentración en B-PE igual a 3'12 mg/ml). Se realizó un gradiente discontinuo de fuerza iónica a un pH constante e igual a 5'5, de tal forma que inicialmente se empezaba utilizando como fase móvil tampón acetato 50 mM, posteriormente se utilizaba fase móvil compuesta por tampón 250 mM y a continuación se utiliza el mismo tampón pero 500 mM (Figura 3.6.). Las fracciones de color rosa eluidas se recogieron y se analizaron espectroscópicamente y mediante electroforesis tipo SDS-PAGE.

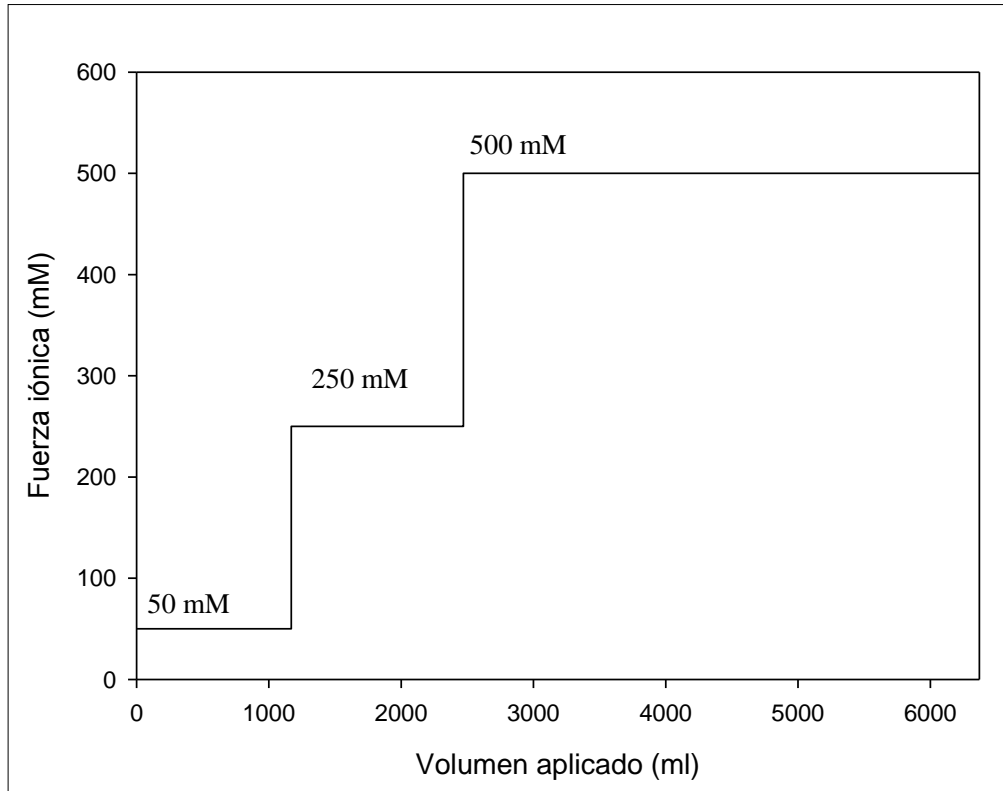


Figura 3.6.

Gradiente discontinuo de fuerza iónica utilizado para la purificación de B-PE mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando tampón acetato pH 5'5.

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 ellas, debido a su elevada concentración. Los barridos espectrales 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 acetato pH 5'5 (50 mM), correspondiente a la fase de aplicación de la muestra y lavado y, el mismo tampón 250 mM en los correspondientes a la fase de elución de la misma. Los espectros de las fracciones correspondientes a cromatografía de intercambio iónico, se hicieron



utilizando como blanco el tampón acetato de pH 5'5 y fuerza iónica correspondiente a cada etapa del gradiente utilizado (50 mM, 250 mM o 500 mM). 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 experiencias donde se utilizó NaClO_4 , el blanco utilizado fue tampón acetato pH 5'5 50 mM al que se le añadió NaClO_4 (1M) y, para las experiencias de estabilidad de B-PE frente al pH y la fuerza iónica, el blanco utilizado fue el tampón de pH y fuerza iónica (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 3.10., establecidas para corregir los posibles solapamientos espectrales (Bennet y Bogorad, 1973; 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 B-PE se excitó a 540 nm, recogiendo la emisión entre 600 y 750 nm. Los espectros, se han registrado a temperatura constante e igual a 25°C. Para el estudio de la estabilidad de B-PE frente a la temperatura, se varió la temperatura entre 30°C y 80°C utilizando 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 (A) y baño con recirculación externa (B) para termostatación 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 $I_{||}$, 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.

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

Ecuación 3.11.

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

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

Ecuación 3.12.

Polarización y anisotropía se relacionan entre si según las expresiones:

$$P = \frac{3A}{2 + A}$$

Ecuación 3.13.

$$A = \frac{2P}{3 - P}$$

Ecuación 3.14.

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.

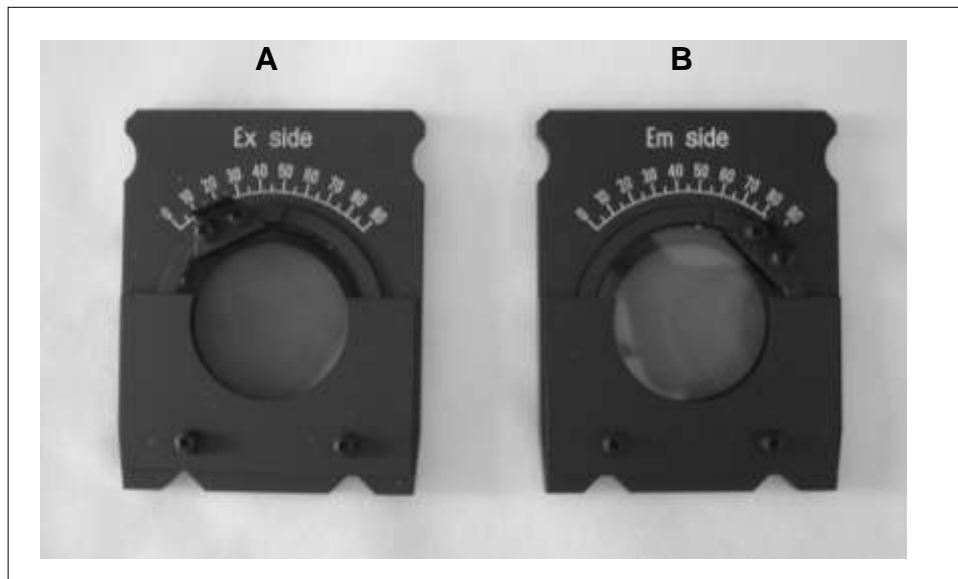


Imagen 3.7.

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

Previo a las medidas de anisotropía, es necesario calcular el factor G, que es un factor de corrección debido a que el conjunto 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. Así 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:

$$G = \frac{S_V}{S_H} = \frac{S_V}{S_H} \cdot \frac{I_{II}}{I_{\perp}} = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

Ecuación 3.15.

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:



$$A = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}}$$

Ecuación 3.16.

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 se ha utilizado un espectrocolorímetro Minolta CM-3500d. En primer lugar, fue necesario calibrar el instrumento y como 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 11'9 ml de muestra en una cubeta transparente de cuarzo con unas dimensiones de 4'2 · 3'2 · 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 intentar 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 B-PE



obtenidos a partir de la microalga *Porphyridium cruentum*. 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 (Imagen 3.8.).



Imagen 3.8.

Espectrocolorímetro y ordenador para medición mediante software de muestras alimenticias. a) Espectrocolorímetro; b) Holder; c) Ordenador para medición mediante software; d) Muestras a medir.

Los productos comerciales analizados son los que se muestran en la Tabla 3.2.:

Tabla 3.2.

Muestras alimenticias utilizadas en los ensayos de colorimetría.

Muestra alimenticia	Marca	Matriz*
Batidos comerciales	Puleva	Leche blanca
	Pascual	semidesnatada
	Covap	Pascual
Yogures	Danone	Yogur natural Danone
	Clesa	
	Auchan	
Yogures líquidos	Kaiku	Yogur líquido natural Actimel
	Clesa	
	Actimel (Danone)	
	Auchan	
Helados	Auchan	Helado de nata Nestle
	Nestle	
Bebidas gaseosas	La inesperada	Gaseosa incolora La inesperada
	Schweppes	
	Clipper	
	Bitterkas	
Mostos	Greip	Mosto blanco Greip
	Don Simón	
	Castillo de Salobreña	
Isotónicas	Powerade	Powerade incoloro
	Radical	
Licores sin alcohol	Granadina (Dama de Baza)	Licor de manzana (incoloro)
	Granadina (Rives)	
	Licor de mora (Frutaysol)	

* Matriz: Producto comercial utilizado para adicionar sobre él las distintas cantidades de extracto de B-PE, intentando reproducir el color de las marcas ensayadas.



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

3.2.4.-ELECTROFORESIS

Principio del método

Se ha utilizado la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida y condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), para comprobar el grado de pureza en B-PE alcanzado en cada etapa del proceso de purificación.

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:

$$m = \frac{v}{E} = \frac{q}{f}$$

Ecuación 3.17.

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 3.7.) (Laemmli, 1970).

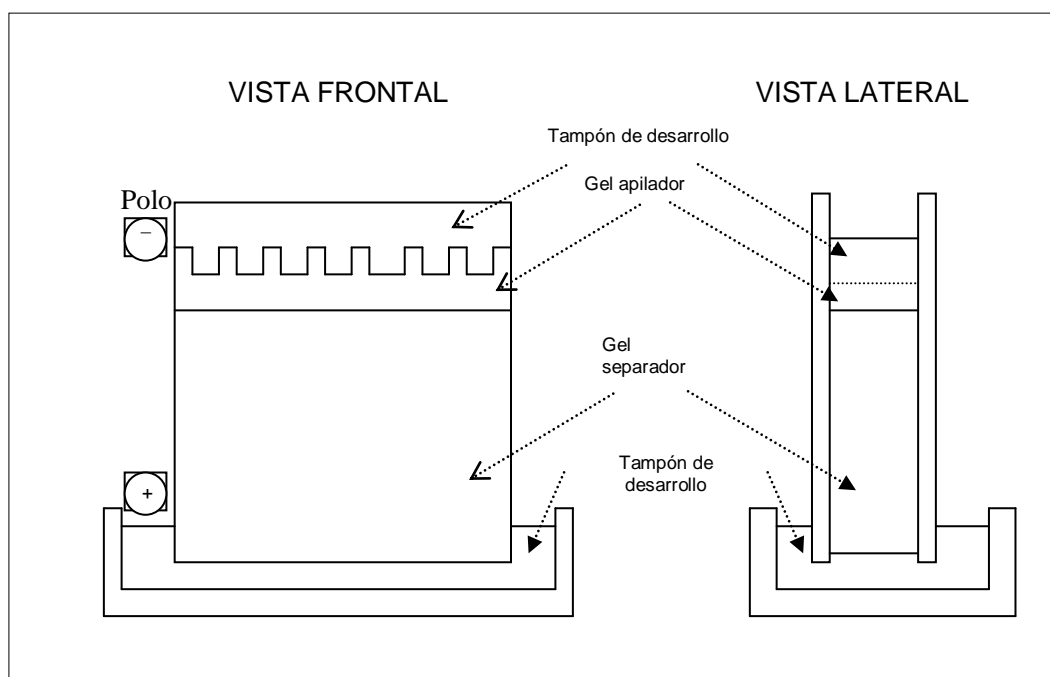


Figura 3.7.

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 3.9.).

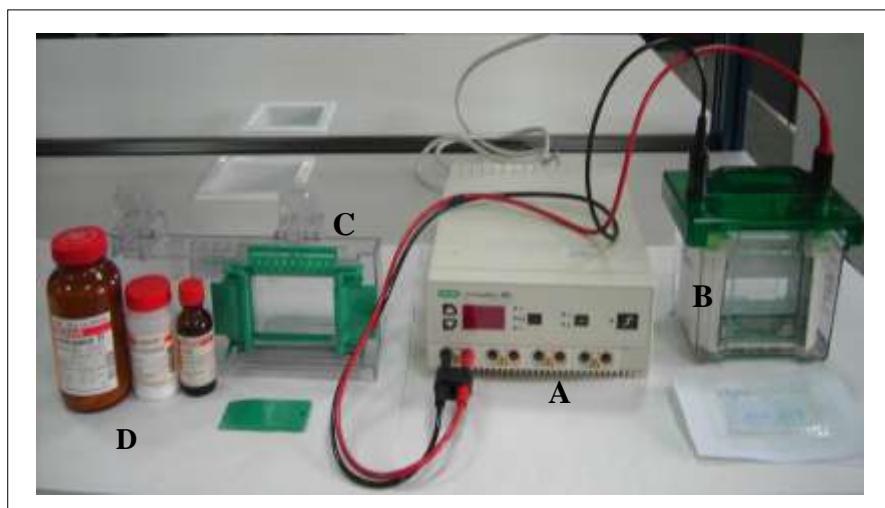


Imagen 3.9.

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.

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 degasificación 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'-tetrametiletilendiamina). 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 3.3. figuran las cantidades de las disoluciones que se deben utilizar para preparar 10 ml del gel separador de distinto porcentaje de entrecruzamiento.



Tabla 3.3.

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. 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.

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 50 μ l, pero que éstos contengan al menos unos 30 μ g 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 1 μ g. 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.-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 (RP-HPLC) en fase reversa (Imagen 3.10.).



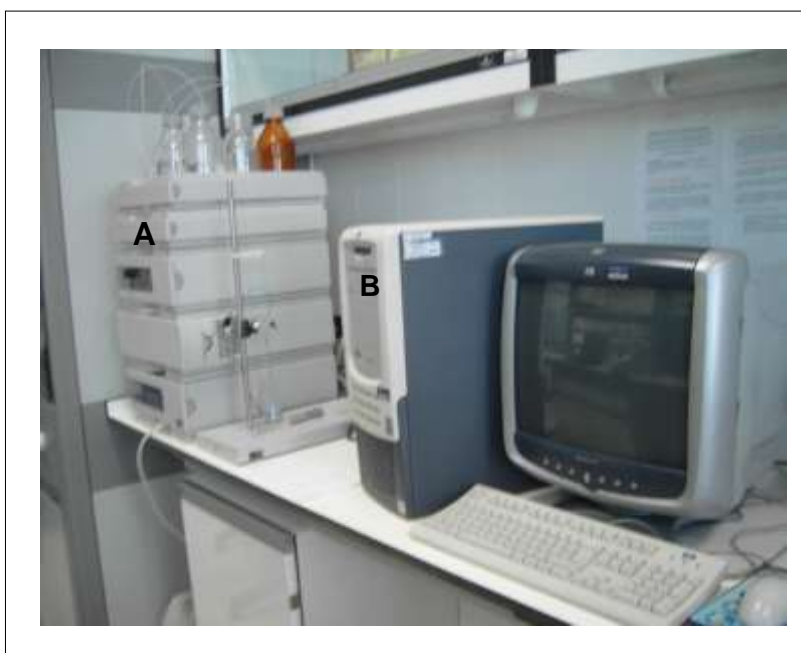


Imagen 3.10.

Instrumentación para realización de cromatografía líquida de alta resolución. a) Equipo de HPLC; b) Ordenador para medición mediante software específico.

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 RP-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 se indica en la Tabla 3.4.:

Tabla 3.4.

Gradiente de polaridad utilizado en columna de RP-HPLC preparativa

Tiempo	% acetonitrilo
0	5
3	5
8	40
28	60
31	95
34	95
40	5

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 1 ml/min para columnas analíticas y de 5 ml/min para la columna semipreparativa; longitudes de onda de monitorización en el diodo array para el seguimiento del proceso de 350, 565, 280 y 226 nm (características de B-PE, proteínas totales y enlace peptídico respectivamente).

Preparación de las muestras:

Se parte de biliproteína liofilizada para resuspenderla 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 3.10., se calcula la concentración de B-PE. Así, en las columnas analíticas se ha inyectado un volumen que corresponde a 15 μ g de B-PE 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.-EVALUACIÓN DEL CONTENIDO EN BILIPROTEÍNAS

Es importante resaltar que el proceso de purificación propuesto para obtener B-PE, 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 que constituyen la microalga *Porphyridium cruentum*. Así, se evaluó el contenido de biliproteínas siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.2.1.

La Tabla 4.1. muestra los resultados correspondientes a la completa extracción de las biliproteínas contenidas en la biomasa de *Porphyridium cruentum*.

Tabla 4.1.

Extracción de las biliproteínas contenidas en *Porphyridium cruentum*.

Biomasa utilizada= 2 g.

Nº ext.	[B-PE] (mg/ml)	[APC] (mg/ml)	[R-PC] (mg/ml)	Vol, ml	mg B-PE	mg APC	mg R-PC	mg biliproteínas	% Biliproteinas
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 la microalga *Porphyridium cruentum* es de 63 mg, que suponen un 3'1 % del peso total del alga. Los datos muestran que la mayor parte de las biliproteínas se recuperan en la primera extracción pues se obtienen 52'90 mg sobre un total de 63 mg, lo que supone el 84%.

A la vista de los valores encontrados para la especie de microalga *Porphyridium cruentum*, el resultado obtenido está en concordancia con los encontrados por otros autores que han trabajado también en este campo. 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%. Para microalgas como *Anabaena marina* y *Synechocystis aquatilis* se han encontrado valores de contenido en biliproteínas del 2'26 y 4'33% respectivamente (Ramos, 2011). Para el caso de la microalga *P. cruentum*, estudios previos revelaron un contenido en biliproteínas igual al 2% (Bermejo y col., 2002a), valor inferior al encontrado en esta Memoria e igual al 3'1%. En este sentido, es importante resaltar que el cultivo de la especie utilizada (*P. cruentum*), ha sido optimizado en cuanto a las variables de crecimiento, buscando maximizar el contenido en biliproteínas (Cerón y col., 2008) por lo que es lógico, encontrar un valor de contenido en biliproteínas superior al encontrado en biomasa cultivada, sin haber optimizado las variables buscando la maximización del contenido proteico.

4.2.- PURIFICACIÓN DE BILIPROTEÍNAS

4.2.1.-TRATAMIENTOS PREVIOS

Como etapa 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 (Tritón X-100, rivanol, lisozima); tratamientos mecánicos de ruptura celular; utilización de ciclos 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., 2002, 2003a). Como el objetivo que se persigue en esta 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 como 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.) (Imagen 4.1.).



Imagen 4.1.

Extracción de biliproteínas mediante choque osmótico.

La Tabla 4.2. muestra las cantidades de las biliproteínas extraídas de *Porphyridium cruentum* (B-PE, R-PC y APC) determinadas espectroscópicamente y presentes en cada uno de los sobrenadantes generados en esta etapa.

Tabla 4.2.

Cantidades de biliproteínas obtenidas en los sobrenadantes generados en los tratamientos previos para la purificación de B-PE, procedentes de *Porphyridium cruentum*. Biomasa utilizada= 2g.

Tampón	1ª EXTRACCIÓN			2ª EXTRACCIÓN			3ª EXTRACCIÓN			TOTAL BILIPROTEINAS mg	%
	B-PE mg	APC mg	R-PC mg	B-PE mg	APC mg	R-PC mg	B-PE mg	APC mg	R-PC 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

De los medios de extracción ensayados, el que mejores resultados produjo fue la utilización de choque osmótico con agua destilada, como se aprecia en la Tabla 4.2. Como inicialmente se pesaron 2 g de biomasa liofilizada de microalga, los 77'4 mg de ficocianinas (APC y R-PC) y ficoeritrinas (B-PE) suponen un 3'87 % 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 ficocianinas y ficoeritrinas extraídas representaba el 2'48%.

Si analizamos los resultados obtenidos, la extracción es óptima utilizando agua destilada. 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. 2003a), muestran que la siguiente etapa (CALE) para la recuperación de B-PE procedente de *Porphyridium cruentum*, requiere que el extracto a aplicar en la columna vaya en medio tampón acetato pH 5'5, que es la fase móvil óptima para la adsorción de las proteínas en el relleno cromatográfico Streamline DEAE. Por lo



anteriormente comentado, se propone como medio de extracción a utilizar en los tratamientos previos de *Porphyridium cruentum*, el tampón acetato pH 5'5 (1M). Se podría utilizar tampón fosfato pH 7 (1 M) que genera una recuperación más alta, pero entonces y para acondicionar la muestra para la etapa de CALE, sería necesaria la intercalación de una etapa de diálisis. Esto supondría, una etapa adicional que encarece el proceso y además no es escalable.

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 acetato pH 5'5 con diferentes valores de fuerza iónica. La metodología utilizada se describe en el apartado 3.2.2.2. (Imagen 4.2.) y se ensayaron medios de extracción con valores de F.I. iguales a: 1000 mM, 500 mM, 100 mM y 50 mM.



Imagen 4.2.

Detalle del proceso de centrifugación durante la extracción, para la recuperación de bilirpoteínas procedentes de *Porphyridium cruentum*.

La Tabla 4.3. muestra las cantidades de biliproteínas extraídas (B-PE, R-PC y APC) determinadas espectroscópicamente, presentes en cada uno de los sobrenadantes generados en esta etapa.

Tabla 4.3.

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

Tampón	1ª EXTRACCIÓN			2ª EXTRACCIÓN			3ª EXTRACCIÓN			TOTAL BILIP.* mg	%
	B-PE mg	APC mg	R-PC mg	B-PE mg	APC mg	R-PC mg	B-PE mg	APC mg	R-PC 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

*BILIP: biliproteínas

De todos los procesos ensayados, los mejores resultados se obtuvieron utilizando tampón acetato pH 5'5 de concentración 100 mM. Como inicialmente se pesaron 2 g de biomasa liofilizada de microalga, los 86'16 mg de biliproteínas extraídos en estas condiciones 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.



Para 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 50 mM (Bermejo y col. 2003a). Por tanto y dado que el valor de recuperación con este medio es muy similar al máximo obtenido con 100 mM, se propone el tampón acetato pH 5'5 (50 mM) como óptimo para la recuperación de biliproteínas de *Porphyridium cruentum*, para de esta forma evitar el tener que diluir la muestra que debe entrar en la columna de CALE, lo que generaría mayores tiempos de aplicación y por tanto menor rendimiento económico del proceso global de purificación.

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 resulta muy atractiva, a menos que su uso incrementara significativamente el rendimiento de recuperación de B-PE. Para comprobar este punto, se han realizado experiencias de extracción con exposición a ultrasonidos, a fin de concluir si es conveniente su utilización para conseguir los objetivos planteados en esta Memoria.

La Tabla 4.4. muestra los resultados obtenidos en función del tiempo de exposición de los extractos obtenidos en tampón acetato 5'5 (50 mM).



Tabla 4.4.

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

TIEMPO min	[biliproteínas] * 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.

Los resultados obtenidos muestran que la concentración de biliproteínas no descende con la aplicación de ultrasonidos, pero tampoco aumenta de forma significativa. El ligero aumento de 0'96 a 1'15 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*, la utilización de tampón acetato pH 5'5, 50 mM y sin aplicación de ultrasonidos.

4.2.1.4.-Extracto enriquecido en Biliproteínas previo a la cromatografía

Los tratamientos previos de la biomasa microalgal en las condiciones descritas anteriormente, generan un extracto crudo de biliproteínas que será utilizado en la siguiente etapa del proceso de purificación.

La Figura 4.1. 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 280 nm y hombros a 565 y 400 nm correspondientes a la mezcla de B-PE, 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 0'5.

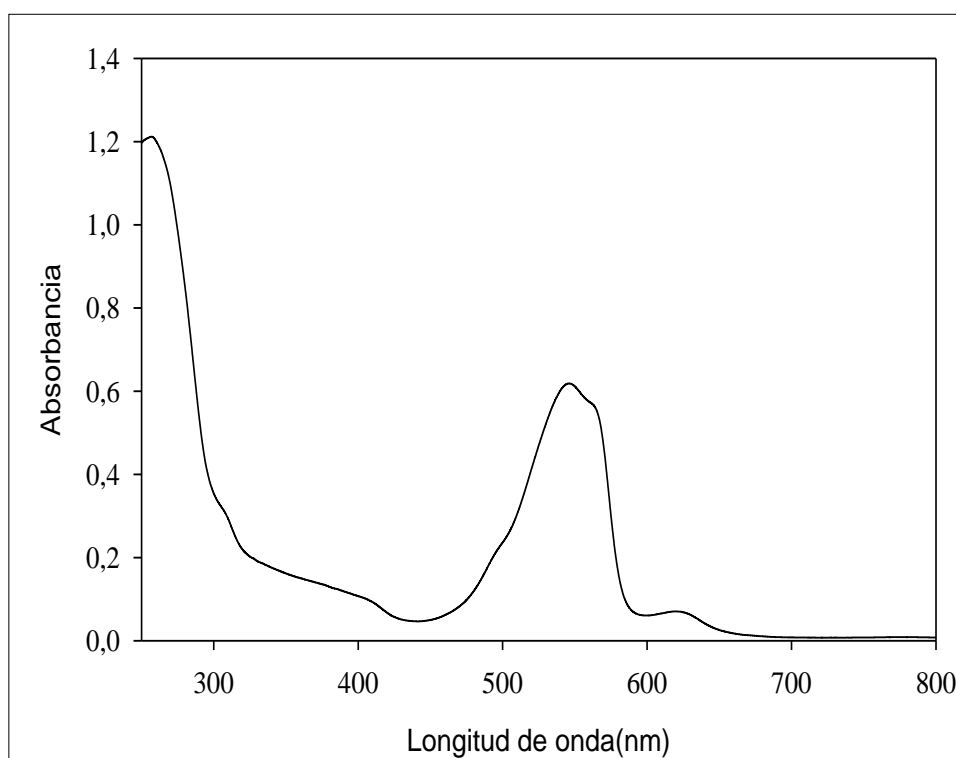


Figura 4.1.

Espectro de absorción uv-visible del extracto crudo de B-PE procedente de *Porphyridium cruentum*.

Esta disolución obtenida con los tratamientos previos de la biomasa de la especie microalgal, constituye el extracto proteico de partida para la siguiente etapa en el proceso de purificación que es la cromatografía CALE (Imagen 4.3.). Además, se encuentra en el medio idóneo para su aplicación (tampón acetato pH 5'5 50mM) y a una elevada concentración, lo que minimiza los volúmenes de aplicación.



Imagen 4.3.

Detalle del extracto crudo enriquecido en B-PE (A) procedente de la microalga *Porphyridium cruentum* (B).

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, 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 la proteína 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 B-PE que puede adsorberse por unidad de volumen de relleno utilizado en esta etapa cromatografica (Streamline

DEAE).

Para determinar la capacidad máxima de adsorción, se pueden utilizar dos tipos de aproximaciones. Una posibilidad consiste en hacer un estudio de tipo estático, que conduce a la obtención de la denominada isoterma de adsorción. Paralelamente, se puede hacer un estudio de tipo dinámico que reproduce las condiciones experimentales usadas durante una verdadera experiencia de adsorción en lecho expandido.

De esta forma se obtienen los valores de capacidad máxima de adsorción estática y dinámica respectivamente, que nos van a permitir elegir el rango de trabajo para la optimización de la cantidad de proteína a cargar en el sistema, siempre persiguiendo como objetivo la obtención del máximo rendimiento de recuperación proteico.

Es importante resaltar que con la capacidad máxima calculada, se puede estimar la carga estática máxima de muestra que admitiría el volumen de relleno colocado en la columna.

4.2.2.1.1.-Capacidad estática (Isotermas de adsorción)

En anteriores trabajos realizados por nuestro grupo de investigación, como se describe en el apartado 3.2.2.3.1. de esta Memoria, se obtuvo la denominada capacidad estática de adsorción, mediante la determinación de los parámetros característicos de la isoterma correspondiente. De forma análoga, se ha procedido a realizar una experiencia similar para determinar la capacidad máxima de adsorción del relleno frente al nuevo extracto crudo procedente de los tratamientos previos realizados utilizando una partida de biomasa nueva. Los resultados son muy similares a los obtenidos anteriormente (1'8 mg B-PE/ml adsorbente, Bermejo y col., 2003a), generando una capacidad máxima de 2'04 mg B-PE/ml de adsorbente, lo que viene a suponer que, aunque los extractos ensayados son ligeramente diferentes, pues pertenecen a diferentes partidas de la misma microalga cosechadas en espacios temporales distintos, sin embargo su composición es muy similar.



Siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.2.3.1., se ha realizado la isoterma de adsorción de B-PE sobre Stremaline DEAE que es el relleno cromatográfico utilizado en la etapa de adsorción de lecho expandido. Se han utilizado dos tipos de muestras para calcular la capacidad de adsorción, extracto crudo de ficoeritrina procedente de los tratamientos previos y B-PE pura de la que disponía nuestro grupo purificada previamente mediante metodología convencional (Bermejo y col., 2001). Los datos obtenidos se ajustan muy bien al modelo de Langmuir que describe la ecuación 4.1., donde “ x ” es la cantidad 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.

La Figura 4.2. muestra la concentración de B-PE adsorbida por volumen de relleno cromatográfico, frente a la concentración de biliproteína en equilibrio en el tampón, para cada una de las muestras ensayadas.



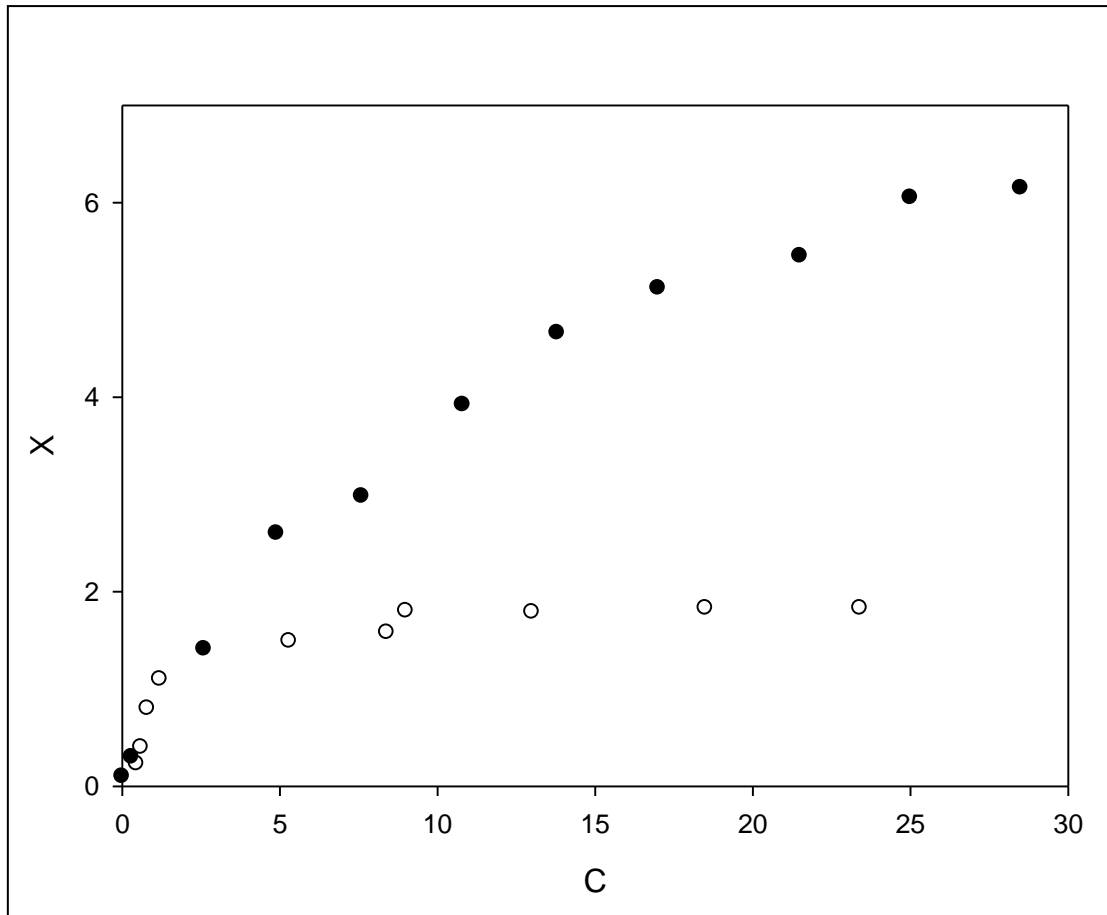


Figura 4.2.

Isotermas de adsorción sobre Streamline DEAE, utilizando el extracto crudo de B-PE (o) procedente de los tratamientos previos y de B-PE pura (●). X: B-PE adsorbida (mg)/adsorbente (ml); C: concentración de equilibrio de B-PE (mg/l).

Si se trata convenientemente la ecuación de la isoterma de Langmuir, podemos linealizarla (Ecuación 4.2.) y de esta forma obtener de forma sencilla sus 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 4.3. muestra las linealizaciones correspondientes y en ellas puede observarse que existe una concordancia bastante buena con el modelo de Langmuir propuesto para el proceso de adsorción entre B-PE y la matriz cromatográfica utilizada (Streamline DEAE).

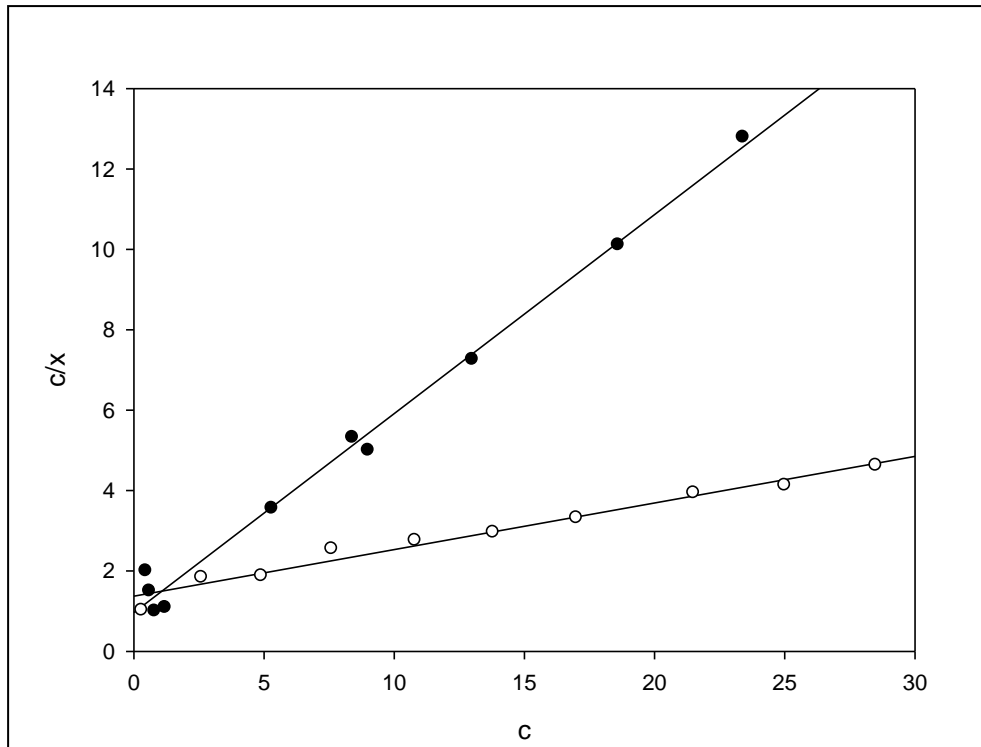


Figura 4.3.

Representación gráfica de la isoterma de Langmuir linealizada para la adsorción del extracto crudo de B-PE (●) y B-PE pura (○), sobre Streamline DEAE. C/X: ml adsorbente/l; C: concentración de equilibrio de B-PE (mg/l).

La Tabla 4.5. muestra los parámetros de ajuste obtenidos a partir de las linealizaciones:

Tabla 4.5.

Parámetros de ajuste y capacidad máxima de adsorción según Isoterma de Langmuir, para la adsorción de B-PE pura y procedente del extracto crudo.

MUESTRA	a	b	r ²	K (l/g)	X _m (g/l)
B-PE pura	1'37	0'12	0'973	0'087	8'33
Extracto crudo de B-PE	0'96	0'49	0'991	0'511	2'04

A partir de las isothermas linealizadas y del análisis de los parámetros de ajuste, se puede calcular la capacidad máxima de adsorción en equilibrio (x_m), que es de 8'3 y 2'04 g/l para las muestras de B-PE pura y del extracto crudo de B-PE, respectivamente. Estos resultados denotan, que la capacidad de adsorber B-



PE por parte del relleno, disminuye considerablemente en presencia de otras proteínas contaminantes que acompañan a la misma, como es el caso de la disolución que constituye el extracto crudo proveniente de los tratamientos previos. Es importante resaltar, que desafortunadamente ligandos que poseen alta especificidad para la molécula de interés, a menudo no aguantan los necesarios y rigurosos tratamientos de limpieza de la columna de adsorción en lecho expandido. También se puede observar como la capacidad de adsorción del relleno para una disolución pura de B-PE, es considerablemente mayor 8'33 g/l, en este caso del valor de cuatro veces. La Imagen 4.4. muestra un detalle de la secuencia de disoluciones utilizadas para la determinación de la isoterma de adsorción.



Imagen 4.4.

Detalle de las disoluciones mezcla de extracto crudo de B-PE y Streamline DEAE, para la obtención de la isoterma de adsorción.

4.2.2.1.2.-Capacidad dinámica (curvas de ruptura)

La realización de las isotermas de adsorción permite una primera aproximación 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. Esta experiencia se realiza en idénticas condiciones a como se trabaja en columna de CALE y por tanto genera datos de comportamiento de adsorción dinámicos, que pueden diferir de los obtenidos de forma estática. Estos valores obtenidos para la capacidad dinámica y la capacidad estática, permitirán utilizar un dato bastante próximo al valor real que describa aceptablemente el proceso de adsorción.

Como se describe en el apartado correspondiente de metodología (3.2.2.3.1.), la capacidad dinámica precisa de la realización experimental de la curva de ruptura. Para ello, se utilizó la columna de menor tamaño (50 · 1'5 cm) para minimizar los requerimientos de muestra y consumo de fase móvil. La Figura 4.4. 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 (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 dinámica de adsorción.

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

Ecuación 4.3.

En esta ecuación “C₀” es la concentración inicial de la muestra (0'033 mg B-PE/ml), “V₀” es el volumen eluido cuando C/C₀ es igual a 0'1 (1300 ml) y “V_s” es el volumen de lecho sedimentado (26'15 ml). En estas condiciones la capacidad dinámica estimada es igual a 1'65 mg B-PE/ ml de adsorbente. El valor dinámico es ligeramente inferior al estático estimado en 2'04 mg B-PE/ ml de adsorbente. No obstante, ambos valores indican máximos que se podrían llegar a utilizar, pero



en las experiencias de lecho expandido no es recomendable llegar a estos valores, por lo que se trabaja por defecto con el objeto de evitar la posible saturación del sistema que produciría el trabajar cerca de los parámetros máximos de saturación del mismo, lo que conllevaría una disminución del rendimiento de recuperación proteico. Por todo esto, se ha decidido trabajar a un valor igual al 50 % de la capacidad dinámica estimada, es decir, al 0'88 mg B-PE/ml adsorbente. Es importante resaltar que este valor está muy próximo al obtenido previamente por nuestro grupo de investigación en experiencias preliminares, donde se optimizó el rendimiento de recuperación de la proteína en función de la carga del sistema (apartado 2.3.2.1) utilizando una columna de 50 · 2'5 cm (Bermejo y col., 2003a).

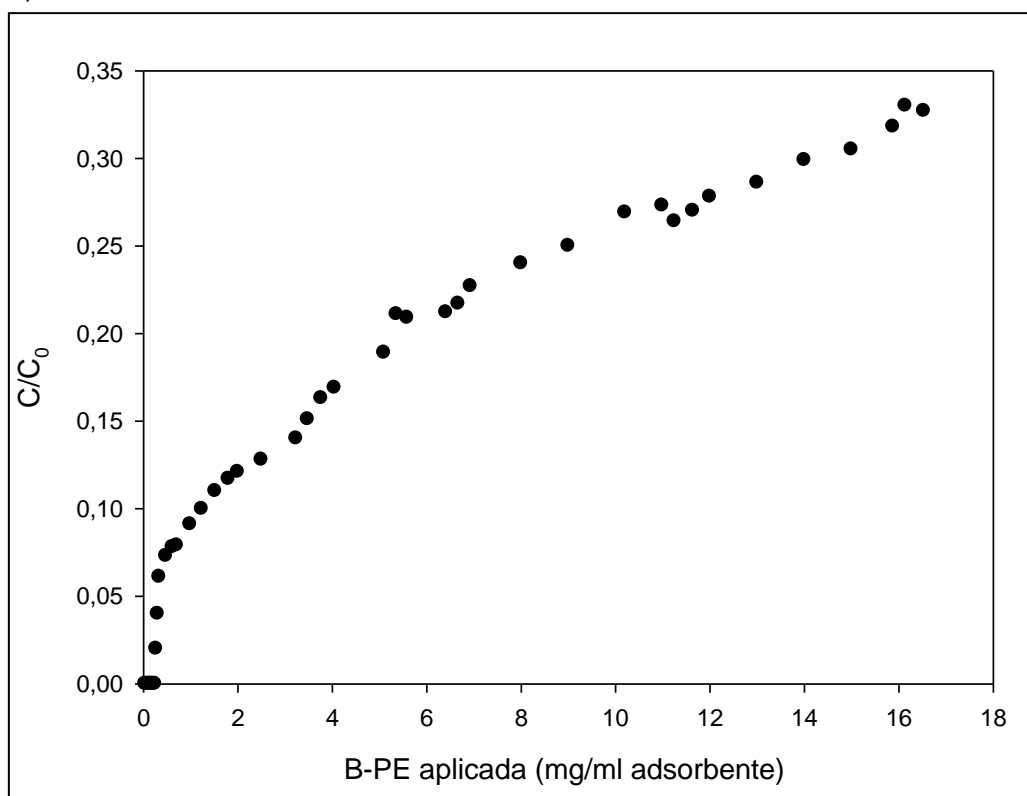


Figura 4.4.

Curva de ruptura obtenida por aplicación del extracto crudo de B-PE sobre una columna de Streamline DEAE (50 · 1'5 cm). $C_0=0'033 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

La Tabla 4.6. muestra los datos recogidos para la elaboración de la curva de ruptura. Los valores de $A_{\text{Corregida}}$ se han obtenido por diferencia entre los valores de absorbancia sin corregir y la absorbancia a 750 nm considerado como valor residual.



Tabla 4.6.

Curva de ruptura de B-PE en Streamline DEAE (Columa 50 · 1'5 cm). $C_0=0'033$ mg/ml en acetato 50 mM pH 5'5. Volumen de relleno=26'15 ml. Nota: V_{acu} = volumen acumulado.

Nº tubo	V_{acu} (ml)	A_{750}	A_{565}	A_{565} Corregida	A_{620}	A_{620} Corregida	A_{650}	A_{650} Corregida	$\frac{C}{C_0}$	$\frac{mgBPE}{ml\ relleno}$
1	28	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0350
2	56	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0706
3	84	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'1060
4	112	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'1410
5	140	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'1760
6	168	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'2120
7	196	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'0000	0'2470
11	308	0'0253	0'0562	0'0309	0'0404	0'0151	0'0351	0'0098	0'0611	0'3350
15	420	0'0279	0'0646	0'0367	0'0452	0'0173	0'0392	0'0113	0'0730	0'4770
19	532	0'0285	0'0674	0'0389	0'0460	0'0175	0'0395	0'0110	0'0780	0'6180
20	560	0'0263	0'0659	0'0396	0'0437	0'0174	0'0371	0'0108	0'0790	0'7060
28	784	0'0289	0'0740	0'0451	0'0473	0'0184	0'0403	0'0114	0'0910	0'9890
35	980	0'0326	0'0810	0'0484	0'0504	0'0178	0'0426	0'0100	0'0998	1'2360
43	1204	0'0281	0'0813	0'0532	0'0474	0'0193	0'0399	0'0118	0'1100	1'5190
51	1428	0'0281	0'0847	0'0566	0'0475	0'0194	0'0398	0'0117	0'1170	1'8020
59	1641	0'0351	0'0902	0'0551	0'0574	0'0223	0'0490	0'0139	0'1120	2'0700
67	1865	0'0297	0'0827	0'0530	0'0497	0'0200	0'0418	0'0121	0'1080	2'3530
76	2117	0'0294	0'0862	0'0568	0'0498	0'0204	0'0418	0'0124	0'1170	2'6710
84	2341	0'0340	0'0982	0'0642	0'0556	0'0226	0'0469	0'0129	0'1300	2'9540
92	2565	0'0302	0'0972	0'0670	0'0521	0'0219	0'0439	0'0137	0'1400	3'2360
100	2761	0'0328	0'1046	0'0718	0'0549	0'0221	0'0456	0'0128	0'1510	3'4800
108	2985	0'0344	0'1119	0'0775	0'0577	0'0233	0'0479	0'0135	0'1630	3'7660
116	3207	0'0577	0'1396	0'0819	0'0879	0'0302	0'0775	0'0198	0'1690	4'0470
124	3415	0'0334	0'1050	0'0716	0'0547	0'0213	0'0466	0'0132	0'1510	4'3090



Tabla 4.6.

Curva de ruptura de B-PE en Streamline DEAE (50 · 1'5 cm). $C_0=0'033$ mg/ml en acetato 50 mM pH 5'5. Volumen de relleno=26'15 ml. Nota: V_{acu} = volumen acumulado

(Continuación Tabla 4.6.)

Nº tubo	V_{acu} (ml)	A_{750}	A_{565}	A_{565} Corregida	A_{620}	A_{620} Corregida	A_{650}	A_{650} Corregida	$\frac{C}{C_0}$	$\frac{mgBPE}{ml\ relleno}$
132	3623	0'0340	0'1123	0'0783	0'0561	0'0221	0'0471	0'0131	0'1660	4'5720
140	3831	0'0354	0'1221	0'0867	0'0586	0'0232	0'0492	0'0138	0'1850	4'8340
148	4039	0'0330	0'1215	0'0885	0'0556	0'0226	0'0462	0'0132	0'1890	5'0970
156	4247	0'0423	0'1411	0'0988	0'0678	0'0255	0'0572	0'0149	0'2110	5'3590
164	4429	0'0429	0'1410	0'0981	0'0686	0'0257	0'0581	0'0152	0'2090	5'5890
173	4663	0'1220	0'2384	0'1164	0'1657	0'0437	0'1514	0'0294	0'2390	5'8840
181	4871	0'0450	0'1387	0'0937	0'0711	0'0261	0'0610	0'0160	0'1900	6'1460
190	5079	0'0424	0'1421	0'0997	0'0682	0'0258	0'0579	0'0155	0'2120	6'4090
198	5287	0'0413	0'1425	0'1012	0'0661	0'0248	0'0558	0'0145	0'2170	6'6710
206	5495	0'0420	0'1486	0'1066	0'0679	0'0259	0'0562	0'0142	0'2270	6'9300
214	5677	0'0419	0'1561	0'1142	0'0691	0'0272	0'0576	0'0157	0'2460	7'1640
222	5885	0'0450	0'1655	0'1205	0'0724	0'0274	0'0605	0'0155	0'2600	7'4200
231	6093	0'0464	0'1743	0'1279	0'0767	0'0303	0'0644	0'0180	0'2760	7'6890
242	6379	0'0572	0'1586	0'1014	0'0868	0'0296	0'0756	0'0184	0'2140	8'0400
250	6561	0'0385	0'1396	0'1011	0'0645	0'0260	0'0535	0'0150	0'2150	8'2790
261	6838	0'0456	0'1347	0'0891	0'0699	0'0243	0'0609	0'0153	0'1900	8'6290
273	7150	0'0375	0'1293	0'0918	0'0598	0'0223	0'0514	0'0139	0'1970	9'0220
281	7358	0'0357	0'1272	0'0915	0'0569	0'0212	0'0488	0'0131	0'1960	9'2850
293	7670	0'0350	0'1316	0'0966	0'0561	0'0211	0'0477	0'0127	0'2090	9'6790
301	7878	0'0339	0'1318	0'0979	0'0548	0'0209	0'0465	0'0126	0'2130	9'9400
309	8086	0'0966	0'2243	0'1277	0'1357	0'0391	0'1228	0'0262	0'2690	10'2040
321	8398	0'0257	0'1302	0'1045	0'0494	0'0237	0'0402	0'0145	0'2260	10'5900
333	8710	0'0264	0'1517	0'1253	0'0522	0'0258	0'0418	0'0154	0'2730	10'9900
341	8918	0'0074	0'1304	0'1230	0'0337	0'0303	0'0236	0'0162	0'2640	11'2500



Tabla 4.6.

Curva de ruptura de B-PE en Streamline DEAE (50 · 1'5 cm). $C_0=0'033$ mg/ml en acetato 50 mM pH 5'5. Volumen de relleno=26'15 ml. Nota: V_{acu} = volumen acumulado

(Continuación Tabla 4.6.)

Nº tubo	V_{acu} (ml)	A_{750}	A_{565}	A_{565} Corregida	A_{620}	A_{620} Corregida	A_{650}	A_{650} Corregida	$\frac{C}{C_0}$	$\frac{mgBPE}{ml\ relleno}$
353	9230	0'0078	0'1318	0'1240	0'0339	0'0261	0'0235	0'0157	0'2700	11'6400
361	9438	0'0162	0'1688	0'1526	0'0478	0'0316	0'0348	0'0186	0'3300	11'9100
373	9750	0'0469	0'1549	0'1080	0'0733	0'0264	0'0629	0'0160	0'2320	12'3000
381	9958	0'0362	0'1436	0'1074	0'0606	0'0244	0'0507	0'0145	0'2320	12'5600
393	10270	0'0347	0'1461	0'1114	0'0578	0'0231	0'0486	0'0139	0'2420	12'9600
401	10478	0'0367	0'1545	0'1178	0'0606	0'0239	0'0509	0'0142	0'2570	13'2200
413	10790	0'0421	0'1670	0'1249	0'0671	0'0250	0'0571	0'0150	0'2720	13'6160
421	10998	0'0510	0'1875	0'1365	0'0783	0'0273	0'0673	0'0163	0'2980	13'8700
433	11310	0'0510	0'1933	0'1423	0'0801	0'0291	0'0686	0'0176	0'3100	14'2700
442	11544	0'1042	0'2377	0'1335	0'1448	0'0406	0'1313	0'0271	0'2810	14'5600
455	11856	0'0625	0'1941	0'1316	0'0938	0'0313	0'0820	0'0195	0'2810	14'9400
463	12064	0'0678	0'2020	0'1342	0'0998	0'0320	0'0879	0'0201	0'2890	15'2200
471	12272	0'0573	0'2004	0'1431	0'0872	0'0299	0'0754	0'0180	0'3090	15'4800
483	12584	0'0510	0'1968	0'1458	0'0804	0'0294	0'0683	0'0173	0'3180	15'8800
491	12792	0'0615	0'2159	0'1544	0'0943	0'0328	0'0813	0'0198	0'3360	16'1400
503	13104	0'1069	0'2622	0'1553	0'1528	0'0459	0'1372	0'0303	0'3270	16'5360
511	13312	0'0302	0'1502	0'1200	0'0560	0'0258	0'0458	0'0156	0'2600	16'7990
523	13624	0'0267	0'1555	0'1288	0'0527	0'0260	0'0421	0'0154	0'2810	17'1900
535	13936	0'0181	0'1510	0'1329	0'0443	0'0262	0'0336	0'0155	0'1360	17'5860
543	14144	0'0380	0'1767	0'1387	0'0641	0'0261	0'0530	0'0150	0'3040	17'8400
551	14352	0'0448	0'1935	0'1487	0'0727	0'0285	0'0612	0'0164	0'3240	18'1100
564	14690	0'0735	0'2050	0'1345	0'1063	0'0328	0'0949	0'0214	0'2820	18'5300
576	15002	0'0701	0'2091	0'1390	0'1023	0'0322	0'0910	0'0209	0'3000	18'9300



La Imagen 4.5. muestra distintas fases del proceso de elaboración de la curva de ruptura.

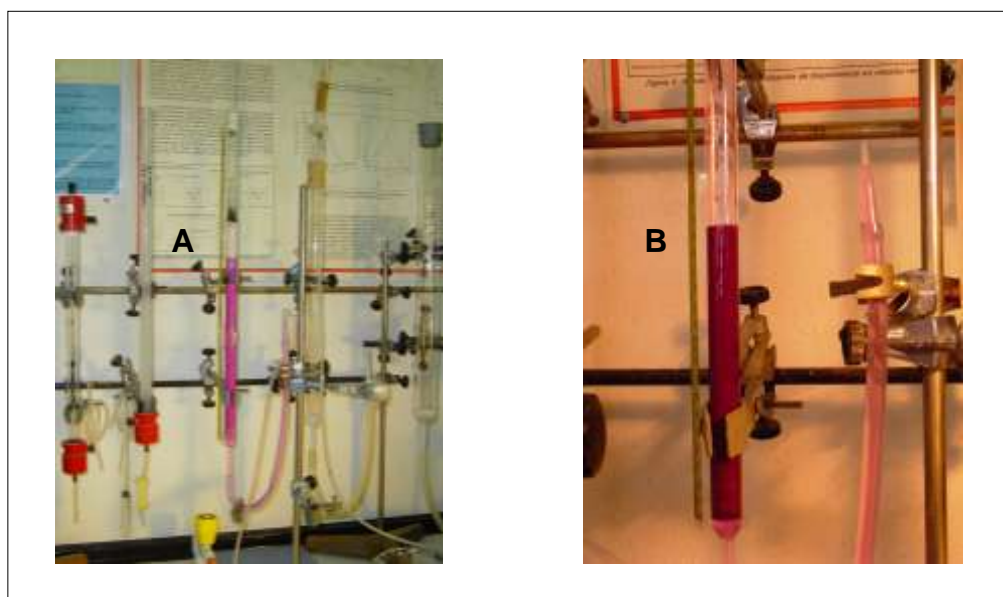


Imagen 4.5.

Detalle de la evolución del proceso de la curva de ruptura.

a) Columna teñida por la aplicación de muestra en los momentos iniciales; b) Columna muy teñida de color granate correspondiente a B-PE, tras el paso de un gran volumen de muestra en los momentos finales de la curva de ruptura.

4.2.2.2.-Optimización de variables de trabajo

Resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación previamente (Bermejo y col., 2003a), han conducido a conocer los valores de pH y fuerza iónica idóneos para la adsorción y elución de las ficoeritrinas de interés sobre el relleno Streamline DEAE. Así, se ha determinado que la mayor parte de moléculas contaminantes que acompañan a las ficoeritrinas en el extracto crudo procedente de los tratamientos previos, eluyen sin enlazarse al relleno cuando se utiliza como fase móvil tampón acetato pH 5'5 (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 fase móvil (tampón

de equilibrado) igual a tres veces el volumen de lecho sedimentado que supone el relleno de 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 ficoeritrinas, utilizando para ello fase móvil compuesta por tampón acetato pH 5'5 (250mM). 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 4.6.).

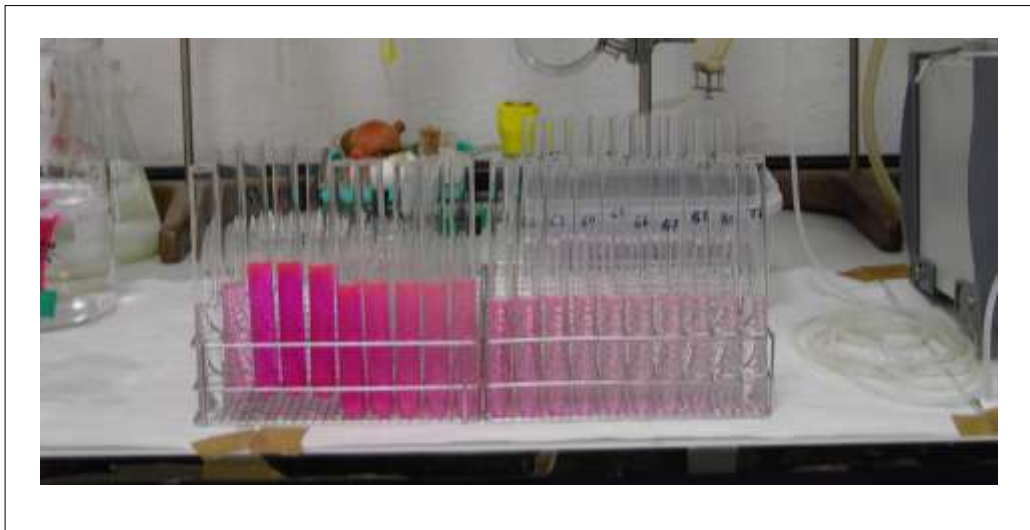


Imagen 4.6.

Detalle de las fracciones obtenidas tras la etapa de elución de ficoeritrinas en CALE.

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 utilizando una velocidad de flujo baja y se va incrementando ésta 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 en 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 4.7. se muestra el caudal volumétrico y velocidad lineal de flujo, necesarias para alcanzar cada uno de los valores de H/H_0 ensayados.

La Figura 4.5. 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 4.7.

Comportamiento hidrodinámico de la columna de Streamline DEAE (Tamaño 50 · 1'5 cm). Caudales volumétricos y velocidades de flujo necesarias para cada uno de los valores de grado de expansión ensayados.

H/H_0	Caudal (ml/min)	Velocidad (cm/h)
1'6	3'305	112'22
1'8	4'305	146'17
2'0	5'815	197'44
2'2	6'825	231'73
2'4	8'170	277'40
2'6	8'890	301'84
2'8	9'820	333'42



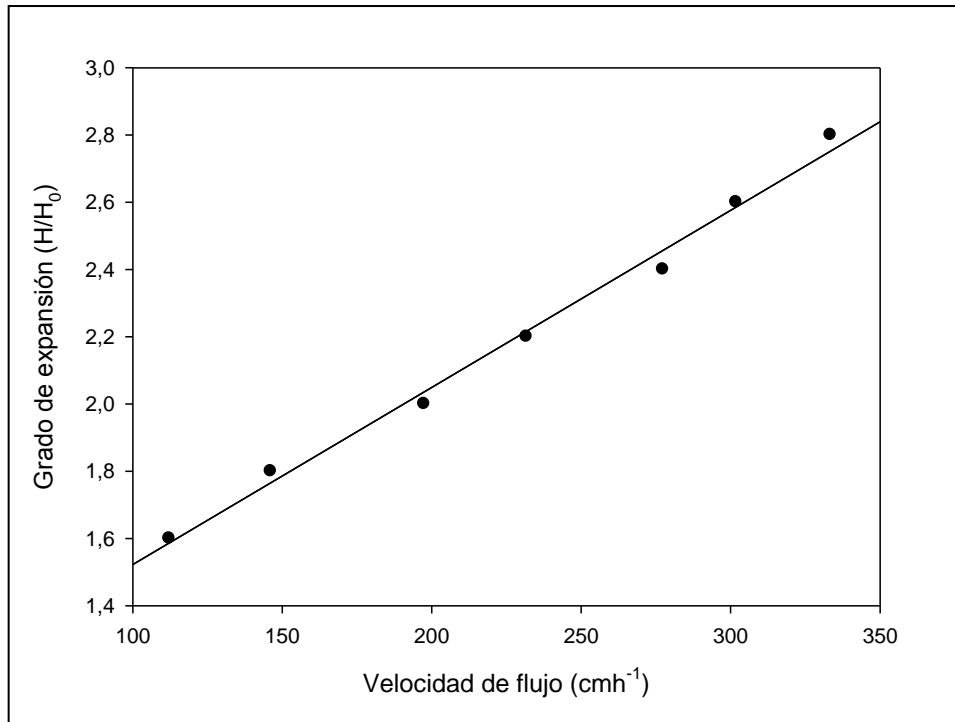


Figura 4.5.

Expansión relativa de la columna de adsorción en lecho expandido, en función del caudal bombeado de fase móvil. Columna de 50 · 1'5 cm. Los parámetros de regresión obtenidos son: $(y=a+bx)$: $a=0'9958$, $b=0'0053$, $r^2=0'9923$.

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.

En este sentido una vez conocido el comportamiento hidrodinámico de la columna de adsorción de lecho expandido, se procede a realizar las diferentes experiencias en las que se irá variando el grado de expansión y se mantendrán constantes el resto de parámetros, tales como carga proteica y volumen de muestra de aplicación. Así, se ha utilizado una carga igual a 0'88 mg B-PE/ml



adsorbente y un volumen total de muestra igual a 710 ml. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.8. y en la Figura 4.6.

Tabla 4.8.

Influencia del grado de expansión en el porcentaje de recuperación de B-PE tras cromatografía de adsorción de lecho expandido.

Grado de expansión (H/H₀)	Recuperación B-PE (%)
1'6	60'49
1'8	67'03
2'0	71'09
2'2	67'92
2'4	60'27
2'6	58'79

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/H₀ se hacen mayores o menores a este valor. De esta forma, se puede cifrar en 2 el valor óptimo del grado de expansión.



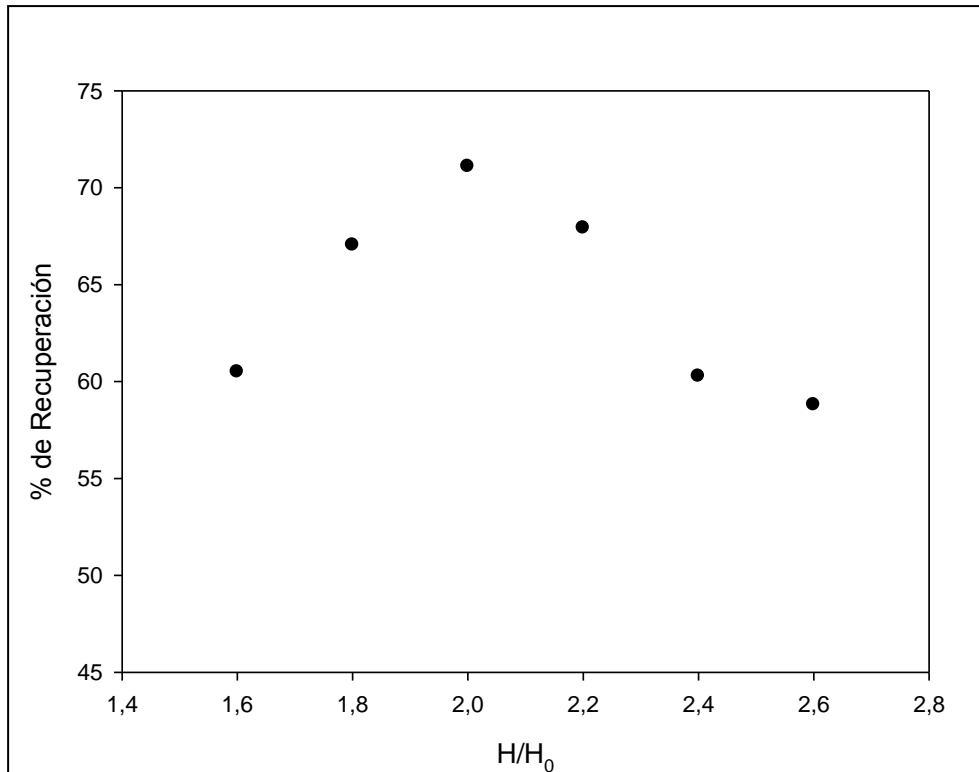


Figura 4.6.

Influencia del grado de expansión en el porcentaje de recuperación de B-PE tras CALE.

Columna de 50 · 1'5 cm. % Recuperación: % recuperación proteica;

H/H₀: Grado de expansión.

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 produce una mejora en la productividad del sistema (Chase, 1994; Ghose and Chase, 2000a y b). En este sentido, velocidades de flujo inferiores a las que producen el grado óptimo de expansión, 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 velocidades de flujo superiores al óptimo, aunque producen una disminución importante a la resistencia a la transferencia de masa, hacen que la distancia entre las partículas del relleno cromatográfico aumenten, 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 coincide con el utilizado previamente por nuestro grupo de investigación para ficoeritrinas (Bermejo y col., 2003a) y ficocianinas (Ramos y

col., 2010, 2011) y también por otros autores trabajando con diferentes materias primas (Artolozaga y col., 1998; Hu y col., 2000; Roy y Gupta, 2000). Estos resultados soportan la idea de que un valor de grado de expansión igual a dos, genera buenos resultados en términos generales 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, distribución desigual y no homogénea de la muestra debido a su alta viscosidad (Chase, 1994). Debido a ésto, se ha estudiado la influencia de la viscosidad de la muestra en el comportamiento del sistema y en el rendimiento de recuperación proteico.

Las experiencias se han desarrollado en columna de 50 · 1'5 cm, utilizando el grado de expansión optimizado anteriormente ($H/H_0 = 2$), carga igual a 0'88 mg B-PE/ml y la viscosidad ha sido variada en el rango 1'068 a 1'009 mP mediante la correspondiente dilución de la muestra procedente de los tratamientos previos. En todos los experimentos, el comportamiento del lecho expandido estuvo cercano a la idealidad y no se observaron canales preferentes de ascenso de la muestra aplicada.



Tabla 4.9.

Influencia de la viscosidad en el porcentaje de recuperación de B-PE en una columna de Streamline DEAE (50 · 1'5 cm).

Viscosidad (mP)	Conductividad (ms cm ⁻¹)	Volumen de muestra (ml)	Tiempo de aplicación (min)	Recuperación de B-PE (%)
1'068	3'24	710	108	71'0
1'020	3'22	1080	153	74'9
1'009	3'12	1440	176	76'2

(*) Viscosidad del tampón acetato pH 5'5 (50 mM) = 1'001 mP.

Los resultados muestran que el rendimiento de recuperación proteica aumenta cuando la viscosidad de la muestra aplicada disminuye, pasando del 71'0 al 76'2 % cuando la viscosidad desciende de 1'068 a 1'009 mP (Tabla 4.9.). La disminución del coeficiente de difusión provocada por el aumento de viscosidad del medio, reduce la adsorción de las proteínas sobre la superficie del relleno cromatográfico. Sin embargo, el incremento del 5'2 % que se produce en el rendimiento de recuperación proteico no es suficiente, como para justificar la reducción de la viscosidad mediante dilución de la muestra, debido al consecuente incremento que se produce en el volumen de líquido a aplicar, lo que disminuye la eficiencia del proceso de lecho expandido en términos de tiempo y economía. Por esta razón podemos concluir que no conviene una dilución adicional de la muestra.

4.2.2.3. Escalado del proceso

La utilización de la metodología CALE tiene la ventaja frente a las metodologías convencionales, de ser una tecnología susceptible de ser escalada con el objetivo de poder obtener cantidades apreciables de las proteínas de interés, con el fin de utilizarlas en aplicaciones tales como la de colorantes naturales en los sectores de alimentación y cosmética. 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. La metodología 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 de CALE (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 = 0´88 y viscosidad = 1´068 mP, fase móvil de equilibrado y lavado tampón acetato pH 5´5 (50 mM) y fase de elución tampón acetato pH 5´5 (250mM) (Imagen 4.7.). 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 4.7.

Experiencia de CALE en columna de $50 \cdot 1'5$ cm. Volumen extracto aplicado = 710 ml.

Vflujo (aplicación y lavado) = 198 cm h^{-1} . Vflujo (elución) = 90 cm h^{-1} .

Los tiempos de operación empleados para esta columna se muestran en Tabla 4.10.

Tabla 4.10.

Tiempos de operación en las etapas de CALE en columna de $50 \cdot 1'5$ cm para el extracto de B-PE procedente de los tratamientos previos.

SUBETAPA	TIEMPO (min)
Equilibrado	30
Aplicación	74
Lavado	38
Elución	94
Limpieza	45
TOTAL	281

Para seguir la evolución del proceso de CALE 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 la Tabla 4.11. 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 ($A_{565 \text{ corregida}}$) 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.



Tabla 4.11.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante el proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 1'5 cm.

APLICACIÓN Y LAVADO	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅	F.D.	A ₅₆₅ Corregida
	1	14	7'00	0'0000	1	0'0000
	2	27	27'50	0'0000	1	0'0000
	3	27	54'50	0'0000	1	0'0000
	4	27	81'50	0'0214	1	0'0214
	5	27	108'50	0'0452	1	0'0452
	6	28	136'00	0'0641	1	0'0641
	7	30	165'00	0'0802	1	0'0802
	8	30	195'00	0'0855	1	0'0855
	9	30	225'00	0'0913	1	0'0913
	10	30	269'00	0'0943	1	0'0943
	11	31	285'50	0'1003	1	0'1003
	12	31	316'50	0'1016	1	0'1016
	14	30	362'56	0'1039	1	0'1039
	16	31	409'00	0'1051	1	0'1051
	18	31	455'50	0'1062	1	0'1062
	20	31	502'00	0'1109	1	0'1109
	22	31	548'50	0'1098	1	0'1098
	24	31	595'00	0'1108	1	0'1108
	26	31	641'50	0'1113	1	0'1113
28	31	688'00	0'1084	1	0'1084	
30	31	734'50	0'1093	1	0'1093	
32	31	781'00	0'1090	1	0'1090	
34	31	827'50	0'1106	1	0'1106	
36	31	874'00	0'1092	1	0'1092	



Tabla 4.11.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante el proceso de CALE
para el extracto de B-PE en columna de 50 · 1'5 cm.

(Continuación Tabla 4.11.)

	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅	F.D.	A ₅₆₅ Corregida
APLICACIÓN Y LAVADO	38	18	914'00	0'1137	1	0'1137
	40	19	961'50	0'0105	1	0'0105
	42	21	997'00	0'0091	1	0'0091
	44	28	1033'00	0'0096	1	0'0096
	46	28	1076'00	0'0033	1	0'0033
ELUCIÓN	47	22	1087'00	0'0000	1	0'0000
	48	16	1106'00	0'0000	1	0'0000
	49	20	1124'00	0'1730	1	0'1730
	50	2	1135'00	0'9100	1	0'9100
	51	10	1141'00	0'1960	7	1'3720
	52	4	1148'00	0'2500	7	1'7500
	53	16	1158'00	0'2965	7	2'0760
	54	18	1175'00	0'2723	7	1'9061
	55	16	1192'00	0'2237	7	1'5659
	56	18	1209'00	0'1321	7	0'9247
	57	16	1226'00	0'0842	7	0'5894
	58	18	1243'00	0'0533	7	0'3731
	59	16	1260'00	0'0349	7	0'2443
	61	18	1294'00	0'1882	1	0'1882
	62	16	1311'00	0'1365	1	0'1365
	63	18	1328'00	0'1092	1	0'1092
	64	16	1345'00	0'0896	1	0'0896
	65	18	1362'00	0'0740	1	0'0740
	67	16	1396'00	0'0460	1	0'0460



Tabla 4.11.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante el proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 1'5 cm.

(Continuación Tabla 4.11.)

ELUCIÓN	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅	F.D.	A ₅₆₅ Corregida
	69	16	1430'00	0'0442	1	0'0442
	71	16	1464'00	0'0217	1	0'0217
	73	16	1498'00	0'0165	1	0'0165
	75	16	1532'00	0'0154	1	0'0154
	77	16	1566'00	0'0075	1	0'0075
	79	16	1600'00	0'0057	1	0'0057

La Figura 4.7. muestra el perfil cromatográfico de la experiencia de CALE para el extracto de B-PE, donde se puede seguir el valor de la absorbancia a 565 nm (característica de B-PE) en función del volumen eluido en cada momento, como variable de monitorización empleada para el seguimiento del proceso completo de CALE.



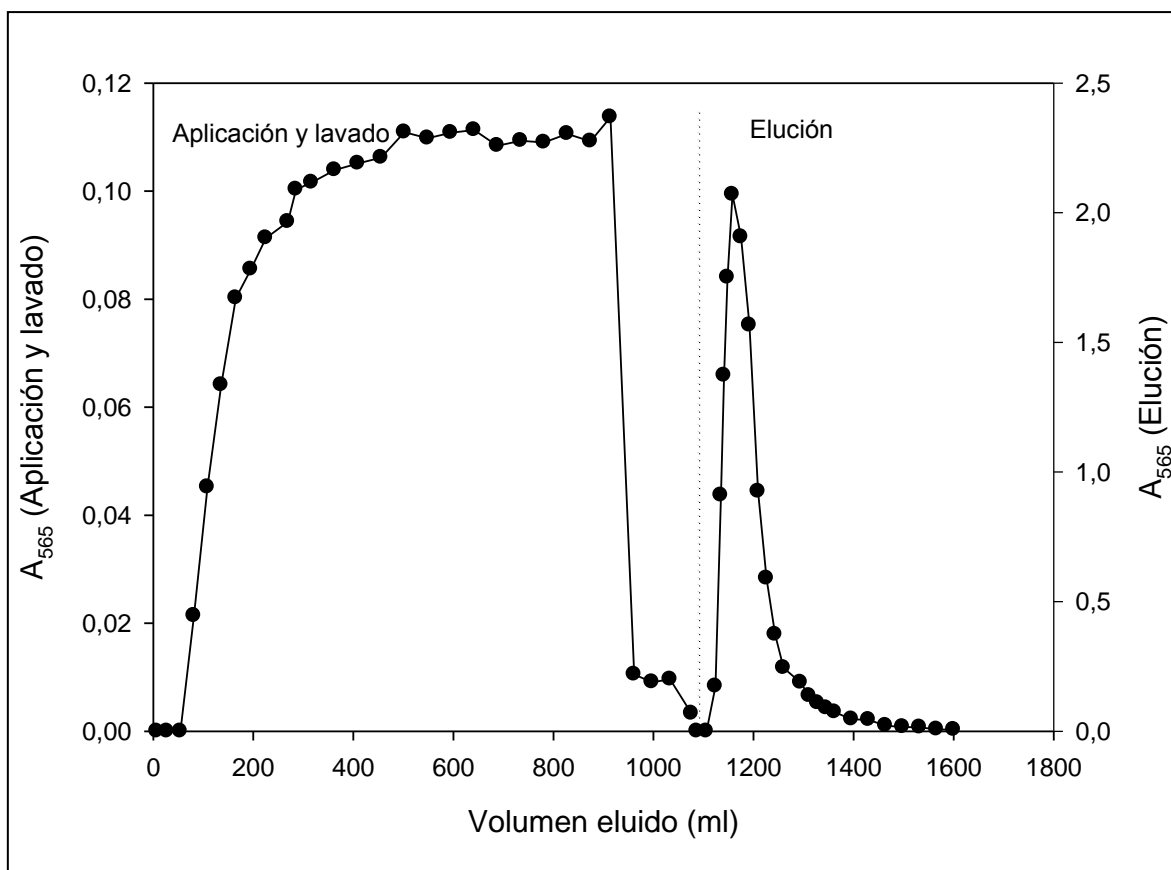


Figura 4.7.

Perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna 50 · 1'5 cm. Volumen extracto crudo de B-PE aplicado = 710 ml. Carga = 0'88 mg B-PE/ml adsorbente.

Vflujo (aplicación y lavado) = 198 cm h⁻¹. Vflujo (elución) = 90 cm h⁻¹.

La cantidad de B-PE recuperada durante la etapa de lecho expandido, 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 71%, lo que indica que la pérdida de biliproteínas producidas durante el proceso de lecho expandido (etapas de aplicación y lavado) ha sido relativamente 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 B-PE (Figura 4.8.). El espectro muestra una considerable y significativa pérdida de absorción en la banda de la región del

ultravioleta cercano A_{280} , si lo comparamos con el espectro correspondiente al extracto crudo de B-PE procedente de los tratamientos previos. Además la relación espectroscópica A_{545}/A_{280} igual a 2'5, es característica de una disolución enriquecida en B-PE y resulta cinco veces mayor que la misma relación correspondiente al extracto crudo procedente de los tratamientos previos ($A_{545}/A_{280} = 0'5$).

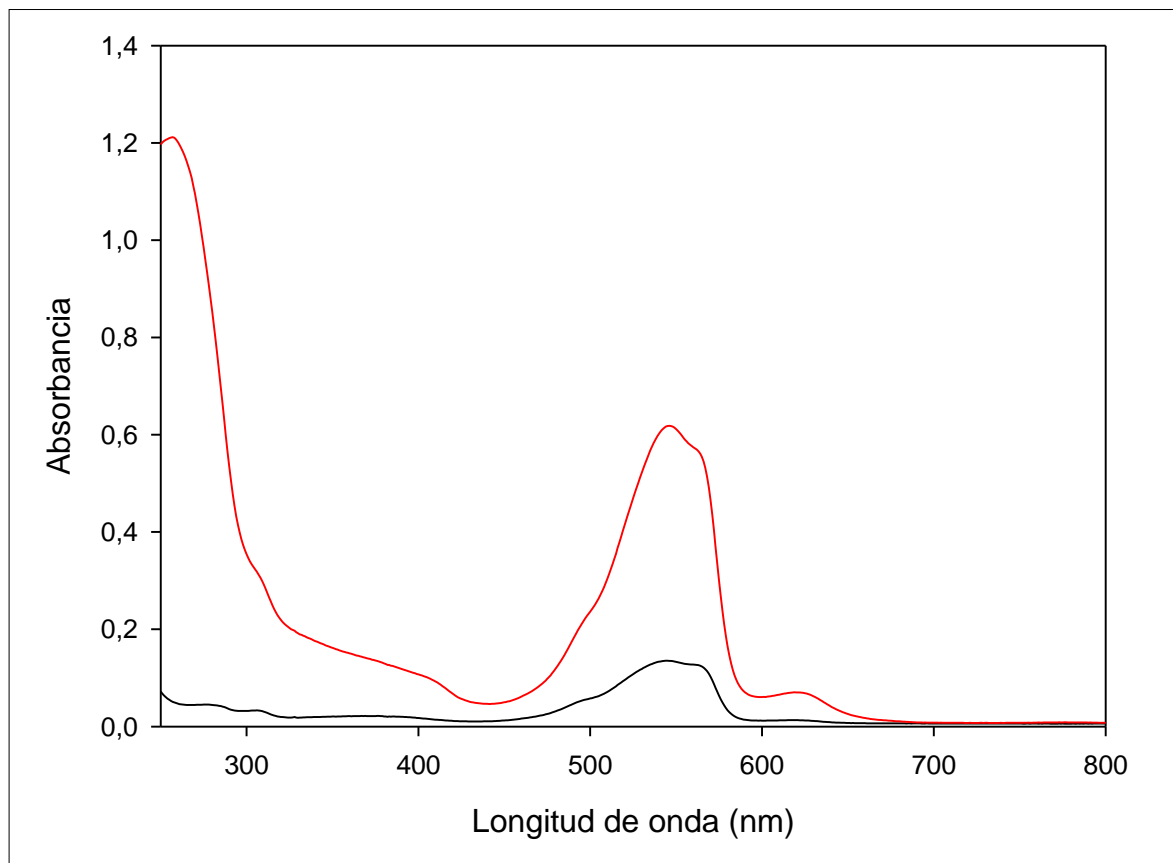


Figura 4.8.

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

Se puede observar en el perfil cromatográfico (Figura 4.7.), que las fracciones correspondientes a la fase de elución constituyen un pico estrecho y bien definido, lo que implica haber alcanzado un elevado factor de concentración de la muestra, conseguido al trabajar en formato lecho empaquetado para la fase de elución de la muestra. 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 eluída), son similares a los



reportados previamente por otros autores con muestras 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., 2006; Ramos y col., 2010; 2011).

El aumento notable que se produce en la relación A_{545}/A_{280} tras el paso de la muestra por la columna cromatográfica de adsorción, indica que la etapa de CALE produce un avance notable en la purificación de B-PE, por eliminación de la mayor parte de las moléculas que la acompañaban en el extracto: clorofilas, carotenos y otras proteínas de diferente naturaleza.

Por tanto, con este proceso se consigue un alto rendimiento de recuperación de B-PE, con un elevado grado de pureza en la misma, 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 ficoeritrinas y consecuentemente rendimientos muy inferiores además de necesitar tiempos superiores de trabajo (Bermejo y col., 1997; Moreno y col., 1997; Boussiba y Richmond, 1979; Gombos y col., 1984; Glazer, 1988; Jung y Dailey, 1989; Duerring y col., 1991; Hilditch y col., 1991; Tchernov y col., 1999; Campanella y col., 2000).

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 cromatográficas 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 = 0'88 y viscosidad = 1'068 mP, fase móvil de equilibrado y lavado tampón acetato pH 5'5 (50 mM) y fase de elución tampón acetato pH 5'5 (250 mM) (Imagen 4.8.). 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. Los tiempos de operación empleados para esta columna se muestran en Tabla 4.12.



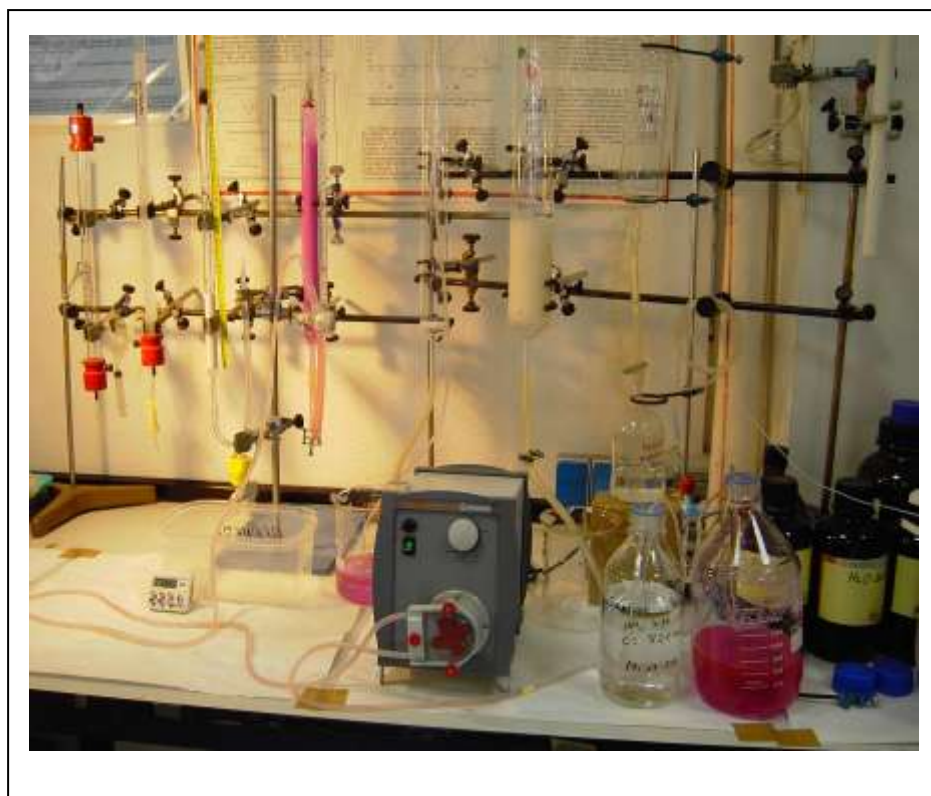


Imagen 4.8.

CALE en columna de 50 · 2'5 cm para la obtención de B-PE
procedente de *Porphyridium cruentum*.

Tabla 4.12.

Tiempos de operación en las etapas de CALE en columna de 50 · 2'5 cm
para el extracto de B-PE.

SUBETAPA	TIEMPO (min)
Equilibrado	50
Aplicación	104
Lavado	38
Elución	67
Limpieza	45
TOTAL	304

Para seguir la evolución del proceso de CALE 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 la Tabla 4.13. 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 ($A_{565 \text{ corregida}}$) 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.



Tabla 4.13.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante el proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 2'5 cm.

APLICACIÓN Y LAVADO	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅	F.D.	A ₅₆₅ Corregida
	1	25	12'5	0'0000	1	0'0000
	2	50	50	0'0000	1	0'0000
	3	50	100	0'0000	1	0'0000
	4	150	200	0'0000	1	0'0000
	5	50	300	0'0000	1	0'0000
	6	150	400	0'0000	1	0'0000
	7	50	450	0'0000	1	0'0000
	8	50	500	0'0000	1	0'0000
	9	50	550	0'0000	1	0'0000
	10	50	600	0'0380	1	0'0380
	11	100	675	0'0700	1	0'0700
	12	50	750	0'0975	1	0'0975
	14	50	800	0'1000	1	0'1000
	16	50	950	0'1100	1	0'1100
	18	50	1000	0'1150	1	0'1150
	20	150	1100	0'1200	1	0'1200
	22	50	1200	0'1250	1	0'1250
	24	150	1300	0'1300	1	0'1300
	26	50	1400	0'1400	1	0'1400
28	150	1500	0'1450	1	0'1450	
30	50	1550	0'1500	1	0'1500	
32	50	1600	0'1500	1	0'1500	
34	50	1650	0'1510	1	0'1510	
36	50	1700	0'1530	1	0'1530	



Tabla 4.13.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante el proceso de CALE
para el extracto de B-PE en columna de 50 · 2'5 cm.

(Continuación Tabla 4.13.)

	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅	F.D.	A ₅₆₅ Corregida
APLICACIÓN Y LAVADO	38	50	1750	0'1540	1	0'1540
	40	50	1800	0'1550	1	0'1550
	42	50	1850	0'1560	1	0'1560
	44	50	1900	0'1560	1	0'1560
	46	50	1950	0'1560	1	0'1560
	47	50	2000	0'1570	1	0'1570
	48	150	2100	0'1580	1	0'1580
	49	50	2200	0'1580	1	0'1580
	50	50	2300	0'1500	1	0'1500
	51	50	2350	0'0900	1	0'0900
	52	50	2400	0'0600	1	0'0600
	53	50	2450	0'0390	1	0'0390
	54	50	2500	0'0200	1	0'0200
	55	150	2600	0'0100	1	0'0100
	56	50	2700	0'0050	1	0'0050
	57	150	2800	0'0020	1	0'0020
	58	50	2900	0'0009	1	0'0009
	59	50	2950	0'0004	1	0'0004
	ELUCIÓN	61	50	3000	0'0000	1
62		50	3040	0'0600	1	0'0600
63		50	3060	0'8333	12	10'0000
64		50	3070	0'6916	12	8'3000
65		50	3100	0'4166	12	5'0000
67		50	3150	0'2416	12	2'9000



Tabla 4.13.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante el proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 2'5 cm.

(Continuación Tabla 4.13.)

ELUCIÓN	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅	F.D.	A ₅₆₅ Corregida
	69	50	3175	0'1500	12	1'8000
	71	50	3200	0'1714	7	1'2000
	73	50	3250	0'1428	7	1'0000
	75	50	3275	0'1285	7	0'9000
	77	50	3300	0'3000	1	0'3000
	79	50	3350	0'1000	1	0'1000
	80	50	3375	0'0900	1	0'0900
	81	50	3400	0'0000	1	0'0000

La Figura 4.9. muestra el perfil cromatográfico de la experiencia de CALE para el extracto de B-PE, donde se puede seguir el valor de la absorbancia a 565 nm característica de B-PE en función del volumen eluido en cada momento como variable de monitorización del proceso completo de CALE.



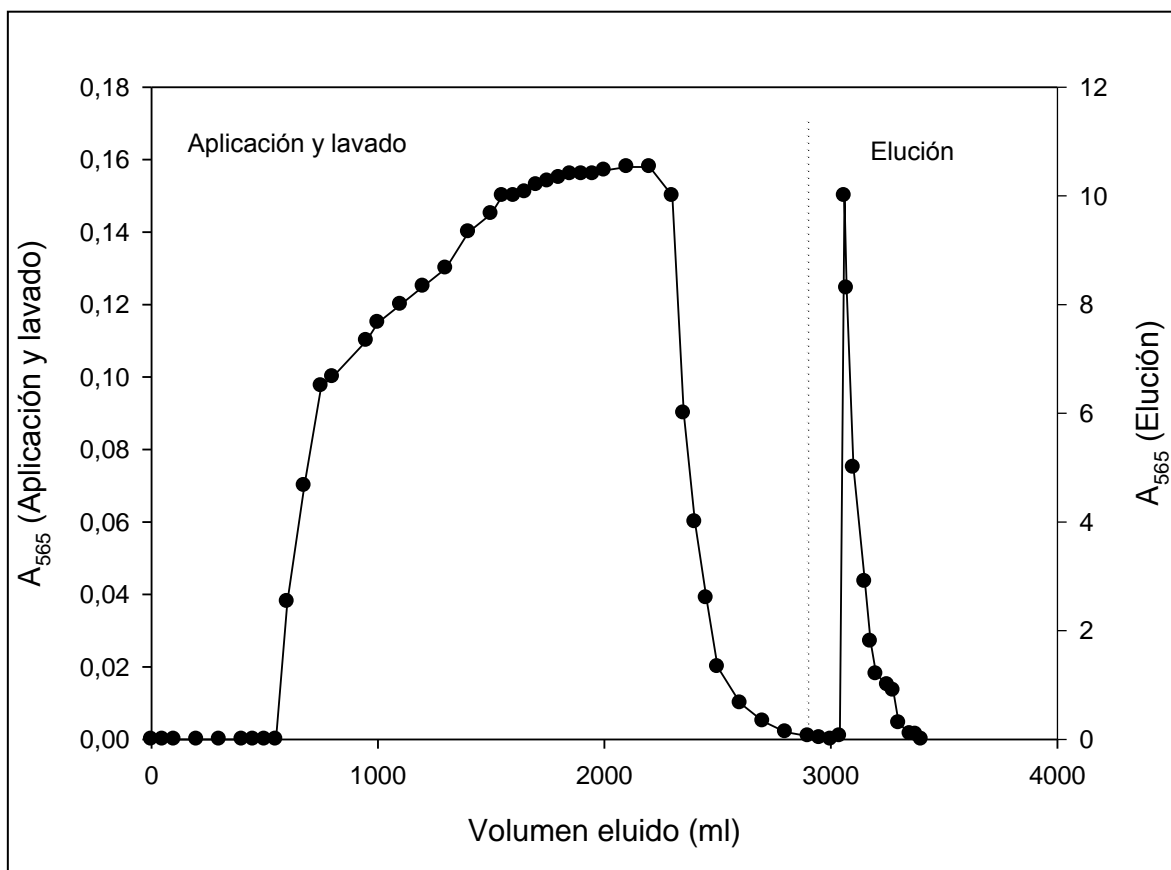


Figura 4.9.

Perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna 50 · 2'5 cm. Volumen extracto crudo de B-PE aplicado = 1963 ml. Carga = 0'88 mg B-PE/ml adsorbente. Vflujo (aplicación y lavado) = 198 cm h⁻¹. Vflujo (elución) = 90 cm h⁻¹.

La cantidad de B-PE recuperada durante la etapa de lecho expandido en columna de 2'5 cm de diámetro, 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 78 %.

Discusión análoga a la realizada para el caso de la columna de 50 · 1'5 cm puede hacerse en este caso, comprobando mediante los espectros uv-visible que el avance en la purificación de B-PE es bastante apreciable.

4.2.2.3.3. Columna de 4 cm

La siguiente columna utilizada ha sido la de 50 · 4 cm y los parámetros de trabajo han sido los mismos que en las anteriores columnas, obteniéndose un

comportamiento totalmente análogo. Los tiempos de operación empleados para esta columna se muestran en Tabla 4.14.

Tabla 4.14.

Tiempos de operación en las etapas de CALE en columna de 50 · 4 cm para el extracto de B-PE.

SUBETAPA	TIEMPO (min)
Equilibrado	55
Aplicación	108
Lavado	72
Elución	45
Limpieza	70
TOTAL	350

Los resultados obtenidos al medir las fracciones obtenidas se muestran en la Tabla 4.15.



Tabla 4.15.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante el proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 4 cm.

APLICACIÓN Y LAVADO	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅	F.D.	A ₅₆₅ Corregida
	1	123	61'5	0'0000	1	0'0000
	2	123	1845	0'0000	1	0'0000
	3	123	307'5	0'0159	1	0'0159
	4	123	430'5	0'0585	1	0'0585
	5	123	553'5	0'1022	1	0'1022
	6	123	676'5	0'1331	1	0'1331
	7	123	799'5	0'1433	1	0'1433
	8	123	922'5	0'1502	1	0'1502
	9	123	1045'5	0'1559	1	0'1559
	10	123	1168'5	0'1580	1	0'1580
	11	123	1291'5	0'1637	1	0'1637
	12	123	1414'5	0'1675	1	0'1675
	13	123	1537'5	0'1648	1	0'1648
	14	123	1660'5	0'1653	1	0'1653
	15	123	1783'5	0'1669	1	0'1669
	16	123	1906'5	0'1681	1	0'1681
	17	123	2029'5	0'1695	1	0'1695
	18	123	2152'5	0'1733	1	0'1733
	19	123	2275'5	0'1680	1	0'1680
	20	123	2398'5	0'1686	1	0'1686
	21	123	2521'5	0'1707	1	0'1707
	22	123	2644'5	0'1712	1	0'1712
	23	123	2767'5	0'1720	1	0'1720
24	123	2890'5	0'1682	1	0'1682	



Tabla 4.15.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante el proceso de CALE
para el extracto de B-PE en columna de 50 · 4 cm.

(Continuación Tabla 4.15.)

APLICACIÓN Y LAVADO	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅	F.D.	A ₅₆₅ Corregida
	25	123	3013'5	0'1723	1	0'1723
	26	123	3136'5	0'1731	1	0'1731
	27	123	3259'5	0'1724	1	0'1724
	28	123	3382'5	0'1775	1	0'1775
	29	123	3505'5	0'1750	1	0'1750
	30	123	3628'5	0'1738	1	0'1738
	31	123	3721'5	0'1761	1	0'1761
	32	123	3874'5	0'1749	1	0'1749
	33	123	3997'5	0'1746	1	0'1746
	34	123	4120'5	0'1752	1	0'1742
	35	123	4243'5	0'1764	1	0'1764
	36	123	4366'5	0'1727	1	0'1727
	37	123	4489'5	0'1758	1	0'1758
	38	123	4612'5	0'1729	1	0'1729
	39	123	4735'5	0'1668	1	0'1668
	40	123	4858'5	0'1739	1	0'1739
	41	123	4981'5	0'1626	1	0'1626
	42	123	5104'5	0'0992	1	0'0992
	43	123	5227'5	0'0700	1	0'0700
	44	123	5350'5	0'0501	1	0'0501
	45	123	5473'5	0'0421	1	0'0421
	46	123	5596'5	0'0345	1	0'0345
	47	123	5719'5	0'0329	1	0'0329
48	123	5842'5	0'0321	1	0'0312	



Tabla 4.15.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante el proceso de CALE
para el extracto de B-PE en columna de 50 · 4 cm.

(Continuación Tabla 4.15.)

	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅	F.D.	A ₅₆₅ Corregida
APLICACIÓN Y LAVADO	49	123	5965'5	0'0296	1	0'0296
	50	123	6088'5	0'0275	1	0'0275
	51	123	6211'5	0'0242	1	0'0242
	52	123	6334'5	0'0211	1	0'0211
	53	123	6457'5	0'0173	1	0'0173
	54	123	6580'5	0'0155	1	0'0155
	55	123	6703'5	0'0130	1	0'0130
	56	123	6826'5	0'0106	1	0'0106
	57	123	6949'5	0'0099	1	0'0099
	58	123	7072'5	0'0084	1	0'0084
	59	123	7195'5	0'0069	1	0'0069
	60	123	7318'5	0'0054	1	0'0054
	61	123	7441'5	0'0044	1	0'0041
ELUCIÓN	62	13,5	7448'5	0'1057	1	0'1057
	63	15,5	7524'5	0'3876	1	0'3876
	64	13	7538'5	0'2289	7	1'6020
	65	13	7551'5	0'6103	7	4'2720
	66	13	7564'5	0'7509	9	6'7580
	67	13	7577'5	0'6132	12	7'3580
	68	13	7594'5	0'5775	12	6'9300
	69	13	7607'5	0'5456	12	6'5470
	70	13	7620'5	0'4915	12	5'8980
	71	13	7633'5	0'4053	12	4'8640
	72	13	7646'5	0'3463	12	4'1560



Tabla 4.15.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante el proceso de CALE
para el extracto de B-PE en columna de 50 · 4 cm.

(Continuación Tabla 4.15.)

ELUCIÓN	Nº TUBO	VOL-TUBO	VOL-MEDIO	A ₅₆₅	F.D.	A ₅₆₅ Corregida
	73	13	7659'5	0'3320	12	3'9840
	74	13	7672'5	0'3284	12	3'9400
	75	13	7685'5	0'5560	7	3'8920
	76	13	7698'5	0'5331	7	3'7340
	77	13	7711'5	0'4942	7	3'4590
	78	13	7724'5	0'4464	7	3'1250
	79	13	7737'5	0'4157	7	2'9090
	80	13	7750'5	0'3615	7	2'5310
	81	13	7763'5	0'2831	7	1'9820
	82	13	7776'5	0'2731	7	1'9120
	83	13	7789'5	0'2017	7	1'4120
	84	13	7802'5	0'1699	7	1'1890
	85	13	7815'5	0'1641	7	1'1480
	86	13	7828'5	0'1225	7	0'8575
	87	13	7841'5	0'1008	7	0'7056
	88	13	7854'5	0'6242	1	0'6242
	89	13	7867'5	0'5849	1	0'5849
	90	13	7880'5	0'5090	1	0'5090
	91	13	7893'5	0'4564	1	0'4564
	92	13	7906'5	0'4088	1	0'4088
	93	13	7919'5	0'3652	1	0'3652
	94	2	7927'0	0'3170	1	0'3170
	95	13	7934'5	0'3170	1	0'3170
96	13	7947'5	0'2771	1	0'2771	



Tabla 4.15.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante el proceso de CALE
para el extracto de B-PE en columna de 50 · 4 cm.

(Continuación Tabla 4.15.)

ELUCIÓN	Nº TUBO	VOL-TUBO	VOL-MEDIO	A ₅₆₅	F.D.	A ₅₆₅ Corregida
	97	13	7960'5	0'2533	1	0'2533
	98	13	7973'5	0'2262	1	0'2262
	99	13	7986'5	0'1977	1	0'1977
	100	13	7999'5	0'1876	1	0'1876
	101	5,5	8008,5	0'1809	1	0'1809
	102	13	8018'0	0'1664	1	0'1664
	103	13	8031'0	0'1519	1	0'1519
	104	13	8044'0	0'1462	1	0'1462
	105	13	8057'0	0'1449	1	0'1449
	106	13	8064'0	0'1274	1	0'1274
	107	13	8083'0	0'1145	1	0'1145
	108	4	8091'5	0'1226	1	0'1226
	109	13	8100'0	0'1109	1	0'1109
	110	13	8113'0	0'1020	1	0'1020
	111	13	8126'0	0'0997	1	0'0997
	112	13	8139'0	0'0960	1	0'0960
	113	13	8152'0	0'0920	1	0'0920
	114	13	8165'0	0'0868	1	0'0868
	115	13	8178'0	0'0851	1	0'0851
116	13	8191'0	0'0800	1	0'0800	
117	13	8204	0'0760	1	0'0760	
118	13	8217'0	0'0630	1	0'0630	
119	13	8230'0	0'0554	1	0'0554	
120	13	8243'0	0'0525	1	0'0525	



Tabla 4.15.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante el proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 4 cm.

(Continuación Tabla 4.15.)

	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅	F.D.	A ₅₆₅ Corregida
ELUCIÓN	121	13	8256'0	0'0455	1	0'0455
	122	13	8269'0	0'0396	1	0'0396
	123	13	8282'0	0'0356	1	0'0356
	124	13	8295'0	0'0326	1	0'0326
	125	13	8308'0	0'0286	1	0'0286

La Figura 4.10. muestra el perfil cromatográfico de la experiencia de CALE para el extracto de B-PE, donde se puede seguir el valor de la absorbancia a 565 nm característica de B-PE en función del volumen eluido en cada momento como variable de monitorización del proceso completo de CALE.



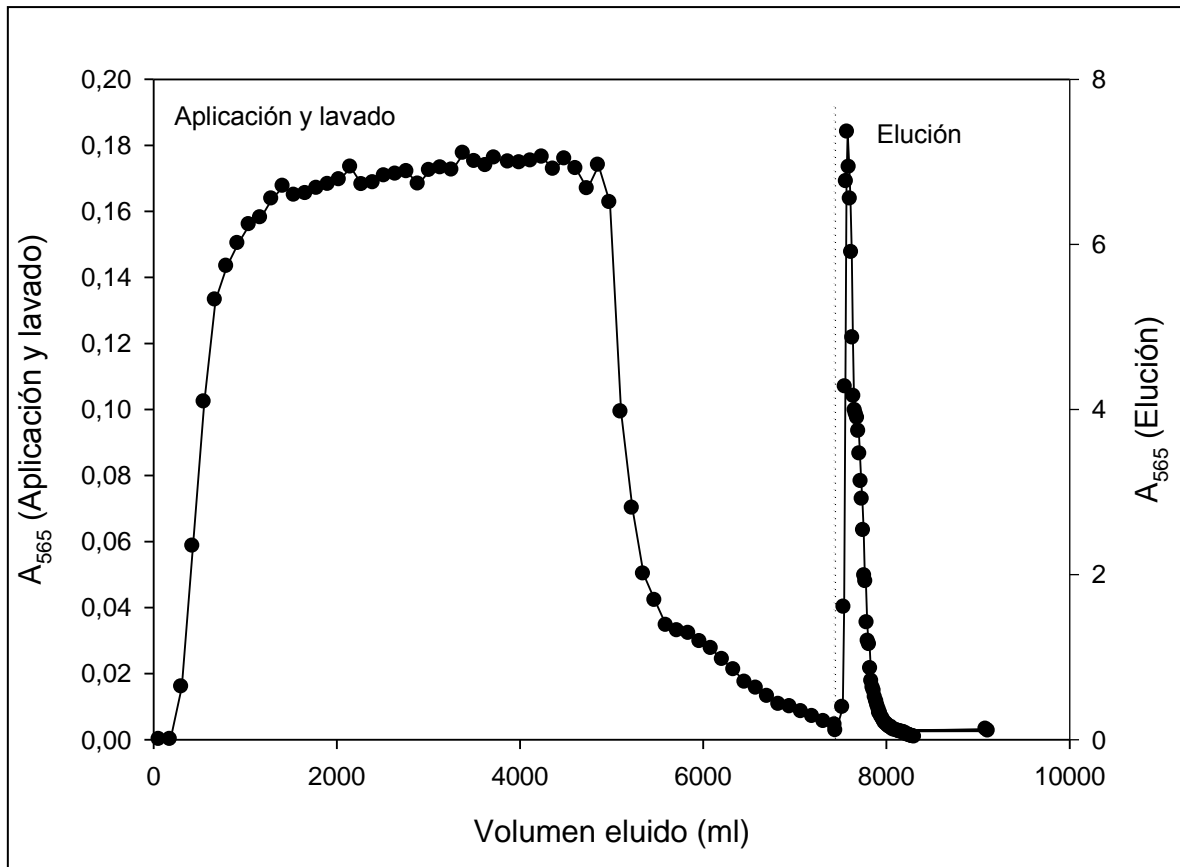


Figura 4.10.

Perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna 50 · 4 cm. Volumen extracto crudo de B-PE aplicado = 5020 ml. Carga = 0'88 mg B-PE/ml adsorbente. Vflujo (aplicación y lavado) = 198 cm h⁻¹. Vflujo (elución) = 90 cm h⁻¹.

La cantidad de B-PE recuperada durante la etapa de lecho expandido en columna de 4 cm de diámetro, 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 71'5 %.

También en este punto puede hacerse una discusión análoga a la realizada para el caso de la columna de 50 · 1'5 cm, comprobando mediante los espectros uv-visible que el avance en la purificación de B-PE es bastante similar.

La Imagen 4.9. muestra el detalle de la experiencia y en ella puede apreciarse la columna del lecho expandido teñida de rosa debido a la fijación de B-PE sobre el relleno Streamline DEAE, durante la etapa de aplicación de la

muestra.



Imagen 4.9.

Experiencia de CALE en columna de 50 · 4 cm. Volumen extracto crudo de B-PE aplicado = 5020 ml. Vflujo (aplicación y lavado) = 198 cm h⁻¹. Vflujo (elución) = 90 cm h⁻¹.

4.2.2.3.4. Columna de 6 cm

Por último y utilizando los correspondientes parámetros optimizados, se ha procedido al desarrollo de una experiencia óptima en columna de 50 · 6 cm. Los tiempos de operación empleados para esta columna se muestran en Tabla 4.16.

La Imagen 4.10. muestra el 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 4.10.

Detalle de la aplicación de la muestra a la columna de CALE (50 · 6 cm). El avance de la muestra a través del lecho cromatográfico es homogéneo y sin formación de canales preferentes.

Tabla 4.16.

Tiempos de operación en las etapas de CALE en columna de 50 · 6 cm para el extracto de B-PE.

SUBETAPA	TIEMPO (min)
Equilibrado	60
Aplicación	53
Lavado	75
Elución	57
Limpieza	80
TOTAL	325

Se ha seguido la evolución del proceso de CALE midiendo espectrofotométricamente las fracciones recogidas a la salida de columna. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.17.



Tabla 4.17.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante el proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 6 cm.

APLICACIÓN Y LAVADO	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅	F.D.	A ₅₆₅ Corregida
	1	123	61'5	0'0009	1	0'0009
	2	123	184'5	0'0011	1	0'0011
	3	123	307'5	0'0043	1	0'0043
	4	123	430'5	0'0239	1	0'0239
	5	123	553'5	0'0546	1	0'0546
	6	123	676'5	0'0856	1	0'0856
	7	123	799'5	0'1052	1	0'1052
	8	123	922'5	0'1245	1	0'1245
	9	200	1084'0	0'1431	1	0'1431
	10	200	1284'0	0'1509	1	0'1509
	11	200	1484'0	0'1640	1	0'1640
	12	200	1684'0	0'1698	1	0'1698
	13	200	1884'0	0'1728	1	0'1728
	14	200	2084'0	0'1745	1	0'1745
	15	200	2284'0	0'1777	1	0'1777
	16	200	2484'0	0'1784	1	0'1784
	17	200	2684'0	0'1803	1	0'1803
	18	200	2884'0	0'1756	1	0'1756
	19	200	3084'0	0'1776	1	0'1776
	20	200	3284'0	0'1858	1	0'1858
	21	200	3484'0	0'1825	1	0'1825
	22	200	3684'0	0'1870	1	0'1870
	23	200	3884'0	0'1931	1	0'1931
24	200	4084'0	0'1871	1	0'1871	



Tabla 4.17.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante el proceso de CALE
para el extracto de B-PE en columna de 50 · 6 cm.

(Continuación Tabla 4.17.)

APLICACIÓN Y LAVADO	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅	F.D.	A ₅₆₅ Corregida
	25	200	4284'0	0'1892	1	0'1892
	26	200	4484'0	0'1811	1	0'1811
	27	200	4684'0	0'1870	1	0'1870
	28	200	4884'0	0'1858	1	0'1858
	29	200	5084'0	0'1878	1	0'1878
	30	200	5284'0	0'1870	1	0'1870
	31	200	5484'0	0'1866	1	0'1866
	32	200	5684'0	0'1868	1	0'1868
	33	200	5884'0	0'1633	1	0'1633
	34	200	6084'0	0'1699	1	0'1699
	35	200	6284'0	0'0756	1	0'0756
	36	200	6484'0	0'0571	1	0'0571
	37	200	6684'0	0'0391	1	0'0391
	38	200	6884'0	0'0309	1	0'0309
	39	200	7084'0	0'0304	1	0'0304
	40	200	7284'0	0'0273	1	0'0273
	41	200	7484'0	0'0255	1	0'0255
	42	200	7684'0	0'0225	1	0'0225
	43	200	7884'0	0'0182	1	0'0182
	44	200	8084'0	0'0173	1	0'0173
	45	200	8284'0	0'0166	1	0'0166
	46	200	8484'0	0'0157	1	0'0157
47	200	8684'0	0'0157	1	0'0157	



Tabla 4.17.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante el proceso de CALE
para el extracto de B-PE en columna de 50 · 6 cm.

(Continuación Tabla 4.17.)

	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅	F.D.	A ₅₆₅ Corregida
APLICACIÓN Y LAVADO	48	200	8884'0	0'0154	1	0'0154
	49	200	9084'0	0'0149	1	0'0149
	50	200	9284'0	0'0148	1	0'0148
	51	200	9484'0	0'0142	1	0'0142
	52	200	9684'0	0'0127	1	0'0127
	53	200	9884'0	0'0123	1	0'0123
	54	200	10084'0	0'0123	1	0'0123
	55	200	10284'0	0'0120	1	0'0120
	56	200	10484'0	0'0122	1	0'0122
	57	200	10684'0	0'0123	1	0'0123
	58	200	10884'0	0'0115	1	0'0115
	59	200	11084'0	0'0094	1	0'0094
	60	200	11284'0	0'0086	1	0'0086
	61	200	11484'0	0'0086	1	0'0086
	62	200	11684'0	0'0080	1	0'0080
ELUCIÓN	63	200	11884'0	0'0076	1	0'0076
	64	200	12084'0	0'0070	1	0'0070
	65	200	12284'0	0'0068	1	0'0068
	66	36	12402'0	0'1083	1	0'1083
	67	34	12437'0	0'6949	1	0'6949
	68	34	12471'0	0'1846	12	2'2150
	69	34	12505'0	0'2826	12	3'3910
	70	34	12539'0	0'3112	12	3'7340



Tabla 4.17.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante el proceso de CALE
para el extracto de B-PE en columna de 50 · 6 cm.

(Continuación Tabla 4.17.)

ELUCIÓN	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅	F.D.	A ₅₆₅ Corregida
	71	34	12573'0	0'2885	12	3'4620
	72	34	12607'0	0'2375	12	2'8500
	73	34	12641'0	0'2130	12	2'5560
	74	34	12675'0	0'1765	12	2'1180
	75	34	12709'0	0'1325	12	1'5900
	76	34	12743'0	0'1127	12	1'3520
	77	34	12777'0	0'1031	12	1'2370
	78	34	12811'0	0'0856	12	1'0270
	79	34	12845'0	0'0735	12	0'8820
	80	34	12879'0	0'0641	12	0'7690
	81	34	12913'0	0'6416	1	0'6416
	82	34	12947'0	0'5069	1	0'5069
	83	34	12981'0	0'4377	1	0'4377
	84	34	13015'0	0'3684	1	0'3684
	85	34	13049'0	0'3334	1	0'3334
	86	34	13083'0	0'2808	1	0'2808
	87	34	13117'0	0'2562	1	0'2562
	88	34	13151'0	0'2132	1	0'2132
	89	34	13185'0	0'1978	1	0'1978
	90	34	13219'0	0'1777	1	0'1777
	91	34	13253'0	0'1582	1	0'1582
	92	34	13287'0	0'1545	1	0'1545
	93	34	13321'0	0'1508	1	0'1508



Tabla 4.17.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante el proceso de CALE
para el extracto de B-PE en columna de 50 · 6 cm.

(Continuación Tabla 4.17.)

ELUCIÓN	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅	F.D.	A ₅₆₅ Corregida
	94	34	13355'0	0'1303	1	0'1303
	95	34	13389'0	0'1240	1	0'1240
	96	34	13423'0	0'1109	1	0'1109
	97	34	13457'0	0'1029	1	0'1029
	98	34	13491'0	0'0935	1	0'0935
	99	34	13525'0	0'0885	1	0'0885
	100	34	13559'0	0'0771	1	0'0771
	101	34	13593'0	0'0740	1	0'0740
	102	34	13627'0	0'0674	1	0'0674
	103	34	13661'0	0'0582	1	0'0582
	104	34	13695'0	0'0537	1	0'0537
	105	34	13729'0	0'0461	1	0'0461
	106	34	13763'0	0'0447	1	0'0447
	107	34	13797'0	0'0406	1	0'0406
	108	34	13831'0	0'0393	1	0'0393
	109	34	13865'0	0'0356	1	0'0356
110	34	13899'0	0'0364	1	0'0364	
111	34	13933'0	0'0345	1	0'0345	
112	34	13967'0	0'0337	1	0'0337	
113	34	14001'0	0'0312	1	0'0312	
114	34	14035'0	0'0287	1	0'0287	
115	34	14069'0	0'0263	1	0'0263	
116	34	14103'0	0'0251	1	0'0251	



Tabla 4.17.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante el proceso de CALE
para el extracto de B-PE en columna de 50 · 6 cm.

(Continuación Tabla 4.17.)

ELUCIÓN	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅	F.D.	A ₅₆₅ Corregida
	117	34	14137'0	0'0239	1	0'0239
	118	34	14171'0	0'0231	1	0'0231
	119	34	14205'0	0'0217	1	0'0217
	120	34	14239'0	0'0213	1	0'0213
	121	34	14273'0	0'0203	1	0'0203
	122	34	14307'0	0'0194	1	0'0194
	123	34	14341'0	0'0192	1	0'0192
	124	34	14375'0	0'0177	1	0'0177
	125	34	14409'0	0'0143	1	0'0143
	126	34	14443'0	0'0119	1	0'0119
	127	34	14477'0	0'0098	1	0'0098
	128	34	14511'0	0'0094	1	0'0094
	129	34	14545'0	0'0089	1	0'0089
	130	34	14579'0	0'0083	1	0'0083
	131	34	14613'0	0'0079	1	0'0079
	132	34	14647'0	0'0073	1	0'0073
	133	34	14681'0	0'0074	1	0'0074
	134	34	14715'0	0'0074	1	0'0074
	135	34	14749'0	0'0067	1	0'0067
136	34	14783'0	0'0070	1	0'0070	
137	34	14817'0	0'0071	1	0'0071	
138	34	14851'0	0'0070	1	0'0070	



La Figura 4.11. muestra el perfil cromatográfico de la experiencia de CALE para el extracto de B-PE, donde se puede seguir el valor de la absorbancia a 565 nm característica de B-PE en función del volumen eluido en cada momento como variable de monitorización del proceso completo de CALE.

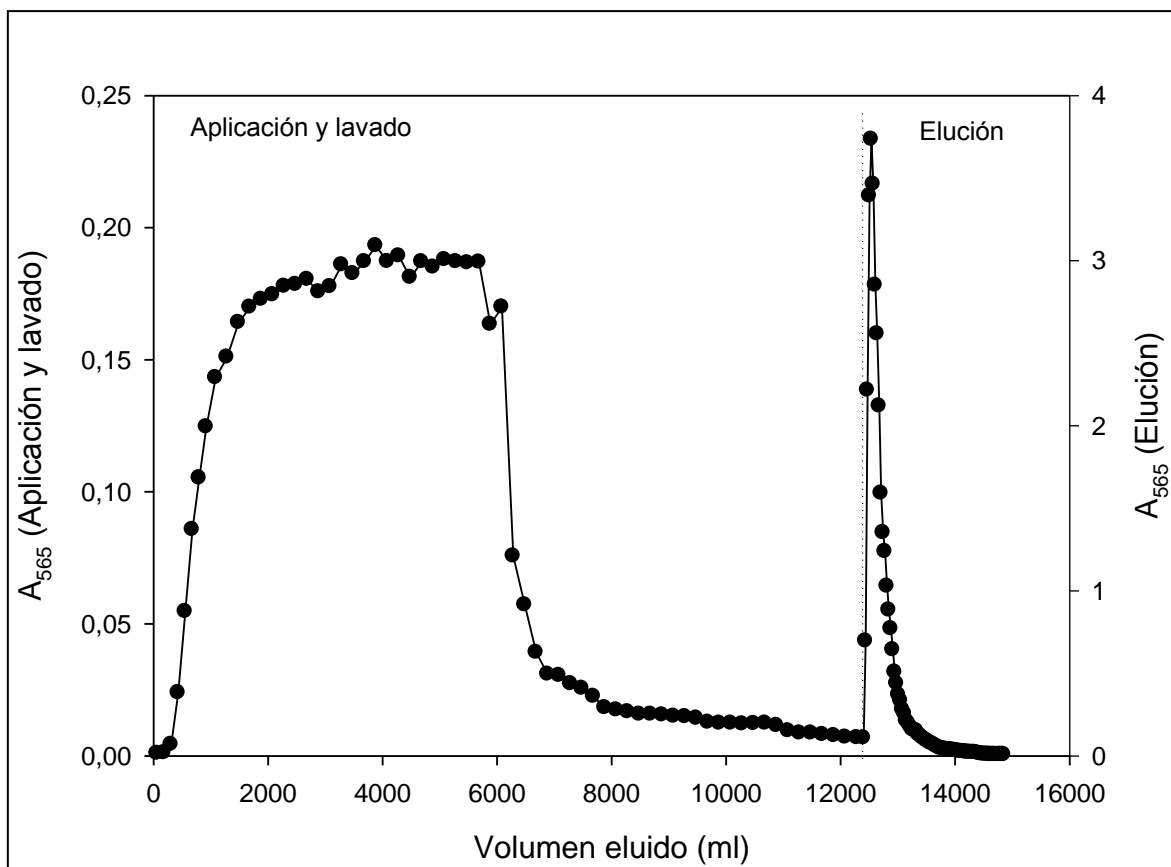


Figura 4.11

Perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna 50 · 6 cm. Volumen extracto crudo de B-PE aplicado = 11306 ml. Carga = 0'88 mg B-PE/ml adsorbente. Vflujo (aplicación y lavado) = 198 cm h⁻¹. Vflujo (elución) = 90 cm h⁻¹.

La cantidad de B-PE recuperada durante la etapa de lecho expandido en columna de 6 cm de diámetro, 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 74'4 %.

En la Tabla 4.18. se muestran, a modo de resumen, los diferentes parámetros (cantidad de proteína cargada, volumen de muestra, volumen de elución, etc...) utilizados en las diferentes experiencias con cada una de las

columnas. El rendimiento de recuperación en todas las columnas ensayadas se encuentra entre el 71-78 %. Además, los perfiles cromatográficos procedentes de las diferentes experiencias son muy similares y las disoluciones ricas en B-PE, procedentes de la etapa de desorción, poseen similares ratios de absorbancia $A_{545}/A_{280} > 2.5$, lo que indica que en el proceso de escalado se mantiene constante la pureza de la disolución obtenida. 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 factor de elución (SBV), calculado como cociente entre el volumen correspondiente al pico de elución y el volumen de lecho sedimentado.

Tabla 4.18.

Resumen de los datos correspondientes al escalado del proceso de recuperación de B-PE procedente de *P. cruentum* mediante adsorción en lecho expandido utilizando una altura de lecho sedimentado igual a 15 cm y una velocidad de flujo igual a $198 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ en columnas de Streamline de 15 a 60 mm de diámetro interno.

Diámetro interno de columna (mm)	B-PE cargada (mg)	Volumen de muestra (ml)	Factor de elución (SBV)	Pico de elución (ml)	Volumen sedimentado (ml)	Tiempo total de operación (min)	Recuperación de B-PE (%)
15	24	710	41'2	1112	27	149	71'0
25	63	1963	41'4	3064	74	213	78'0
40	165	5020	40'2	7588	189	225	71'5
60	373	11306	41'3	17521	424	239	74'4

$X_m = 0.88 \text{ mg B-PE/ml adsorbente}$. $H/H_0=2$ y viscosidad de la muestra= 1.068 mP .

Como conclusión los resultados muestran que la cromatografía de adsorción de lecho expandido es una metodología escalable que permite la obtención de grandes cantidades de B-ficoeritrina, sin que por ello se acompañe de pérdidas apreciables de la proteína de interés. Se mantienen así unos elevados rendimientos de recuperación, mientras que se reducen los costos y tiempo de operación si comparamos con otras metodologías anteriormente utilizadas.



4.2.3.-PRODUCCIÓN DE B-PE ULTRAPURA.

Una vez finalizada la etapa de CALE, se obtiene una disolución rica en B-PE, junto con otras moléculas que la acompañan. El objetivo de la siguiente etapa es obtener pura la ficoeritrina que aparece en el extracto enriquecido tras la etapa de CALE. Así, se ha obtenido, estudiado y caracterizado B-PE ultrapura. Por tanto, se describe a continuación la purificación de B-PE procedente del extracto enriquecido tras la etapa de CALE, tomando como partida los trabajos previos desarrollados por nuestro grupo de investigación para la purificación de otras biliproteínas similares (Bermejo y col., 1997; 2002a, 2003a; 2006). Así, la disolución rica en ficoeritrina procedente de la etapa de CALE constituye la muestra de partida para la etapa cromatográfica siguiente, que tiene como objetivo la obtención de B-PE pura y que se ha realizado en formato de cromatografía empaquetada convencional.

La muestra enriquecida en B-PE y procedente de CALE, posee contaminación de otra biliproteína que es R-PC y que se caracteriza por ser una ficocianina (ver Tabla 2.7.). Así, el objetivo de obtener B-PE pura se ha alcanzado usando cromatografía de intercambio iónico, pues de las técnicas cromatográficas ensayadas, ésta se ha mostrado como la más eficaz para distinguir entre dos proteínas tan similares como B-PE y R-PC.

4.2.3.1.-Cromatografía de intercambio iónico

Previamente se ha ensayado otro tipo de cromatografía como la de exclusión molecular, y no se consiguieron resultados satisfactorios en lo que a pureza y contaminación de B-PE se refiere (datos no mostrados).

Sin embargo la utilización de cromatografía de intercambio iónico si ha permitido, jugando con los valores de pH y fuerza iónica, obtener B-PE pura satisfactoriamente.

Así, la Tabla 4.19. muestra los resultados obtenidos con la mejor de las experiencias realizadas. Si analizamos los resultados mostrados en dicha Tabla,



la suma de las fracciones donde aparece B-PE pura ($R > 3.5$), genera una masa de B-PE (56.41 mg), que se corresponde con un 69.6 % de rendimiento de recuperación proteico.

Tabla 4.19.

Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas en cromatografía de intercambio iónico con matriz cromatográfica DEAE celulosa DE-52. Dimensión columna= 45 · 9 cm.

Altura relleno= 15 cm. Vol._{muestra aplicado}= 26ml. $[B-PE]_{muestra}$ = 3.12 mg/ml.

Velocidad flujo= 2.35 cm·h⁻¹.

Nº tubo	A ₂₈₀	A ₅₄₅	A ₅₆₅	A ₆₂₀	A ₆₅₀	R	V _{Tubo} (ml)	F.D.	[B-PE] (mg/ml)	mg B-PE
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-	25	1	0.0000	0.000
2	0.041	0.037	0.035	0.091	0.030	0.9	12	1	0.0007	0.008
3	0.094	0.142	0.131	0.180	0.044	1.5	120	1	0.0067	0.804
4	0.150	0.180	0.068	0.075	0.035	1.2	120	1	0.0126	3.120
5	0.132	0.132	0.122	0.076	0.036	1	120	1	0.0088	1.056
6	0.256	0.588	0.575	0.094	0.038	2.3	100	1	0.0442	4.420
7	0.696	2.575	2.613	0.109	0.041	3.7	25	1	0.1839	4.597
8	0.133	0.716	0.677	0.006	0.001	5.4	120	5	0.0562	33.72
9	0.450	1.921	1.843	0.023	0.011	4.3	120	1	0.1508	18.10
10	0.185	0.557	0.534	0.010	0.005	3.0	120	1	0.0436	5.232
11	0.047	0.075	0.068	0.001	0.003	1.6	700	1	0.0059	4.130

$$R = A_{545}/A_{280}$$

A la vista de los resultados, se reúnen las fracciones 7, 8 y 9 obteniéndose una disolución de B-PE pura cuyo espectro de absorción característico se muestra en la Figura 4.12., donde únicamente aparecen los máximos característicos de esta biliproteína.



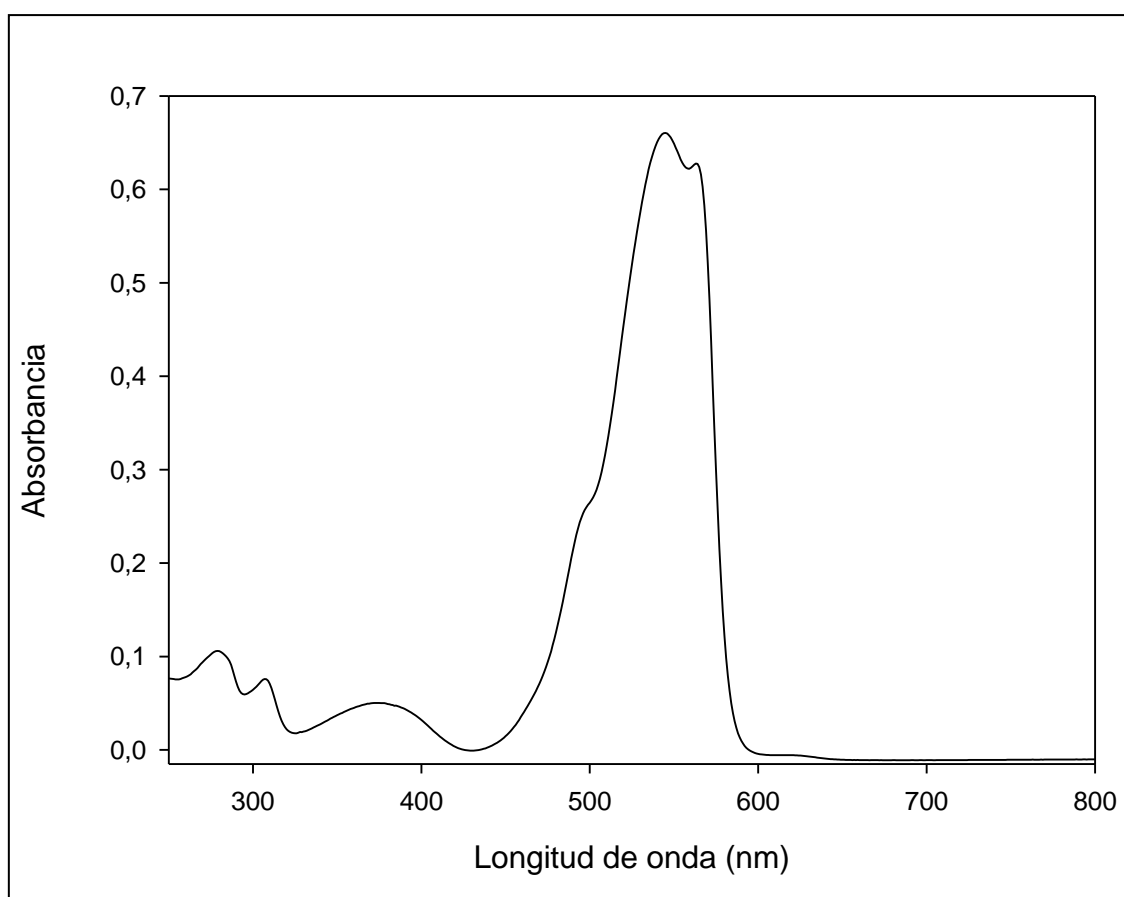


Figura 4.12.

Espectro de absorción de B-PE pura procedente de cromatografía de intercambio iónico, utilizando DEAE celulosa DE-52.

La Imagen 4.11. muestra el detalle del proceso de elución en gradiente discontinuo de F.I. de la muestra rica en ficoeritrinas procedente de CALE, en la columna de intercambio iónico utilizando DEAE-52 como relleno cromatográfico. Se puede apreciar durante el desarrollo de la cromatografía, que inicialmente eluye la contaminación que acompaña en la muestra a B-PE y que mayoritariamente está constituida por la proteína azul R-PC. Posteriormente al variar la F.I. de la fase móvil, comienza a eluir B-PE pura, constituyendo la banda de color rosa intenso que aparece a continuación y que genera las fracciones instensamente coloreadas que se recogen al abandonar el lecho cromatográfico. Por tanto, se consigue de esta forma la obtención de una disolución pura de B-PE lista, para su posterior utilización.



Imagen 4.11.

Detalle de la elución en gradiente discontinuo de F.I. para la obtención de B-PE pura. En A) se aprecia como inicialmente eluyen proteínas contaminantes tales como R-ficocianina (banda azul) y en B) comienza la elución de B-PE al utilizar fase móvil de mayor F.I. (banda de intenso color rosa)

4.2.3.2.-Evaluación global del proceso de purificación

Una vez completado el proceso de purificación de B-ficoeritrina, se puede pasar a evaluar el rendimiento global del proceso. Así, utilizando los rendimientos de recuperación de ficoeritrina obtenidos en cada una de las tres etapas que constituyen el proceso, se ha calculado el valor global de porcentaje de recuperación.

La Tabla 4.20., muestra los valores parciales y el rendimiento global de recuperación basado en las determinaciones de B-PE en las distintas etapas de purificación.

Tabla 4.20.

Rendimientos de recuperación y evolución del grado de pureza de las fracciones de las diferentes etapas del proceso de purificación de B-PE.

Etapas	%Recuperación B-PE	A₅₄₅/A₂₈₀	Denominación
Extracción	100	0'5	Extracto crudo rico en biliproteínas
Lecho expandido (CALE)	78	2'8	Disolución enriquecida en ficoeritrina
Lecho empaquetado	69'6	>3'5	B-ficoeritrina pura
Recuperación Total	54		

El rendimiento para la etapa de extracción, ha sido calculado teniendo en cuenta cuatro extracciones repetitivas, ya que con éstas se conseguía la recuperación del total de biliproteínas presentes en la biomasa. El rendimiento estimado en la etapa de CALE (78%), corresponde al mejor valor obtenido durante el proceso de escalado, y la etapa de intercambio iónico produce un 69'6% de rendimiento. Así, el rendimiento global de recuperación de B-PE se sitúa en el



54%, valor, muy superior al obtenido mediante metodologías convencionales y del mismo orden a los obtenidos en la purificación de otras biliproteínas de la familia de las ficocianinas, usando la misma metodología de CALE (Ramos, 2011).

Por otro lado, y teniendo en cuenta la cantidad total de B-PE presente en el extracto microalgal y el rendimiento global de recuperación de B-PE, se puede concluir que se puede llegar a obtener una cantidad de B-PE ultrapura con respecto a la cantidad de biomasa microalgal de partida del 1'4% (Figura 4.13.).

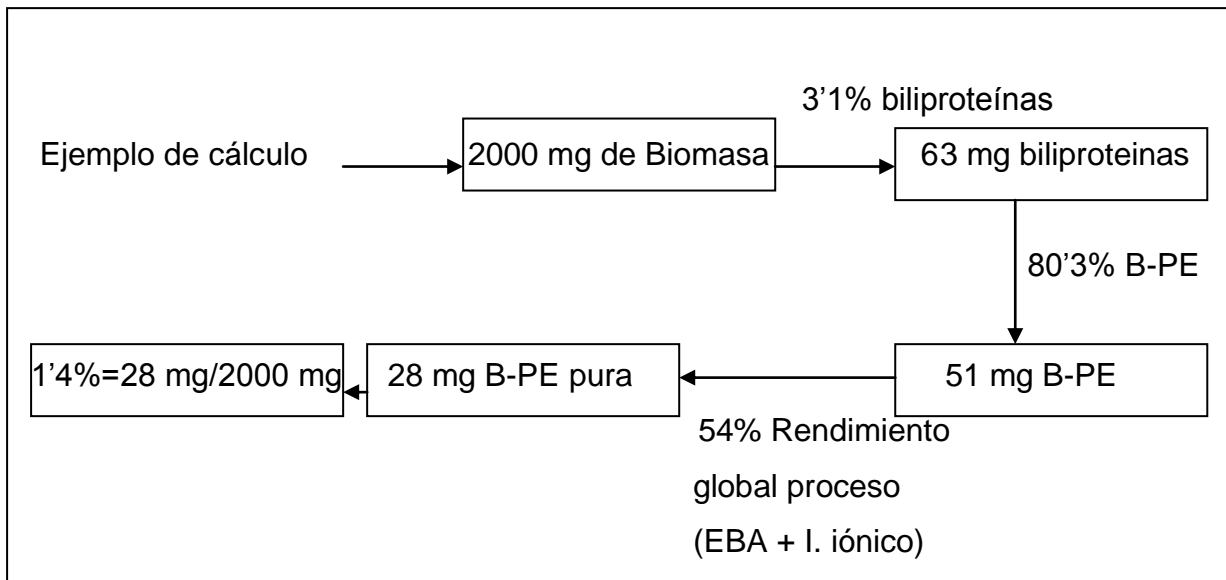


Figura 4.13.

Esquema de los rendimientos del proceso de extracción y purificación de B-PE.

4.2.4.-IDENTIFICACIÓN DE LA BILIPROTEINA PURIFICADA

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 obtenida la ficoeritrina de interés, se ha procedido a su identificación.

4.2.4.1.-Análisis espectroscópico

Inicialmente, las disoluciones de B-PE purificada se precipitan con sulfato amónico al 70% y tras la correspondiente centrifugación y eliminación de



sobrenadante, los residuos se resuspenden en tampón fosfato pH 7 (50mM). Posteriormente se dializan frente al mismo tampón y se liofilizan las muestras para almacenarlas a 4°C, hasta el momento de su utilización (Imagen 4.12.). La biliproteína purificada se ha identificado espectroscópicamente mediante la utilización de absorción, fluorescencia y anisotropía de estado estacionario siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.3.



Imagen 4.12.

Diálisis de B-PE pura procedente de la precipitación con sulfato amónico de la disolución obtenida tras cromatografía de intercambio iónico con DEAE-52.

Así, la Figura 4.14., muestra los espectros de absorción uv-visible y emisión de fluorescencia en estado estacionario, correspondientes a B-PE purificada en tampón fosfato pH 7 (50mM). La Figura 4.15. muestra el correspondiente espectro de anisotropía de fluorescencia característico de la macromolécula biológica.

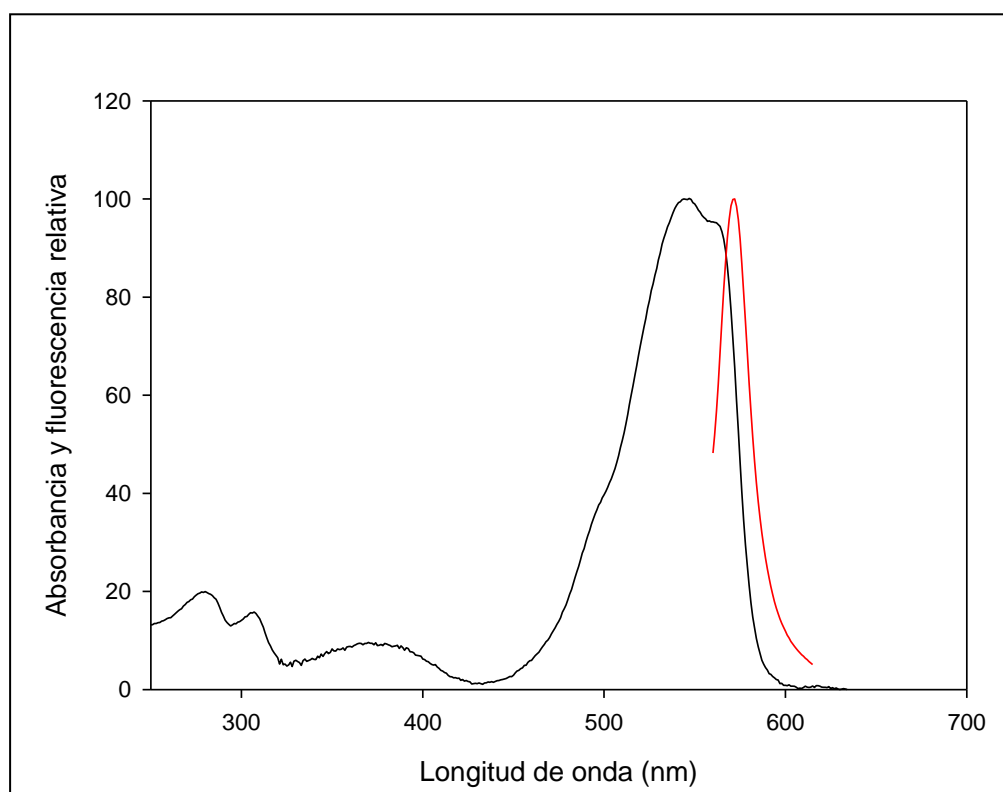


Figura 4.14.

Espectro de absorción uv-visible (—) y de emisión de fluorescencia (—) ($\lambda_{\text{ex}}=540$ nm) de B-PE en tampón fosfato pH 7 (50mM).

El espectro de absorción uv-visible de B-PE presenta máximos característicos a 280, 310, 375, 545 y 565 nm y un hombro a 498 nm. La relación espectroscópica A_{545}/A_{280} está por encima de 3'5, valor característico de disoluciones puras de B-PE. Así mismo, el espectro de emisión de fluorescencia de B-PE presenta una sola banda con un máximo de emisión a 576 nm. Estas características espectroscópicas de B-PE (a baja fuerza iónica y pH entorno a la neutralidad) corresponden a las que presentan las disoluciones hexaméricas de la macromolécula en estado nativo $(\alpha\beta)_6\gamma$ (Glazer, 1999), que es la forma más estable de esta proteína en las condiciones de purificación empleadas.

Para la obtención del espectro de anisotropía de la Figura 4.15., la longitud de onda de emisión se fijó adecuadamente y la de excitación se varió cada 5 nm, entre 465 y 565 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 4.21.

Tabla 4.21.

Valores de polarización y anisotropía de fluorescencia de B-PE en tampón fosfato 50 mM (pH 7). $\lambda_{em} = 575$ nm. Cada valor ha sido calculado como media de cinco medidas experimentales.

$\lambda_{excitación}$ (nm)	Polarización (P)	Anisotropía (A)
465	0'00194	0'0013
470	0'00100	0'00067
475	0'00598	0'004
480	0'00100	0'00067
485	0'00299	0'0020
490	-0'00586	-0'0039
495	0'00194	0'0013
500	-0'01099	-0'0073
505	-0'02099	-0'0139
510	-0'02404	-0'0159
515	-0'01901	-0'0126
520	-0'01901	-0'0126
525	-0'01962	-0'0130
530	-0.01962	-0'0130
535	-0'02571	-0'0170
540	-0'02800	-0'0185
545	-0'02892	-0'0191
550	-0'01704	-0'0113
555	0'00598	0'004
560	0'03190	0'0215
565	0'05290	0'0359



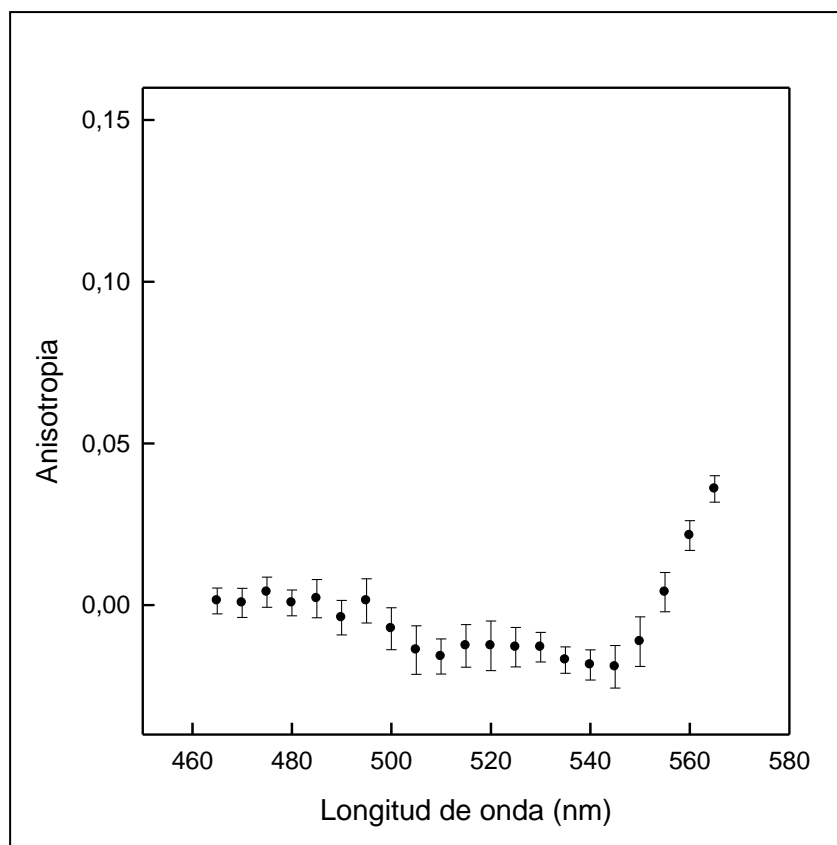


Figura 4.15.

Espectro de anisotropía de fluorescencia de B-PE ($\lambda_{em}= 575$ nm),

Los valores de anisotropía de fluorescencia son la media de cinco determinaciones y las barras de error reflejadas corresponden a la desviación estándar de las mismas.

Todos los datos espectroscópicos mostrados 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 la macromolécula ha sido purificada correctamente y en el estado de agregación descrito.

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 de las diferentes etapas que constituyen el proceso de purificación de



B-PE.

La Figura 4.16. muestra un gel de electroforesis tipo SDS-PAGE en el que se puede apreciar el avance en el proceso de purificación de B-PE.

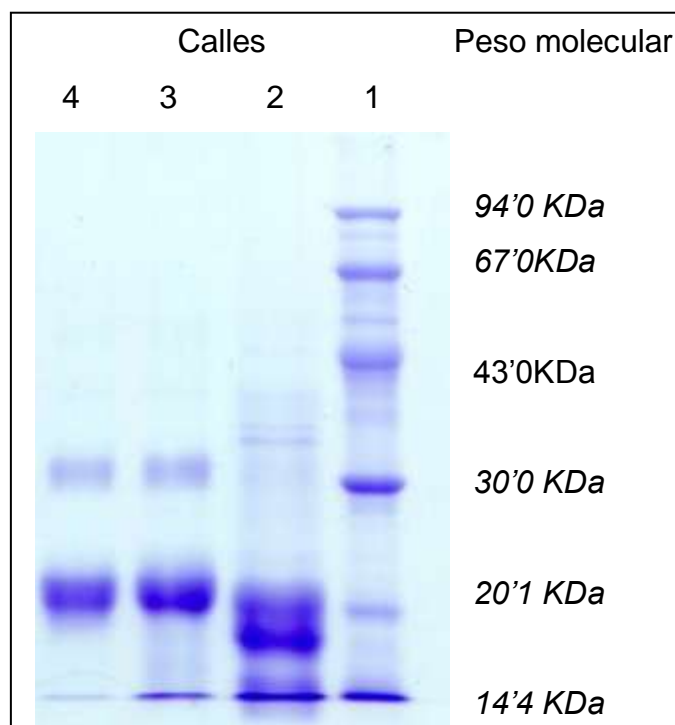


Figura 4.16.

SDS-PAGE de las disoluciones procedentes de las distintas etapas del proceso de purificación de B-PE. Calle 1 = patrones de peso molecular, calle 2 = extracto crudo de biliproteínas, calle 3 = disolución rica en ficoeritrina procedente de CALE, calle 4 = B-PE purificada tras la etapa de cromatografía de intercambio iónico.

En esta Figura 4.16., el avance de las calles 2 a 4 muestra como las proteínas contaminantes que acompañan a la ficoeritrina 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 dos bandas una situada entorno a los 20'1 KDa de peso molecular que pertenecería a la combinación no resuelta de las subunidades α y β de B-PE, y la otra cercana a 30'0 KDa, que pertenecería a la subunidad γ de la proteína purificada. 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 B-PE, R-PC 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 las proteínas contaminantes procedentes del extracto crudo (calle 2) han sido eliminadas con las etapas de CALE e intercambio iónico (calle 4).

4.2.4.3.-Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se han realizado experiencias de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando las muestras de la biliproteína purificada y siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.5. De esta forma, se ha corroborado la pureza de la disolución de biliproteína obtenida. Así, los diferentes cromatogramas mostraron únicamente los picos correspondientes a las subunidades γ , α y β de B-PE, sin que aparezcan otros picos que pudieran denotar presencia de otros compuestos contaminantes.

La Figura 4.17. muestra el cromatograma correspondiente a la muestra de B-PE purificada, apareciendo el pico correspondiente a la subunidad γ a los 10 minutos, subunidad α a los 14 minutos y el correspondiente a la subunidad β a 21 minutos de tiempo de retención respectivamente.

La separación que se obtiene para B-PE es buena ya que los picos correspondientes a las subunidades γ , α y β se encuentran bien resueltos.

La primera parte del cromatograma muestra una resolución parcial de al menos dos de las especies isoméricas en que se presenta la subunidad γ de B-PE y que en el análisis electroforético no se pueden resolver, apareciendo como una única banda alrededor de 30 KDa de peso molecular.



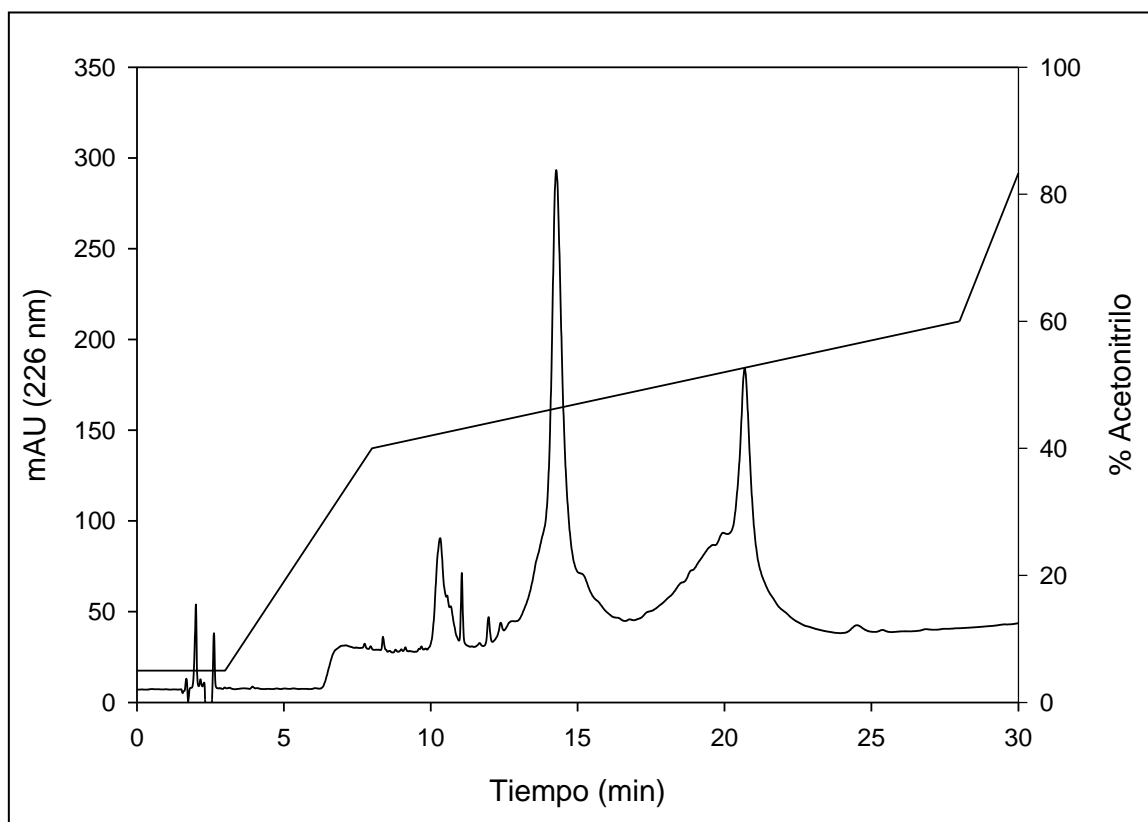


Figura 4.17.

Cromatograma de la muestra de B-PE purificada
obtenido utilizando RP-HPLC con una columna C8 (150 · 4'6 mm).

4.2.5.-PLANTA PILOTO PARA LA PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE B-PE

Una vez estudiado el escalado del proceso de purificación utilizando CALE, se ha procedido al desarrollo de una planta piloto de producción de ficoeritrina con el objetivo de obtener cantidades importantes de extracto rico en esta proteína, para así poder ensayar sus potenciales aplicaciones en diferentes sectores industriales (por ejemplo como colorantes naturales en alimentación, cosmética y farmacia).

4.2.5.1.-Columna de 9 cm

Previo a la utilización de la columna en escala planta piloto (15·130cm), se ha realizado una experiencia de CALE utilizando como aproximación previa una columna de 9 cm de diámetro interno, que complementaría al escalado del proceso. 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 ficocieritinas procedente de *Porphyridium cruentum*. 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 0'88 mg B-PE/ml adsorbente, viscosidad 1'205 mP, fase móvil de equilibrado y lavado tampón acetato pH 5'5 (50 mM) y fase de elución tampón acetato pH 5'5 (250mM). Es importante resaltar en este punto que el parámetro viscosidad ha cambiado, motivado por la nueva partida de biomasa de *P. cruentum* recibida. 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 ficoeritinas de interés. Los tiempos de operación empleados para esta columna se muestran en Tabla 4.22.

Tabla 4.22.

Tiempos de operación en las etapas de CALE en columna de 50 · 9 cm, para el extracto de B-PE, $[B-PE]_{\text{extracto}}=0'31$ mg/ml.

SUBETAPA	TIEMPO (min)
Equilibrado	85
Aplicación	382
Lavado	70
Elución	150
Limpieza	87
TOTAL	774



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 (Imagen 4.13). Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.23. y 4.24.

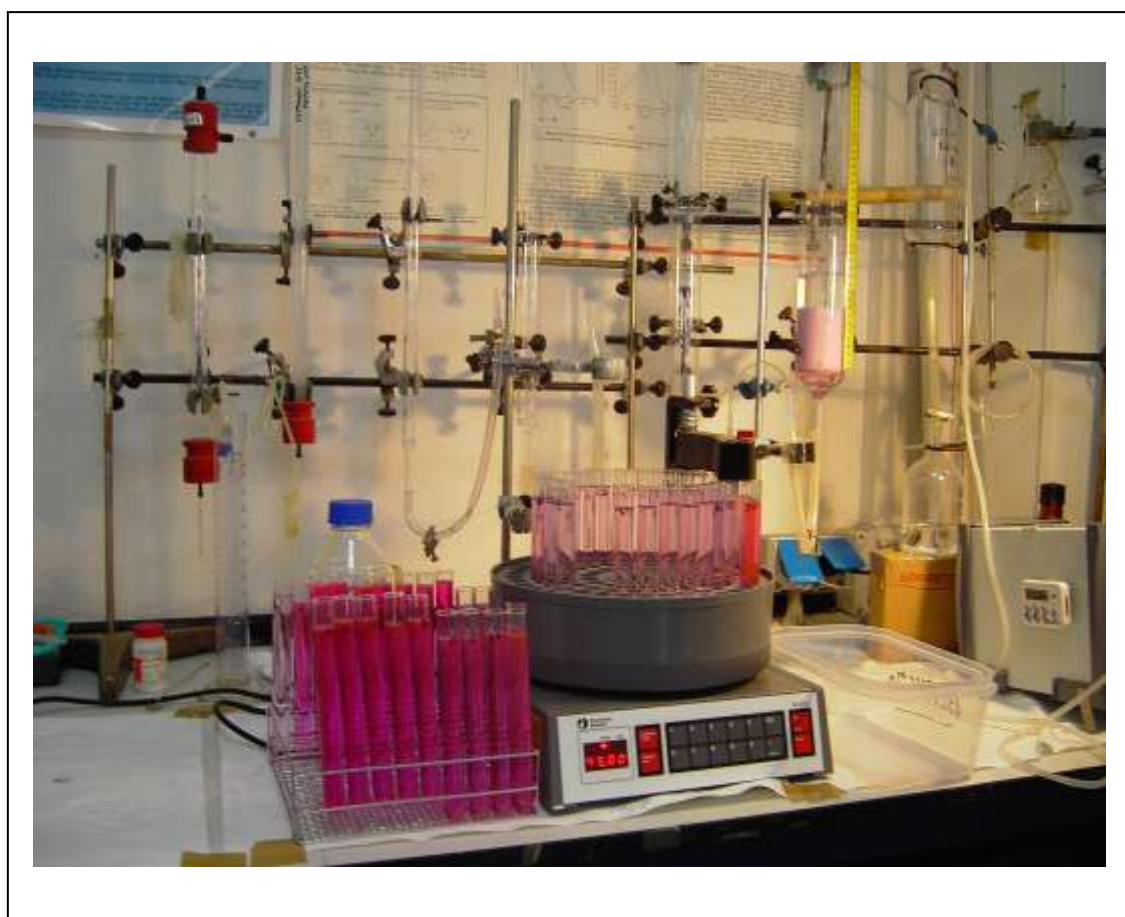


Imagen 4.13.

Columna de CALE (50 · 9 cm) para la obtención de ficoeritrina. Detalle de las fracciones recogidas tras elución de la columna en formato empaquetado.

La Figura 4.18. muestra el perfil cromatográfico de la experiencia de CALE para el extracto de B-PE, donde se puede seguir el valor de la absorbancia a 565 nm característica de B-PE, en función del volumen eluido en cada momento como variable de monitorización del proceso completo de CALE.

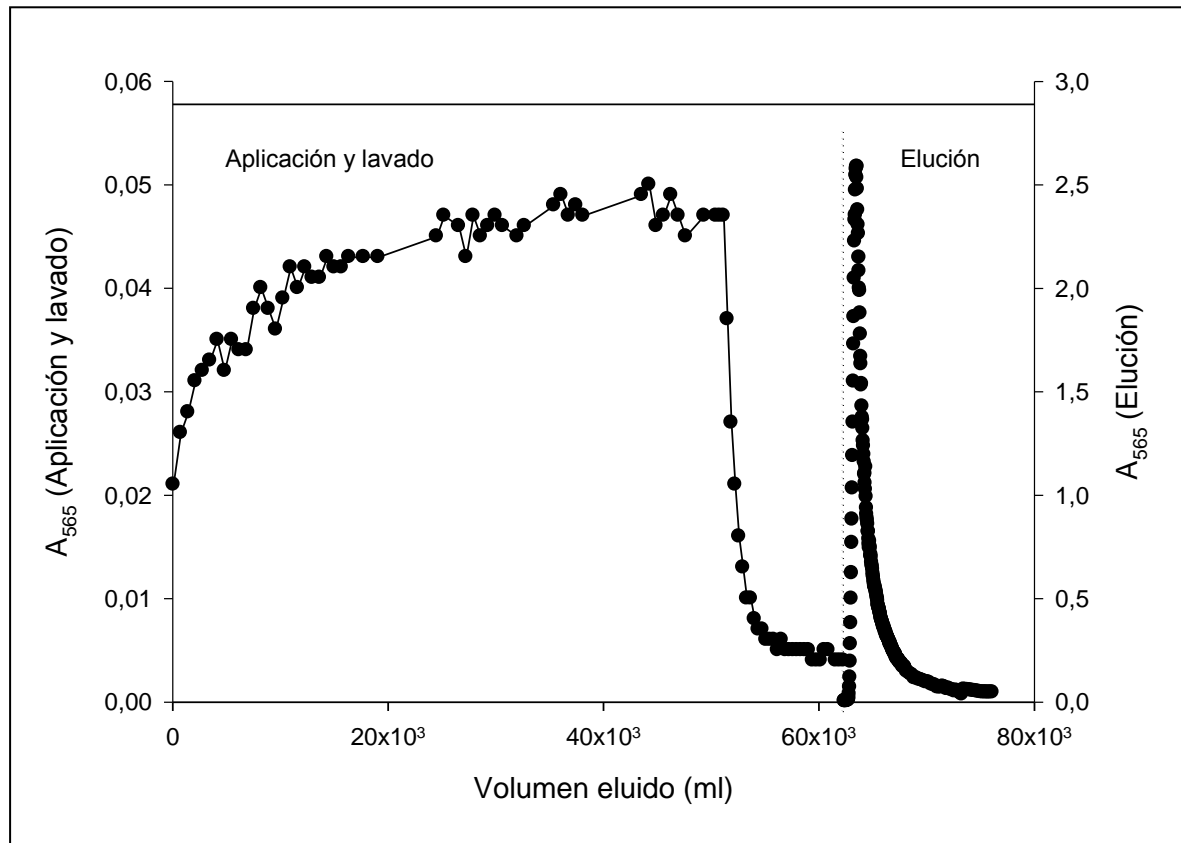


Figura 4.18.

Perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de $50 \cdot 9$ cm. Volumen

extracto aplicado= 54180 ml. $[B-PE]_{\text{extracto}}=0,31$ mg/ml.

Vflujo (aplicación y lavado)= $141,5$ cm h^{-1} . Vflujo (elución)= $122,6$ cm h^{-1} ..

Tabla 4.24.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de elución del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 9 cm.

(Ver datos completos en Anexo I)

ELUCIÓN	Nº TUBO	V _{TUBO}	V _{MEDIO}	A ₅₆₅	A ₆₂₀	A ₆₅₀	F.D.	[B-PE]	mg B-PE
	1	30	62394	0'004	0'001	0	1	0'000285	0'008552
	2	30	62424	0'004	0'001	0'001	1	0'000306	0'009179
	3	29	62453'5	0'004	0'001	0'001	1	0'000306	0'008873
	4	31	62483'5	0'004	0'001	0'001	1	0'000306	0'009485
	5	29	62513'5	0'004	0'001	0	1	0'000285	0'008267
	6	29	62542'5	0'005	0'002	0'001	1	0'000354	0'010291
	7	29	62571'5	0'005	0'001	0'001	1	0'000384	0'011157
	8	30	62601	0'004	0'001	0	1	0'000285	0'008552
	9	30	62631	0'004	0'001	0'001	1	0'000306	0'009179
	10	29	62660'5	0'006	0'002	0'002	1	0'000454	0'013180
	11	30	62690	0'006	0'002	0'001	1	0'000433	0'013008
	12	28	62719	0'006	0'002	0'001	1	0'000433	0'012140
	13	28	62747	0'007	0'002	0'001	1	0'000512	0'014345
14	29	62775'5	0'008	0'002	0'002	1	0'000612	0'017747	
.....	
.....	
.....	
.....	
.....	
.....	
241	178	76301	0'246	0'021	0'005	1	0'018847	3'354815	
242	2215	77497'5	0'861	0'075	0'027	1	0'066119	146'4543	
total								478'6830	

Las absorbancias cuyo factor de dilución es 6, se encuentran ya multiplicadas por este valor.



La cantidad de B-PE recuperada durante la etapa de lecho expandido (478'7 mg), expresada como porcentaje de la cantidad total en el eluído, por cantidad de biliproteína cargada en la matriz cromatográfica mediante aplicación de la muestra (839 mg), ha sido igual al 57 %.

4.2.5.2.-Columna escala planta piloto para producción de ficoeritrina (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 de aproximación en columna de 9 cm también ha generado resultados satisfactorios, se ha procedido al desarrollo de una planta piloto para la recuperación de grandes cantidades de ficoeritrinas 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 ficoeritrinas procedente de *Porphyridium cruentum* (Imagen 4.14.).





Imagen 4.14.

Planta piloto para la obtención de ficoeritrina. A) Columna planta piloto de CALE (130 · 15 cm). B) Muestra diluida para aplicación. C) Extracto crudo de biliproteínas procedente de los tratamientos previos.

Los parámetros de trabajo han sido: altura del relleno $H_0=50$ cm, grado de expansión $H/H_0=2$, carga proteica $0'32$ mg B-PE/ml adsorbente por lo que se cargaron 2792 mg de B-PE, viscosidad $1'127$ mP, fase móvil de equilibrado y lavado tampón acetato pH 5'5 (50 mM) y fase de elución tampón acetato pH 5'5 (250 mM). Como se puede comprobar, en este caso se ha utilizado una $H_0=50$ cm (en vez de 15cm), con objeto de obtener la mayor cantidad posible de ficoeritrinas. Los tiempos de operación empleados para la experiencia de planta piloto se muestran en Tabla 4.25. y los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.26. y 4.27.

Es importante resaltar que la carga protéica utilizada (0'32 mg B-PE/ ml adsorbente) ha sido inferior a la óptima 0'88 mg/ml debido a la no disposición de biomasa suficiente para poder generar más extracto y alcanzar ese valor previamente optimizado.

Tabla 4.25.

Tiempos de operación en las etapas de CALE en columna de 130 · 15 cm para el extracto de B-PE.

SUBETAPA	TIEMPO (min)
Equilibrado	105
Aplicación	244
Lavado	73
Elución	56
Limpieza	180
TOTAL	658



Tabla 4.26.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de aplicación y lavado del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 130 · 15 cm.

(Ver Tabla con datos completos en el Anexo II).

APLICACIÓN Y LAVADO	Nº TUBO	VOL-TUBO	VOL-MEDIO	A ₅₆₅
	1	177	10088'5	0
	2	178	11266	0
	3	180	13445	0
	4	178	15624	0'004
	5	182	17804	0'016
	6	182	19986	0'052
	7	179	22166'5	0'091
	8	180	24346	0'111
	9	180	26526	0'128
	10	180	28706	0'135
	11	176	30884	0'126
	12	174	33059	0'13
	13	178	35235	0'144
14	183	37415'5	0'146	
.....	
.....	
.....	
.....	
.....	
.....	
.....	
58	1130	136776	0'0028	
59	1080	139881	0'003	
60	360	142601	0'0082	



Tabla 4.27.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de elución del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 130 · 15 cm.

(Ver Tabla con datos completos en el Anexo II).

ELUCIÓN	Nº TUBO	V _{TUBO}	V _{MEDIO}	A ₅₆₅	A ₆₂₀	A ₆₅₀	F.D.	[B-PE]	mg B-PE
	1	94	143828	0,0511	0'0115	0'0029	1	0'00374197	0'3517449
	2	102	143926	0,0929	0'0182	0'0018	1	0'00680889	0'6945067
	3	101	144027'5	0,1631	0'0362	0'0061	1	0'01188863	1'2007519
	4	108	144132	0,2646	0'0589	0'0087	1	0'01925698	2'0797541
	5	100	144236	0,403	0'0887	0'013	1	0'02935429	2'9354288
	6	104	144338	0,5477	0'1197	0'017	1	0'03990553	4'1501754
	7	104	144442	0,7366	0'1545	0'0218	1	0'0538403	5'5993912
	8	102	144545	0,458	0'0937	0'0151	2	0'06715908	6'8502262
	9	116	144654	0,533	0'1117	0'0226	2	0'07820831	9'0721638
	10	106	144765	0,633	0'127	0'0231	2	0'0930631	9'8646884
	11	108	144872	0,701	0'1387	0'025	2	0'10315217	11'140434
	12	100	144976	0,754	0'148	0'0267	2	0'11101406	11'101406
13	105	145078'5	0,821	0'16	0'0287	2	0'12093191	12'697850	
.....	
.....	
.....	
.....	
.....	
.....	
.....	
.....	
133	277	163832'5	0'134	0'0164	0'0047	1	0'01015953	2'8141894	
134	575	164258'5	0'131	0'0132	0'0022	1	0'00996663	5'7308100	
135	600	164846	0'126	0'0127	0'0023	1	0'00958995	5'7539722	
Total								1362'4935	



La Imagen 4.15. 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 4.19. muestra el perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en planta piloto para el extracto de B-PE, donde se puede seguir el valor de la absorbancia a 565 nm característica de B-PE en función del volumen eluido en cada momento como variable de monitorización del proceso.





Imagen 4.15.

Detalle del ascenso homogéneo de la muestra en CALE para la obtención de ficoeritrina durante la fase de aplicación en la planta piloto desarrollada.

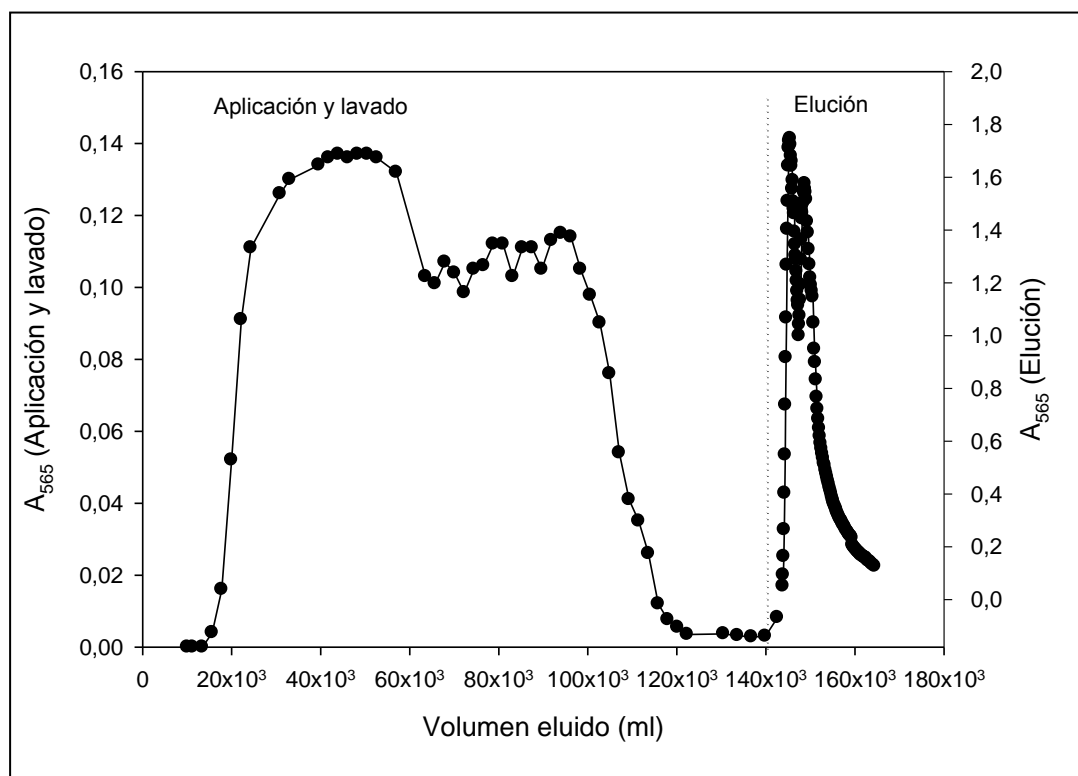


Figura 4.19.

Perfil cromatográfico de la experiencia de CALE en columna de 130 · 15 cm.

Volumen extracto aplicado= 94700 ml. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0,0295 \text{ mg/ml}$.

Vflujo (aplicación)= 170 cm h^{-1} . Vflujo (lavado)= 119 cm h^{-1} .

Vflujo (elución)= $1113,12 \text{ cm h}^{-1}$.

La Imagen 4.16. muestra como parte de la ficoeritrina de interés se queda retenida en el lecho cromatográfico, mientras que otra parte de B-PE y otras moléculas (carotenos, clorofilas...), no son adsorbidas por el relleno y eluyen por la parte superior del lecho cromatográfico.

La cantidad de B-PE recuperada en la planta piloto (1363 mg) expresada como porcentaje de la cantidad total en el eluido por cantidad de biliproteína cargada (2794 mg) en la matriz cromatográfica mediante aplicación de la muestra es igual al 48,8 %. Esta experiencia genera una importante cantidad de ficoeritrina y prueba de ello es la obtención de 1363 mg de B-PE, lo cual justificaría la utilización de CALE para la obtención de ficobiliproteínas para su aplicación industrial (Imagen 4.17.). Hay que resaltar, que se podrían obtener en vez de 1363

mg, si se hubiera tenido cantidad de extracto suficiente para alcanzar una carga de 0'88 mg B-PE/ml adsorbente y no de 0'32 mg B-PE/ml adsorbente, unos 3748 mg de B-PE por cada experiencia en planta piloto.



Imagen 4.16.

Detalle de la aplicación de la muestra en CALE para obtener ficoeritrinas. En la parte superior se puede apreciar como eluyen las moléculas no adsorbidas por el relleno.

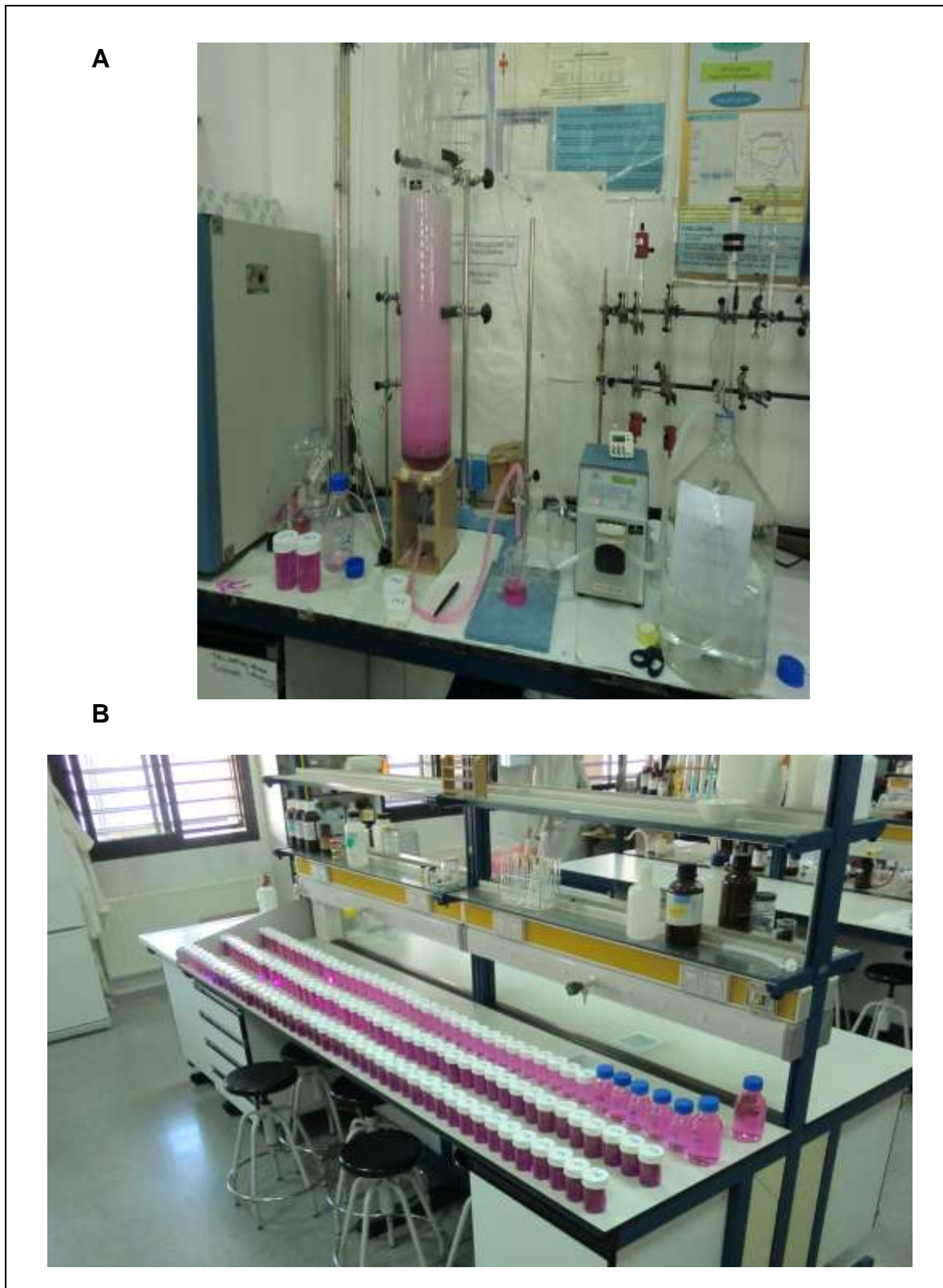


Imagen 4.17.

Detalle de la obtención de grandes cantidades de ficoeritrina en CALE. A) Detalle de la elución en formato lecho sedimentado y B) Detalle de el gran número de fracciones recogidas conteniendo B-PE.

Estos resultados, muestran la eficiencia del proceso de CALE desarrollado habiendo utilizado la planta piloto con columna de 15 cm de diámetro interno, lo que supone un factor de escala 100 veces superior a la columna (50·1'5 cm), en base a la sección transversal del flujo. La Tabla 4.28. resume todos los resultados obtenidos con las diferentes columnas utilizadas en las experiencias de CALE desarrolladas para obtener ficoeritrina.

Tabla 4.28.

Resumen de las experiencias desarrolladas para la recuperación de B-PE a través de CALE, utilizando columnas de diferente tamaño..

Diámetro de columna (cm)	BP-E cargada (mg)	Volumen muestra (ml)	[B-PE] muestra (mg/ml)	Factor elución (SBV)*	Pico elución (ml)	Volumen relleno sedimentado (ml)	Tiempo total (min)	Recuperación de B-PE (%)
1'5	24	710	0'033	41'2	1112	26'5	281	71'0
2'5	63	1963	0'033	41'4	3064	74	304	78'0
4	165	5020	0'033	40'2	7588	189	350	71'5
6	373	11306	0'033	41'3	17521	424	325	74'4
9	839	54180	0'0155			954	774	57
15	2792	94700	0'0295			8836	658	48'8

*: El factor de dilución se obtiene dividiendo el volumen del pico de elución por el volumen de relleno sedimentado.

Es importante resaltar que el valor SBV para la columna de 9 cm de diámetro no se muestra ya que no es comparativo con el resto debido a que las partidas de biomasa utilizadas fueron diferentes. Análogamente no se calcula el parámetro SBV para la columna planta piloto de 15 cm pues la partida de biomasa utilizada fue diferente y además la altura de lecho sedimentado utilizada para esta columna fue de 50 cm (con el fin de conseguir gran cantidad de ficocieritrina purificada) frente a los 15 cm para el resto de las columnas. Además para la planta piloto el valor de carga también fue diferente usándose uno igual a 0'32 mg B-PE/ml adsorbente frente al valor de 0'88 mg B-PE/ml adsorbente usado para las demás columnas.



Por lo anteriormente comentado, la utilización de una partida de *Porphyridium cruentum* diferente para el trabajo en las columnas de 9 y 15 cm de D.I., hace que los resultados sean diferentes y deban ser tratados haciendo las siguientes consideraciones.

Los porcentajes de recuperación en las experiencias de las columnas de 9 y 15 cm de D.I., son sensiblemente inferiores a los obtenidos con las columnas de D.I. comprendidas entre 1'5 y 6 cm. Esto se puede justificar teniendo en cuenta que la partida de biomasa de microalga fue diferente y los valores de viscosidad detectados en los extractos provenientes de los tratamientos previos fueron muy superiores a los obtenidos con las anteriores remesas de biomasa recibidas. Este aumento en la viscosidad se debe a la presencia de exopolisacáridos que el alga genera en gran cantidad cuando el cultivo de la misma se desarrolla en condiciones de estrés para el organismo vivo. Sin duda, la presencia de estos exopolisacaridos altera de forma importante la composición del extracto inicial tras los pretratamientos, haciendo que la transferencia de materia disminuya y por tanto que la adsorción en el relleno se vea dificultada, disminuyendo de forma apreciable el rendimiento de recuperación de B-PE en la etapa CALE.



4.3.-CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE FICOERITRINA Y SUS SUBUNIDADES

Una vez obtenida la ficoeritrina, se ha realizado la caracterización físico-química de dicha macromolécula purificada en su forma nativa hexamérica (Imagen 4.18.). Además, se ha procedido a obtener de forma semipreparativa las subunidades α , β y γ constitutivas de la ficoeritrina y también se han caracterizado.



Imagen 4.18.

Disolución de B-PE purificada procedente de la microalga *Porphyridium cruentum*.

4.3.1.-CARACTERIZACIÓN DE LA BILIPROTEÍNA PURIFICADA

A continuación se muestran los resultados de la caracterización de B-PE purificada y procedente de *Porphyridium cruentum*.

4.3.1.1.-Determinación del peso molecular

En este apartado se determina el peso molecular de la biliproteína purificada, calculado utilizando electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

B-PE está compuesta por tres subunidades distintas α , β , y γ . La subunidad α contiene 164 aminoácidos y posee dos grupos cromóforos del tipo ficoeritrobilina (PEB) y un peso molecular cercano a los 20000 Da. La subunidad β contiene 177 aminoácidos y posee tres grupos cromóforos ficoeritrobilinas y tiene un peso molecular próximo a 21000 Da. En su caso, la subunidad γ , también denominada polipéptido enlazante, no posee cromóforos y su peso molecular está próximo a los 28000 Da (Sidler y col., 1989; Ficner y col., 1992; Koller y Wehrmeyer, 1975; Redlinger y Gantt, 1984; Bermejo y col., 2002b).

En nuestro caso. el peso molecular determinado correspondiente a las subunidades de B-PE procedente de *Porphyridium cruentum*, ha sido de 20892 Da para la subunidad α , 21877 Da para la subunidad β y 30902 Da para la subunidad γ . Estos valores se han obtenido por comparación con los patrones de peso molecular en el gel de electroforesis SDS-PAGE (Figura 4.16.). Así, el monómero ($\alpha\beta$) tendrá por tanto un peso molecular de 42769 Da y la proteína en estado de agregación hexamérico ($\alpha\beta$)₆ γ posee un peso molecular de 287516 Da. El peso molecular determinado mediante electroforesis en gel tiene asociado un error de aproximadamente un 10%, debido a la propia naturaleza de la técnica. Estos resultados están en buena concordancia con los obtenidos anteriormente por otros autores, para B-PE procedente de la misma microalga u otras similares.



4.3.1.2.-Determinación de los parámetros espectroscópicos

Se han determinado los intervalos de concentraciones de B-PE óptimos para realizar los estudios mediante espectroscopias de absorción y de emisión de fluorescencia, es decir, aquellos intervalos de concentraciones en los que existe una buena linealidad entre las señales de absorción y fluorescencia frente a la concentración de proteína empleada.

Mediante las diluciones oportunas, se prepararon disoluciones de B-PE a partir de una disolución protéica madre preparada en tampón fosfato pH 7'0 (20 mM). Para las experiencias de absorción se emplearon disoluciones en el intervalo de concentraciones $[0'86 \cdot 10^{-7} \text{M} - 11'7 \cdot 10^{-7}] \text{ M}$, mientras que para las experiencias de emisión de fluorescencia el intervalo empleado fue $[0'21 \cdot 10^{-8} \text{M} - 21'4 \cdot 10^{-8}] \text{ M}$.

4.3.1.2.1.-Coeficiente de extinción molar

Se han realizado medidas de absorbancia a disoluciones con diferentes concentraciones de ficoeritrina, 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 4.29. muestra los valores de la absorbancia (medida en cubeta de 1 cm de paso de luz) en el máximo de absorción (545 nm) y las concentraciones de las disoluciones de B-PE utilizadas.



Tabla 4.29.

Valores de absorbancia a 545 nm, correspondientes a distintas concentraciones de B-PE en tampón fosfato pH=7 (20 mM).

Nº Disolución	[B-PE] mg/ml	[B-PE] ·10 ⁷ M*	Absorbancia (545nm)
1	0'020	0'86	0'27
2	0'030	1'17	0'36
3	0'050	1'92	0'61
4	0'060	2'74	0'86
5	0'080	3'50	1'10
6	0'100	4'44	1'40
7	0'130	5'43	1'69
8	0'150	6'28	1'92
9	0'160	6'70	2'03
10	0'170	7'12	2'12
11	0'187	8'00	2'30
12	0'201	8'60	2'40
13	0'229	9'80	2'60
14	0'274	11'70	2'80

*Utilizando un peso molecular de 234000 g/mol obtenido por SDS-PAGE para la forma hexamérica ($\alpha\beta$)₆ γ de B-PE (Bermejo y col., 2001).

En la Figura 4.20. se muestra la representación de la absorbancia a 545 nm frente a la concentración de B-PE. De ella puede deducirse que existe una buena linealidad hasta una concentración de $5'43 \cdot 10^{-7}$ M (0'13 mg/ml) aproximadamente, que corresponde a una absorbancia alrededor de 1'69 unidades. Mediante regresión lineal de esa zona de datos y la aplicación de la ley de Lambert-Beer, se ha calculado el coeficiente de extinción molar de B-PE. Los parámetros de ajuste son: ordenada en el origen = 0'00252, pendiente = $3'13 \cdot 10^6$ y $r^2 = 0'9999$. El coeficiente de extinción molar resulta así, $\epsilon_{545} = 3'13 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ó $\epsilon_{545} = 13$



$(\text{mg/ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

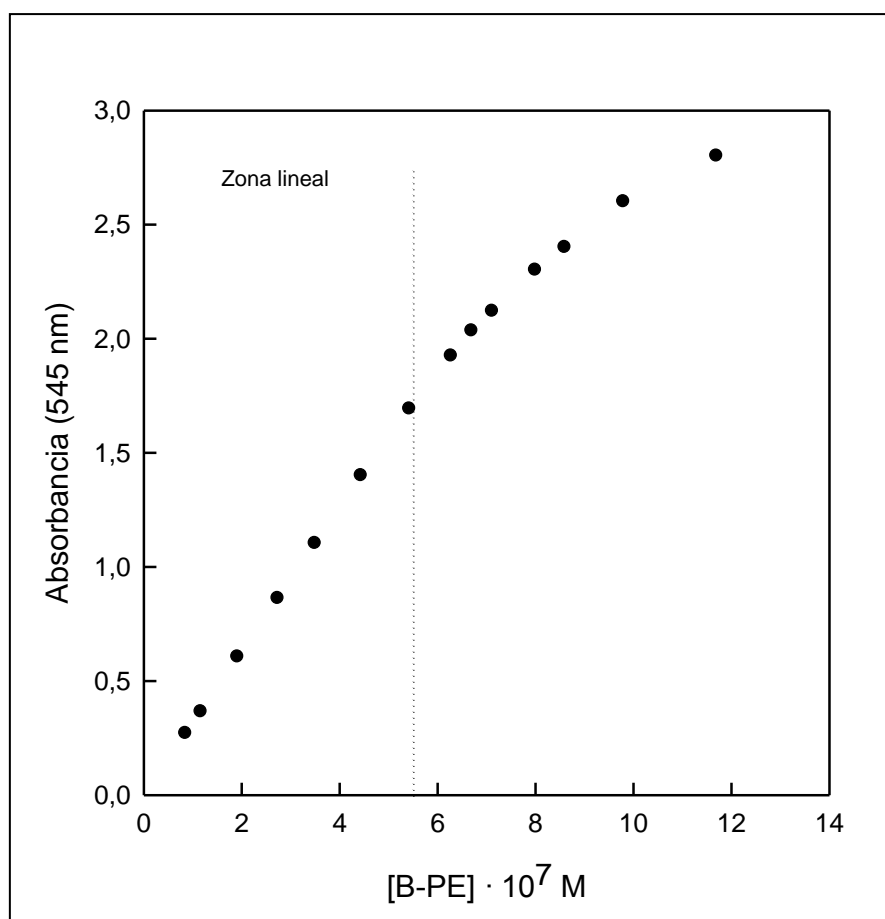


Figura 4.20.

Absorbancia de B-PE a 545 nm en función de la concentración.

Estos resultados están en buen acuerdo con los obtenidos por Bennet y Bogorad (1973) y Bryant y col. (1979) que dan un valor de $\varepsilon_{545}=12'7 (\text{mg/ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y con el reportado por Glazer (1999) que muestra un valor de $\varepsilon_{545}=2'41 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

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 ficoeritrina, 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 4.30. muestra los valores de intensidad de fluorescencia encontrados en el máximo de emisión (576 nm) en las condiciones indicadas a distintas concentraciones de B-PE.

Tabla 4.30.

Valores de intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión ($\lambda=576$ nm) para distintas concentraciones de B-PE en tampón fosfato 20 mM, pH=7.0. $\lambda_{ex}=540$ nm, $\Delta\lambda_{ex}=2.5$ nm, $\Delta\lambda_{em}=5$ nm.

Nº Disolución	[B-PE] mg/ml	[B-PE] · 10 ⁸ M	IF (576nm)
1	0'0005	0'214	10
2	0'001	0'427	25
3	0'005	2'136	131
4	0'008	3'42	199
5	0'01	4'27	238
6	0'015	6'41	350
7	0'02	8'55	450
8	0'03	12'82	580
9	0'04	17'6	660
10	0'05	21'4	725

En la Figura 4.21. se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia de B-PE en función de la concentración. En las condiciones experimentales empleadas la concentración máxima de B-PE que puede usarse es $29'5 \cdot 10^{-8}$, pues por encima de ella el detector se satura. De otra parte, existe una buena linealidad hasta una concentración aproximada de $8'55 \cdot 10^{-8}$ M, como refleja el ajuste de los datos de la Tabla 4.30. hasta dicha concentración: ordenada en el origen = 8'74, pendiente = $527'7 \cdot 10^7$ y $r^2 = 0'99878$. Por tanto la constante de



Kavanagh que deriva de la pendiente de esta zona de respuesta lineal resulta ser $527\cdot7\cdot10^7 \text{ M}^{-1}$. Este valor de constante de Kavanagh resulta ser del mismo orden a los encontrados para C-PC, APC y R-PC procedentes de diferentes cianobacterias (Ramos y col., 2011)

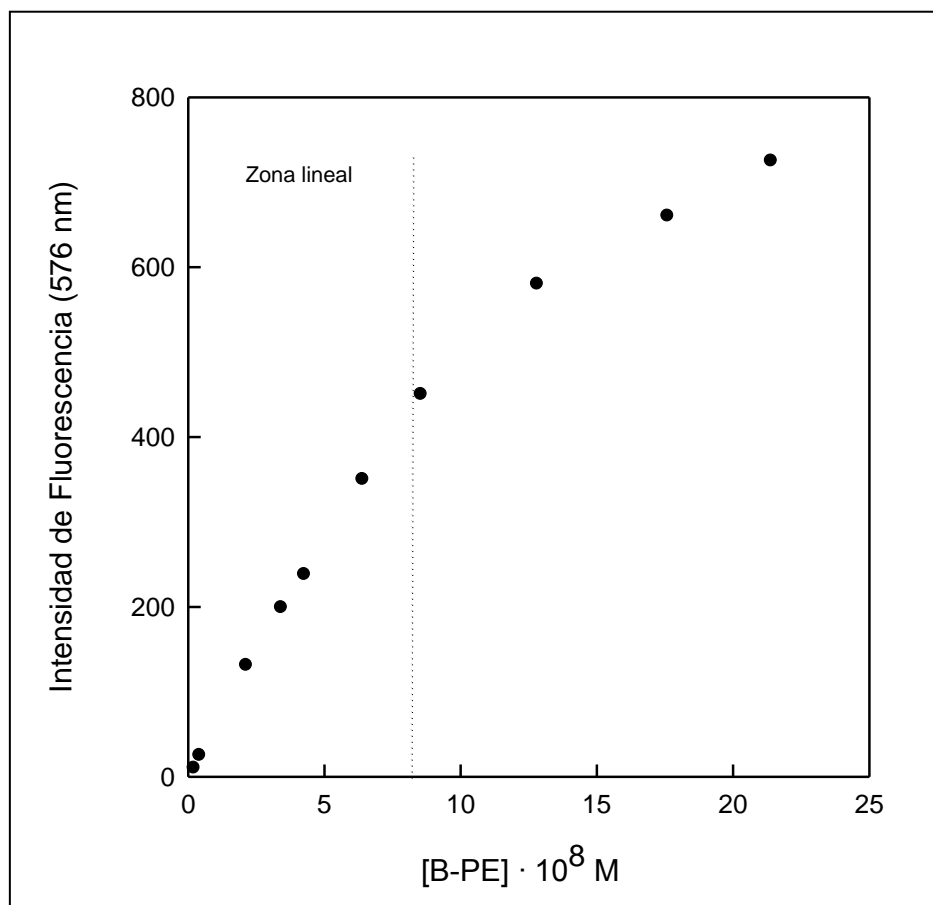


Figura 4.21.

Intensidad relativa de fluorescencia a 576 nm en función de la concentración de B-PE.

($\lambda_{\text{exc}} = 540 \text{ nm}$; $\Delta\lambda_{\text{exc}} = 2\cdot5 \text{ nm}$, $\Delta\lambda_{\text{em}} = 5 \text{ nm}$).

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 la ficoeritrina purificada en función del pH y la temperatura, así como a lo largo del tiempo.

4.3.1.3.1.-Estabilidad frente al pH

La estabilidad de las disoluciones de ficoeritrina en función del pH, se ha estudiado a través de medidas de absorbancia y de emisión de fluorescencia en un rango de pH de 1 a 12. Los distintos valores de pH en las disoluciones utilizadas, se han alcanzado según la metodología descrita en el apartado 3.2.1.

Se han preparado disoluciones de B-PE de concentración $2'56 \cdot 10^{-7}$ M (0'06 mg/ml), en tampón fosfato 20 mM de cada uno de los pH a ensayar.

En todos los casos, se han efectuado dos medidas de pH para cada disolución. Una inicial tomada inmediatamente después de la disolución de la proteína en el tampón y otra una vez transcurridos siete días en oscuridad a 4°C. La Figura 4.22. muestra los espectros de absorción uv-visible de B-PE a diferentes valores de pH. En el intervalo 4-10 el espectro de absorción de B-PE permanece inalterado y corresponde al de la proteína en un medio favorable, mientras que para $4 > \text{pH} > 10$ aparecen modificaciones espectrales, la relación entre los máximos característicos de B-PE (565, 545, 375, 310 y 280 nm) deja de ser la usual que presenta la proteína cuando se encuentra en medios favorables e incluso, como ocurre a pH 2 y 11, el espectro aparece totalmente distorsionado y muestra nuevos máximos y hombros que son producto de la desnaturalización proteica.



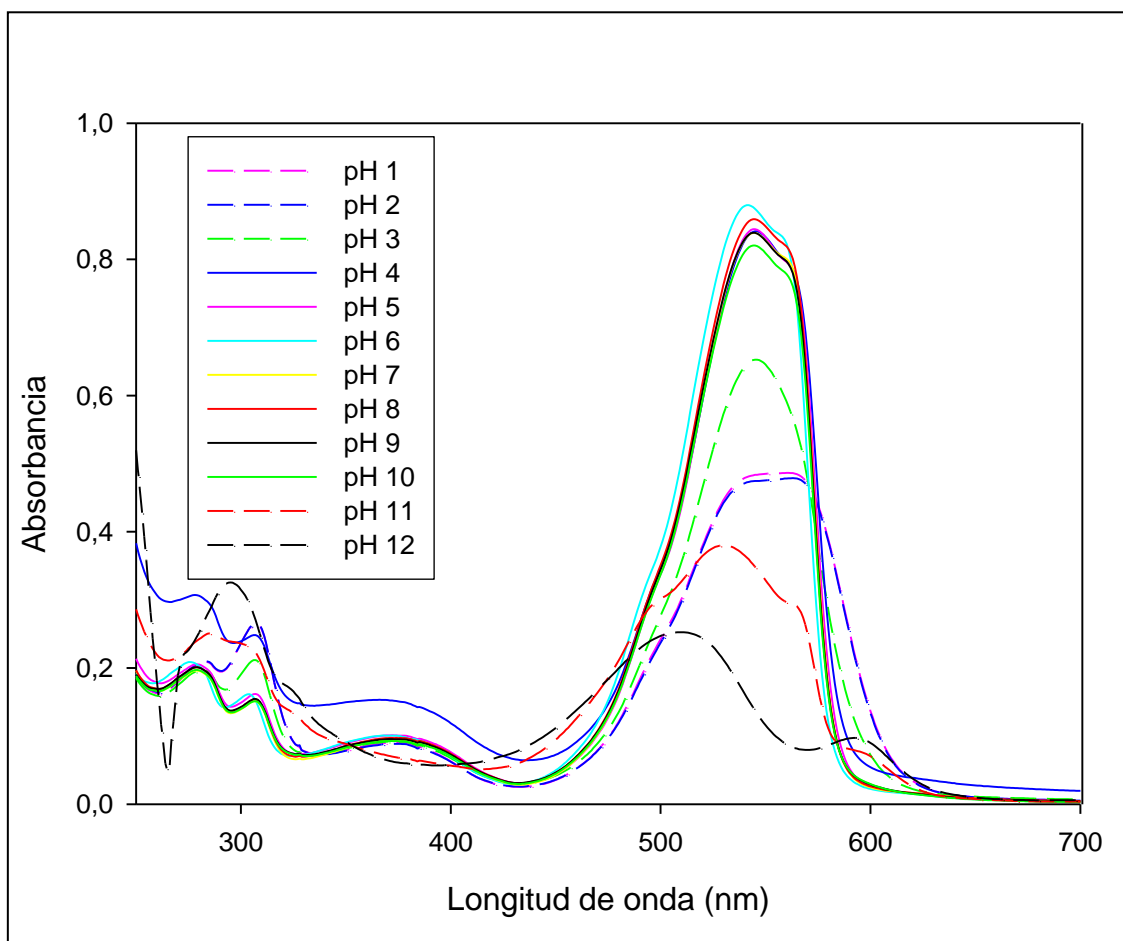


Figura 4.22.

Espectros de absorbancia uv-visible de B-PE en tampón fosfato 20mM a diferentes valores de pH del medio. $[B-PE]= 2'56 \cdot 10^{-7}$ M.

En la Figura 4.23. se representan tanto los valores de la absorbancia en el máximo (545 nm) y la intensidad de fluorescencia también en el máximo (576 nm), descritos para esta macromolécula como representativos para valores de pH cercanos a la neutralidad (Koller y Wehrmeyer, 1975; Glazer y Hixson, 1977; Ficner y col., 1992; Ficner y Huber, 1993; Kirk y col., 1993; Bermejo y col., 2001). Se puede observar que la sensibilidad espectral es máxima entre pH 4 y 10, mientras que fuera de este margen se desprende que los cambios espectrales en las zonas alcalina y ácida son irreversibles, ya que, después de transcurridos 7 días, los parámetros espectroscópicos medidos al correspondiente pH han

resultado incluso inferiores a los obtenidos tras inmediata disolución.

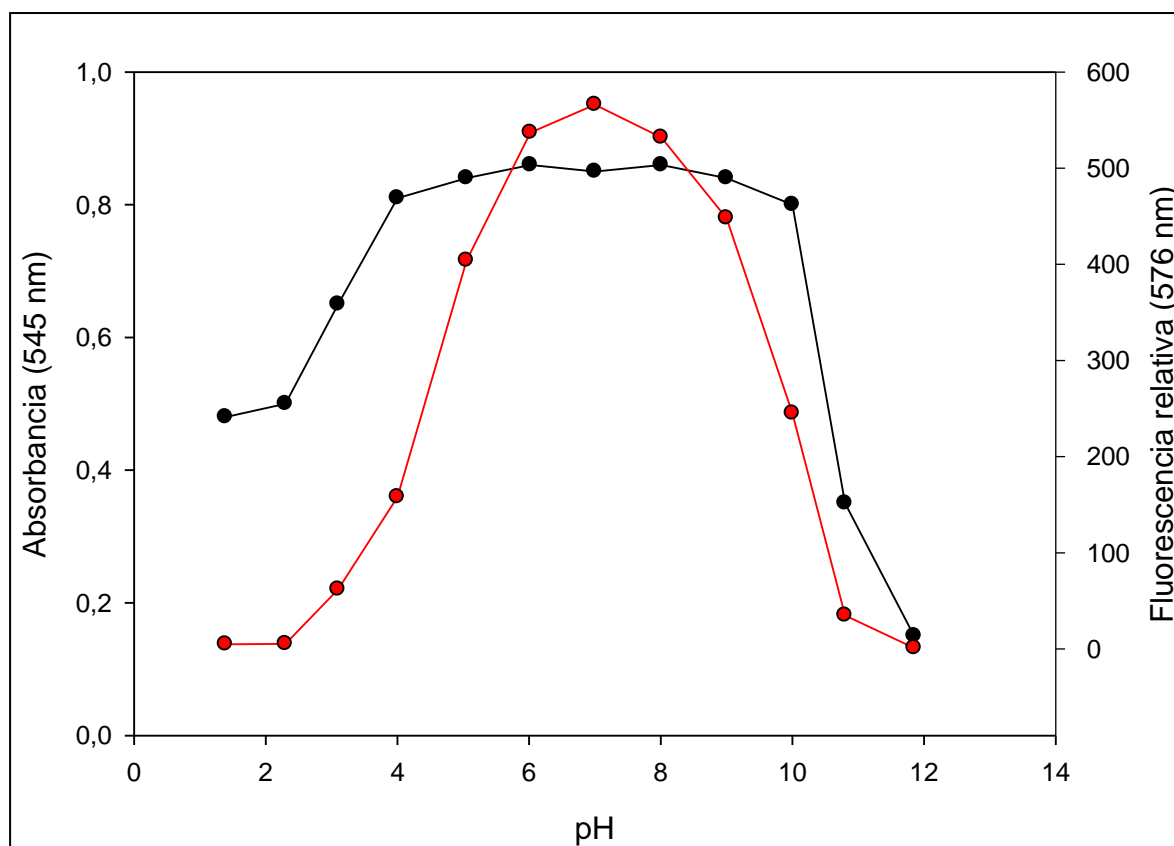


Figura 4.23.

Valores de absorbancia (—) e intensidad de fluorescencia (—) de disoluciones de B-PE en función del pH del medio. $[B-PE] = 2,56 \cdot 10^{-7} M$.

Debido a la mayor sensibilidad de la espectrofluorimetría, también se ha estudiado la influencia del pH mediante el seguimiento de las propiedades fluorescentes de B-PE. Los espectros de fluorescencia permanecen inalterados respecto a la posición de su máximo en el intervalo de pH 4-10, permaneciendo invariable en 576 nm y fuera de este intervalo, los valores de intensidad de fluorescencia disminuyen bruscamente modificándose también la posición del máximo. En la Figura 4.23. puede apreciarse que la intensidad de fluorescencia alcanza un valor máximo a $pH=7,0$, mientras que a valores cercanos a éste la intensidad de fluorescencia es sensiblemente inferior (Tabla 4.31.). Este efecto se puede explicar teniendo en cuenta el “quenching” de fluorescencia que provocan las sales del tampón. Efectivamente, la desactivación molecular provocada por los

aniones fosfato debe de aumentar en magnitud con la disminución del pH, ya que, a causa del valor del pK_a del equilibrio monoanión \leftrightarrow dianión, el fosfato se transforma preferencialmente en monoanión cuando disminuye el pH. Por otra parte, esta disminución del pH también provoca en la proteína una disminución en su densidad de carga, junto al correspondiente aumento del número de cargas positivas. Este efecto es más acusado en las cercanías del punto isoeléctrico de la proteína que tiene un valor de 4.7 en el caso de B-PE (Glazer y Hixson, 1977; Glazer, 1999). Rebasado éste, la atracción electrostática entre la proteína y el anión fosfato aumenta considerablemente y permite justificar, aunque de forma cualitativa, la disminución de la señal fluorescente. Transcurridos 7 días, los valores obtenidos son en general ligeramente inferiores a los medidos tras la inmediata disolución de la proteína.

Estos resultados indican que las disoluciones de B-PE preparadas en el intervalo de pH comprendido entre 4 y 10 poseen propiedades espectroscópicas de absorción y emisión de fluorescencia, que no se alteran apreciablemente, aunque el valor de pH óptimo, por ser al que B-PE presenta sus mejores cualidades espectrales, es el de pH=7.0.



Tabla 4.31.

Dependencia con el pH de los parámetros espectroscópicos uv-visible y de fluorescencia de estado estacionario de disoluciones de B-PE en tampón fosfato 20 mM.

$$[\text{B-PE} = 2'56 \cdot 10^{-7} \text{ M}]$$

pH	IF (576 nm)	Absorbancia (545 nm)	$\lambda_{\text{max}} \text{ emisión}$	A_{545}/A_{280}
1'39	5	0'48	592	2'36
2'30	5'31	0'50	590	2'30
3'10	62	0'65	582	3'33
4'00	158	0'81	575	2'74
5'05	404	0'84	575	4'13
6'02	537	0'86	575	4'25
7'00	566	0'85	575	4'31
8'01	532	0'86	575	4'34
9'00	448	0'84	575	4'19
10'0	245	0'80	582	4'16
10'8	35	0'35	602	1'42
11'90	1	0'15	604	0'60

4.3.1.3.2.-Estabilidad frente a la temperatura

Análogamente se han preparado disoluciones de B-PE en tampón fosfato 20 mM y pH 7'0 y se ha medido la absorbancia de las mismas en el máximo característico de la biliproteína, 545 nm, después de someterlas a una temperatura fija en función del tiempo. Para ello se ha usado un espectrofotómetro con el correspondiente equipo de termostatación externa del compartimento de muestra. La dependencia con la temperatura y tiempo se ha medido en el rango de 30-80°C durante un periodo de 1 hora a intervalos de 5 minutos. La concentración de proteína utilizada fue de 0'044 mg/ml, es decir $1'88 \cdot 10^{-7}$ M.



Se ha utilizado los valores encontrados en los máximos de absorción y emisión de fluorescencia para determinar la dependencia de la estabilidad de los parámetros espectroscópicos con la temperatura. Inicialmente, de la observación de la Figura 4.24. podemos deducir que a 30, 40 y 50 °C, los espectros permanecen prácticamente inalterados y apenas sufren cambios reseñables en el periodo de tiempo mencionado. Así, a estas temperaturas los valores de absorbancia e intensidad de fluorescencia muestran únicamente ligeras variaciones con el tiempo de calentamiento. A 60 °C tanto la absorbancia como la intensidad de fluorescencia de B-PE disminuyen alrededor de un 42% respecto de los valores iniciales en un corto periodo de tiempo (alrededor de unos 20 min). Los valores medios de estabilidad espectroscópica obtenidos para B-PE están en buen acuerdo con los obtenidos para ficoeritrinas procedentes de otras microalgas como *Gracilaria longa* y *Palmaria palmata* (D'Agnolo y col., 1994; Galland-Irmouli y col., 2000).

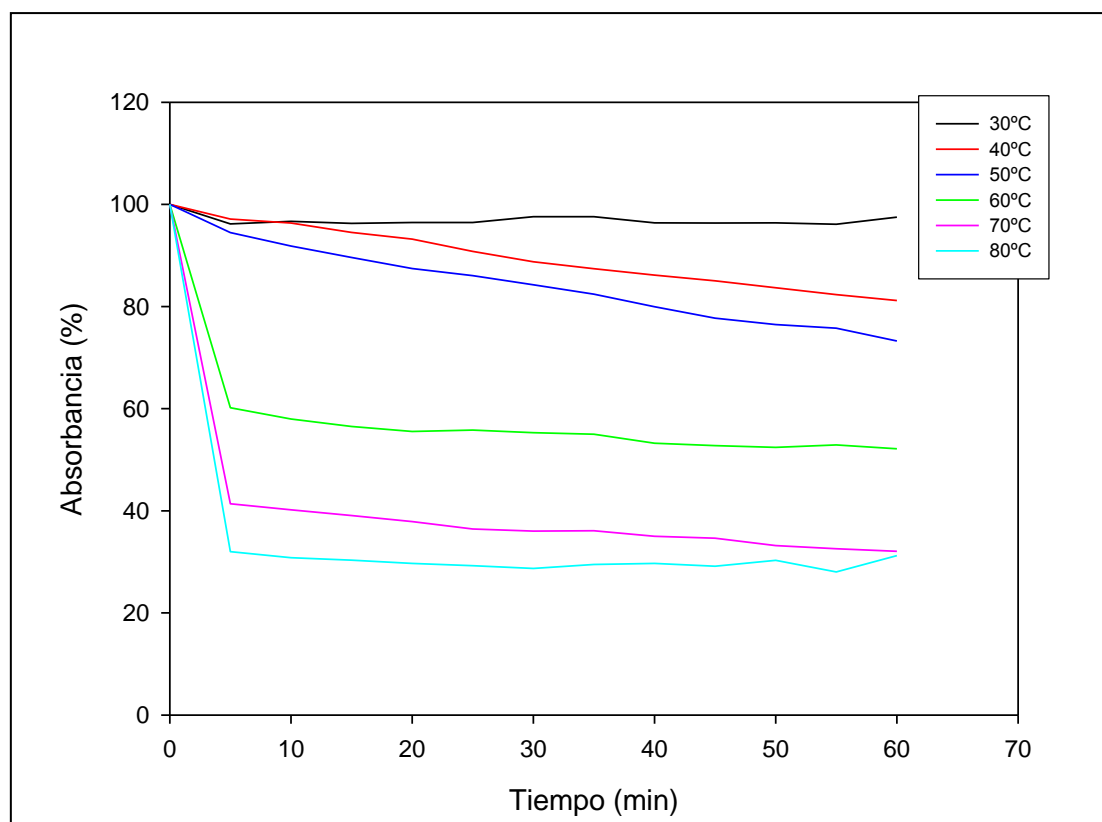


Figura 4.24.

Estabilidad térmica de B-PE en tampón fosfato pH 7'0 (20 mM).

La absorbancia se representa como un porcentaje de la absorbancia inicial a 545 nm.



4.3.1.3.3.-Estabilidad frente al tiempo

Otra variable importante a tener en cuenta es el tiempo. Se han preparado disoluciones de B-PE $1'35 \cdot 10^{-7}$ M ($0'031$ mg/ml) en tampón fosfato 20 mM pH 7'0. A estas disoluciones se le han realizado espectros de absorción uv-visible entre 250 y 700 nm cada 24 horas, así como los correspondientes espectros de fluorescencia, volviendo tras su medida a guardarlas a 4°C y en oscuridad, hasta completar un periodo de tiempo total de 40 días.

La estabilidad se ha determinado monitorizando los valores de la absorbancia e intensidad de fluorescencia en los respectivos máximos de los espectros de absorción y emisión. La Figura 4.25. muestra, a título de ejemplo, el seguimiento de la estabilidad a través de la medida de intensidad de fluorescencia.

Después de transcurridas cinco semanas el porcentaje de absorbancia e intensidad de fluorescencia perdida con respecto a los valores iniciales es de un 38% aproximadamente.

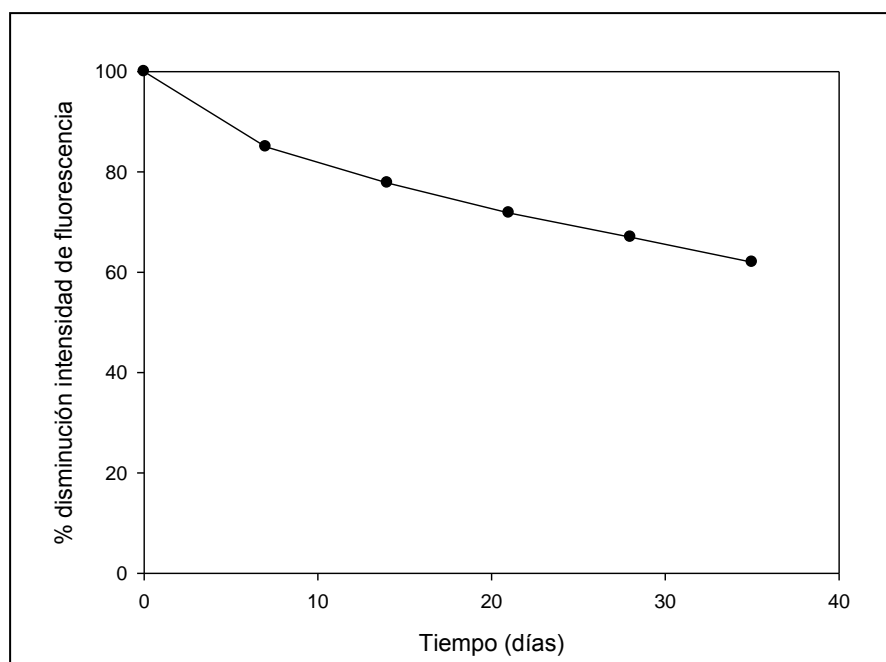


Figura 4.25.

Medida de la estabilidad de B-PE en tampón fosfato pH 7, 20 mM a través de fluorescencia. $[\text{B-PE}] = 1'35 \cdot 10^{-7}$ M.



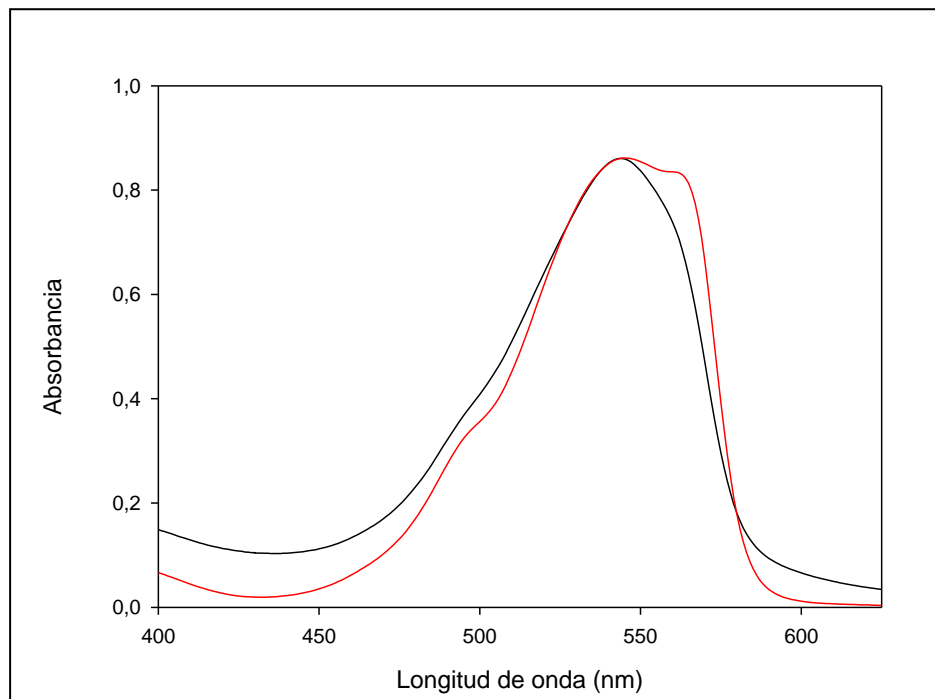
4.3.1.4.-Caracterización estructural mediante espectroscopía

Es bien conocido que en el intervalo de pH 5-8 y a bajos valores de fuerza iónica, las ficoeritrinas muestran un estado de agregación hexamérico del tipo $(\alpha\beta)_6\gamma$ (Glazer, 1999). También se conoce que la acción de sales caotrópicas tales como el perclorato o tiocianato sódico a altas concentraciones (cercanas a 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).

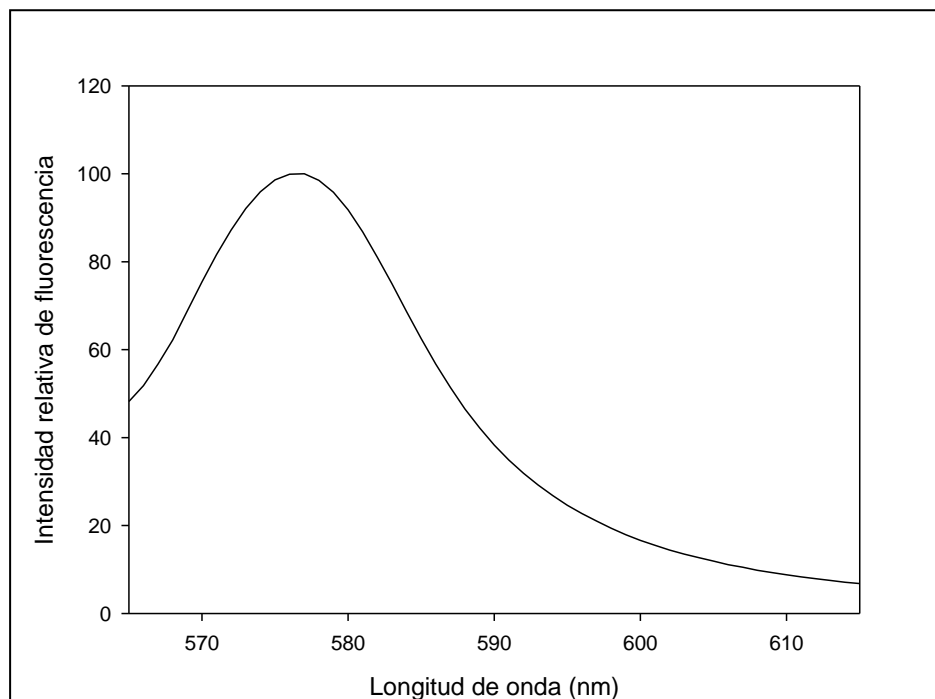
Con objeto de conocer los cambios en las propiedades espectroscópicas provocados por los diferentes estados de agregación, se ha estudiado el comportamiento de la biliproteína disuelta en presencia de agentes desagregantes como los anteriormente comentados. Así B-PE, se ha caracterizado mediante absorbancia y fluorescencia (estado estacionario y polarización de fluorescencia) tanto en su estado nativo hexamérico, como en el estado monomérico provocado por la adición de perclorato sódico (1M).

La Figuras 4.26. y 4.27. muestran respectivamente los espectros de absorbancia y de fluorescencia en estado estacionario, para una muestra de B-PE purificada (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 ligeramente al pasar la proteína de forma hexamérica a monomérica, desapareciendo el máximo de absorción de 565 nm. Los espectros de emisión de fluorescencia son iguales tanto para la forma hexamérica como para la disociada de B-PE, presentando el mismo máximo de emisión de fluorescencia a 576 nm y la misma anchura media a mitad de banda (27 nm).



**Figura 4.26.**

Espectros de absorción de B-PE purificada en estado hexamérico (—) y monomérico (—).

**Figura 4.27.**

Espectros de emisión de fluorescencia de B-PE purificada en estado hexamérico (—) y monomérico (—). ($\lambda_{exc} = 545 \text{ nm}$; $\Delta\lambda_{exc} = \Delta\lambda_{em} = 3 \text{ nm}$).

La Imagen 4.19. muestra la estructura tridimensional de B-PE en estado de agregación hexamérico y la correspondiente a sus subunidades α y β , donde además puede apreciarse la disposición espacial de los cromóforos ficoeritrobilinas (PEB) que ambas subunidades poseen.

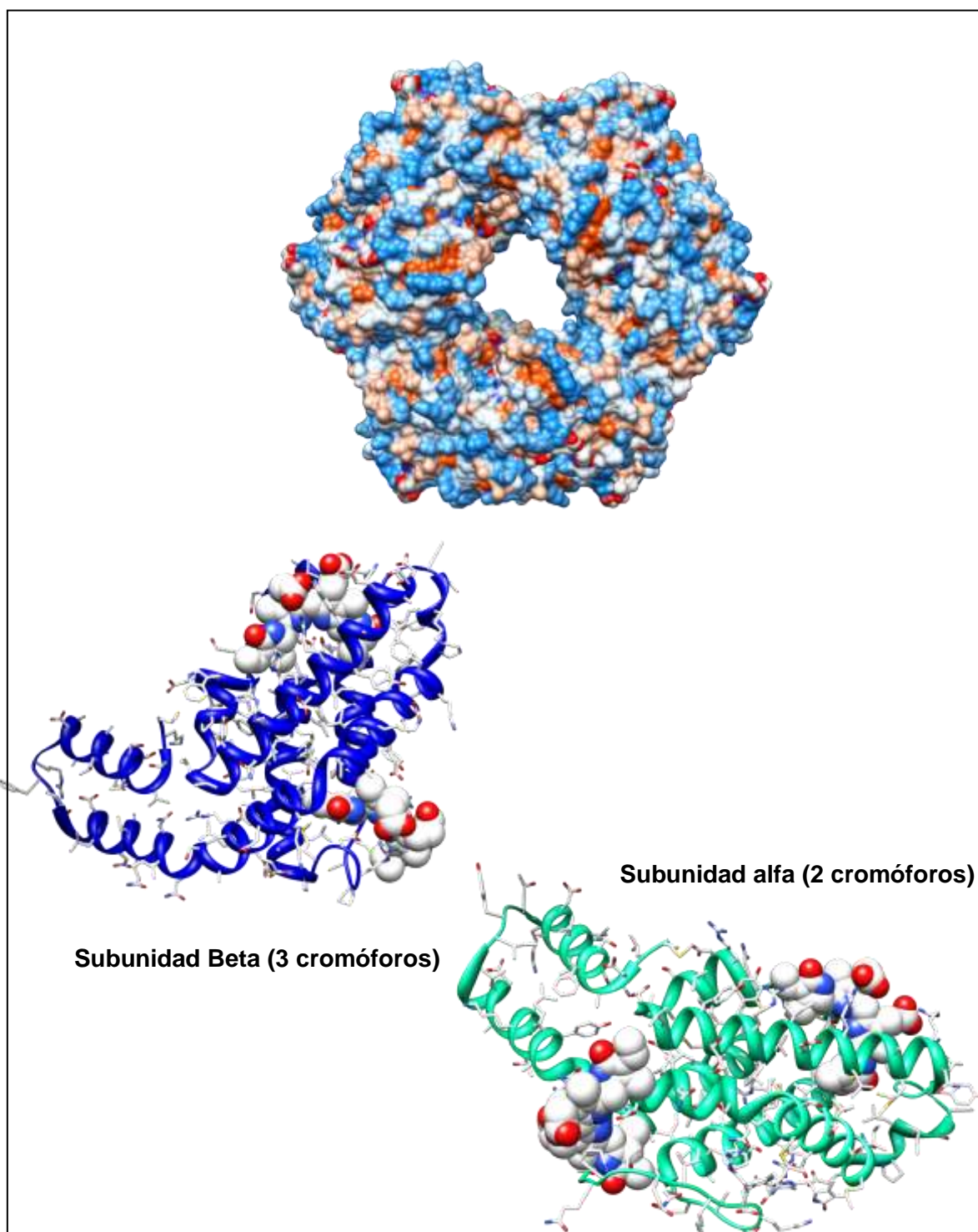


Imagen 4.19.

Estructura tridimensional de B-PE en estado de agregación hexamérico y estructura de las subunidades (Protein Data Bank (PDB) web page).

La Figura 4.28. muestra los valores de anisotropía de fluorescencia para una muestra de B-PE purificada 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 hexamérica 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 *Mastidoglastus laminosus* (Mimuro y col., 1986; Yeh y col., 1986) y C-PC procedente de *Spirulina platensis* (Bermejo y col., 1997). El espectro de anisotropía de B-PE en tampón fosfato 20 mM pH 7.0 es similar a aquellos publicados anteriormente para ficoeritrinas en estado hexamérico procedentes de otras algas rojas diferentes (Grabowski y Gantt, 1978; Guard-Friar y col., 1989). Los resultados obtenidos en disolución en presencia de perclorato sódico, muestran mayores valores de anisotropía que los correspondientes a la forma hexamérica, tal como sucede para otras biliproteínas procedentes de diferentes especies de microalgas y en consonancia con el razonamiento expuesto anteriormente, esto confirma la desagregación que se produce en B-PE pasándose de hexámeros a monómeros.



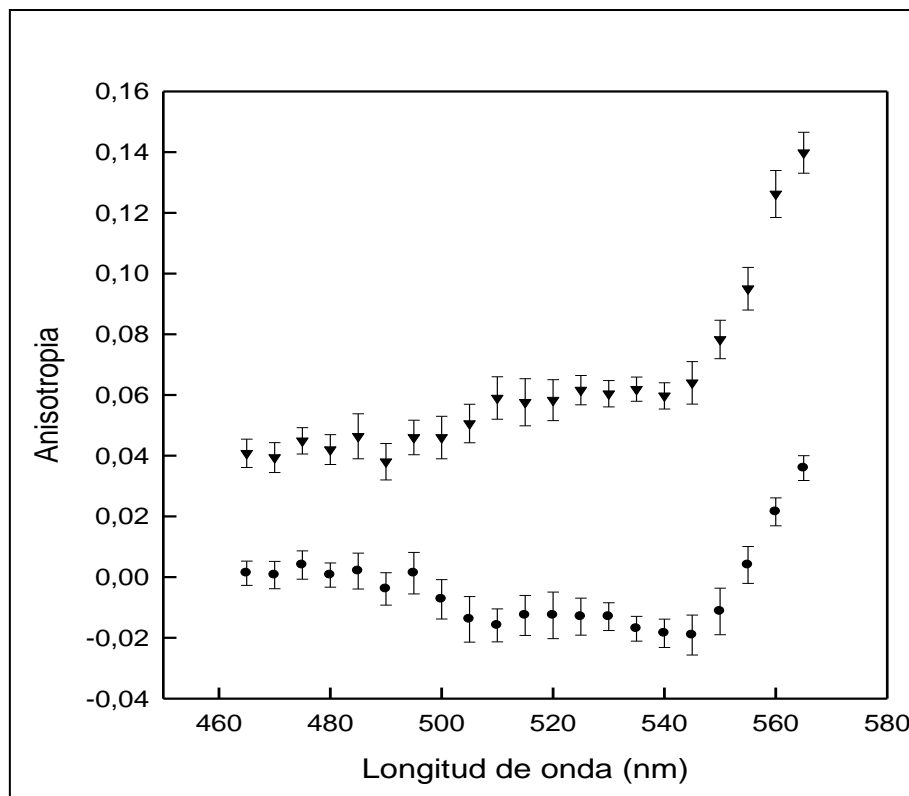


Figura 4.28.

Anisotropía de fluorescencia de B-PE en sus estados hexamérico ((●), $\lambda_{em}=576$ nm) y monomérico ((▼), $\lambda_{em}=576$ nm).

Los valores de anisotropía de fluorescencia son la media de cinco determinaciones y las barras de error reflejadas corresponden a la desviación estándar de las mismas.

4.3.2.-CARACTERIZACIÓN DE LAS SUBUNIDADES

4.3.2.1.-Obtención de subunidades mediante HPLC

Se ha utilizado cromatografía RP-HPLC para la separación de las subunidades constituyentes de B-PE 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 3.2.5. 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 en columna pequeña, se ha desarrollado una metodología similar en columna semipreparativa (250 · 10 mm), con el objetivo de obtener semipreparativamente las subunidades correspondientes para su posterior estudio espectroscópico. Los picos correspondientes a las subunidades γ , α y β aparecen a 10'8, 15'7 y 22 minutos respectivamente (Figura 4.29.).

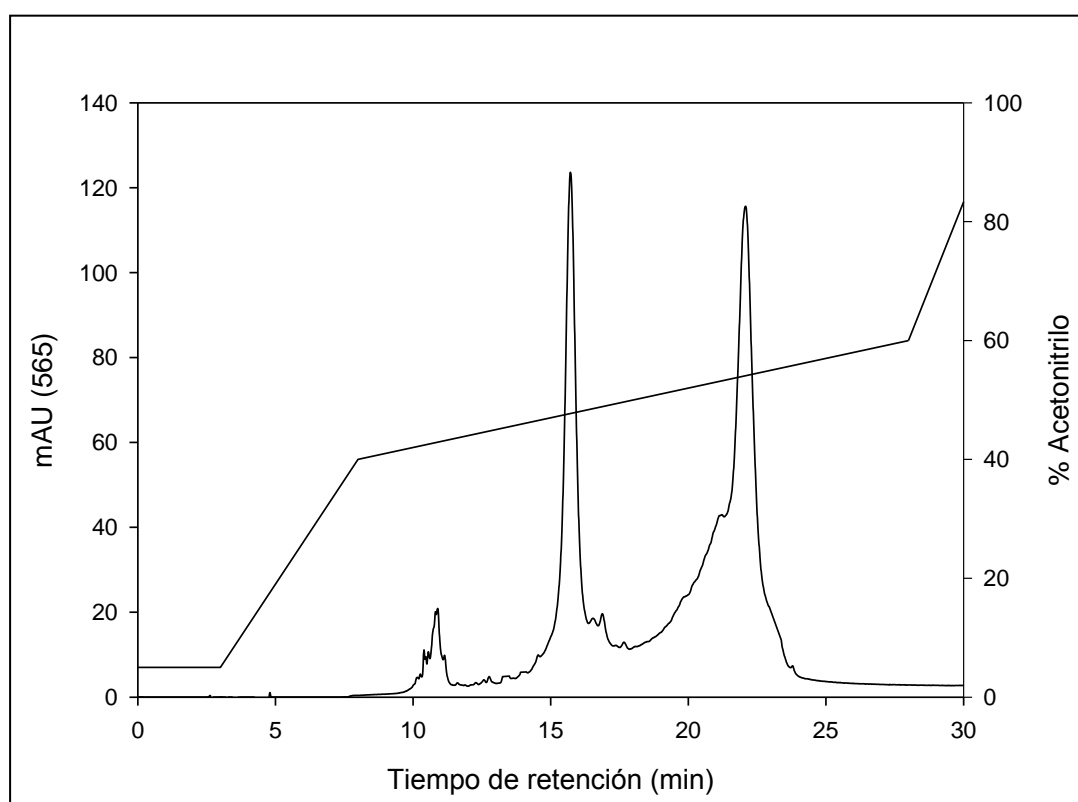


Figura 4.29.

Separación semipreparativa de subunidades de B-PE purificada mediante HPLC utilizando una columna de fase reversa C4 (250 · 10 mm).

La Imagen 4.20. muestra el detalle de los viales conteniendo las subunidades γ , α y β de B-PE obtenidas mediante HPLC semipreparativa y tras el correspondiente proceso de liofilización para eliminación del disolvente.



Imagen 4.20.

Subunidades γ , α y β de B-PE obtenidas mediante RP-HPLC semipreparativa y tras proceso de liofilización para eliminación de disolvente.

4.3.2.2.-Caracterización de subunidades

Una vez obtenidas las subunidades γ , α y β de B-PE, se han caracterizado tanto en el medio de separación (mezcla de acetonitrilo y agua), como solubilizadas en medio acuoso (tampón fosfato pH7, 50mM) tras la correspondiente liofilización.

Caracterización en el medio de separación

Las siguientes Figuras (4.30. y 4.31.) muestran los espectros de absorción y fluorescencia de las subunidades γ , α y β de B-PE 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 γ , α y β es prácticamente el mismo, mostrando máximos de absorción a 280, 310, 370 y 553 nm para α y β y a 310, 370 y 544 para γ , perdiéndose el máximo a 565 nm. Respecto a la fluorescencia, la subunidad α y β presentan el máximo característico de la proteína en estado agregado que

aparecía a 571 nm, mientras que el máximo del espectro de fluorescencia de la subunidad γ se encuentra en 555 nm.

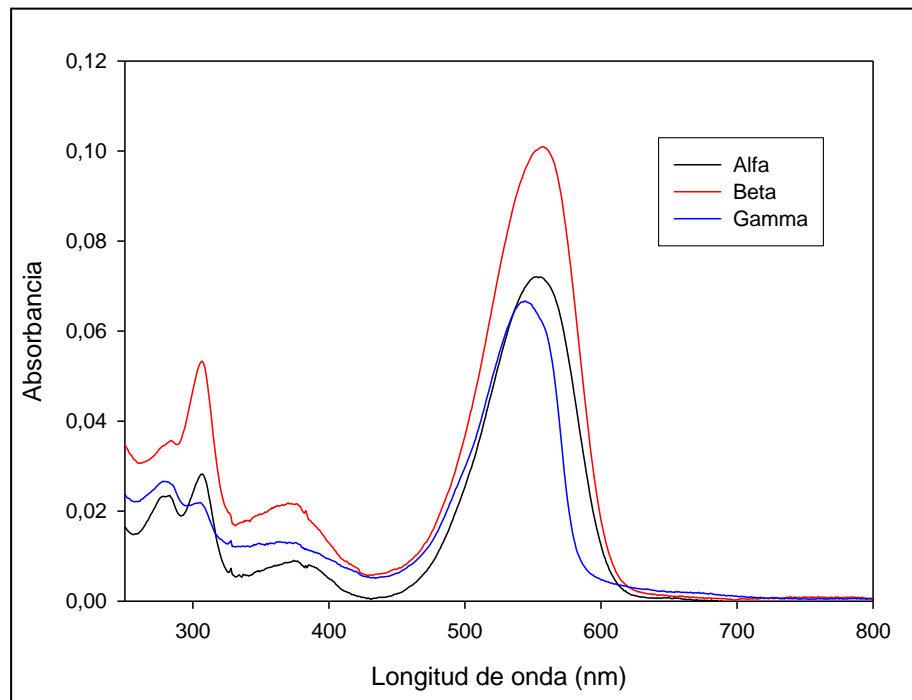


Figura 4.30.

Espectro de absorción uv-visible de las subunidades de B-PE en medio acetonitrilo-agua.

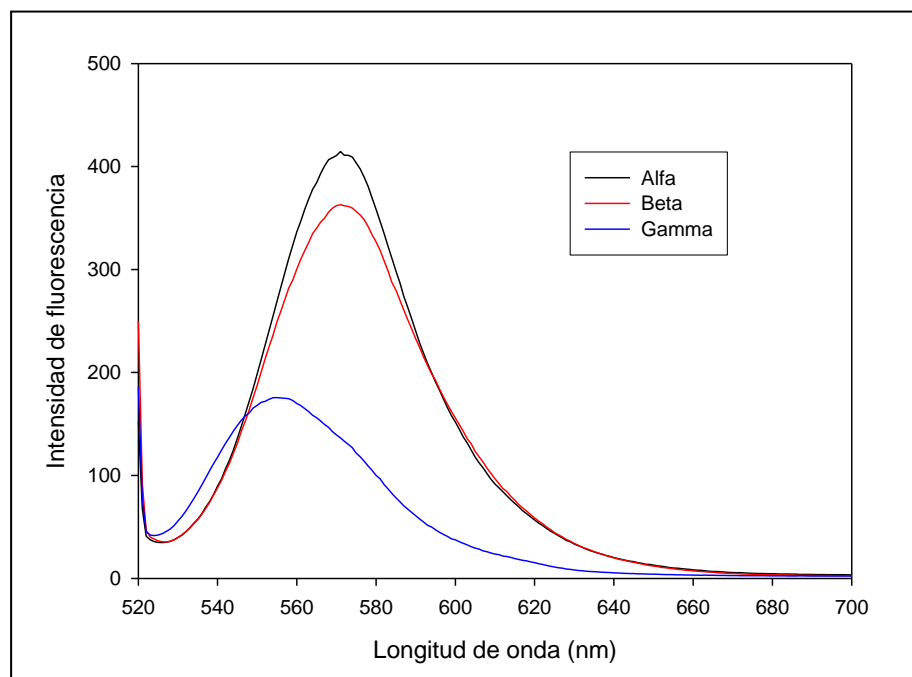


Figura 4.31.

Espectro de emisión de fluorescencia en estado estacionario de las subunidades de B-PE en medio acetonitrilo:agua. ($\lambda_{exc}=510$; $\Delta\lambda_{exc}=5$; $\Delta\lambda_{em}=10$).



Caracterización en medio acuoso

Las Figuras 4.32. y 4.33. muestran los espectros de absorbancia y de fluorescencia de las subunidades γ , α y β de B-PE purificadas mediante RP-HPLC, liofilizadas y redisueltas en tampón fosfato pH7, 20mM. En el caso de la fluorescencia en medio acuoso, los máximos de los espectros de cada subunidad se encuentran en 567 nm para la subunidad α y en 571 nm para la subunidad β y γ .

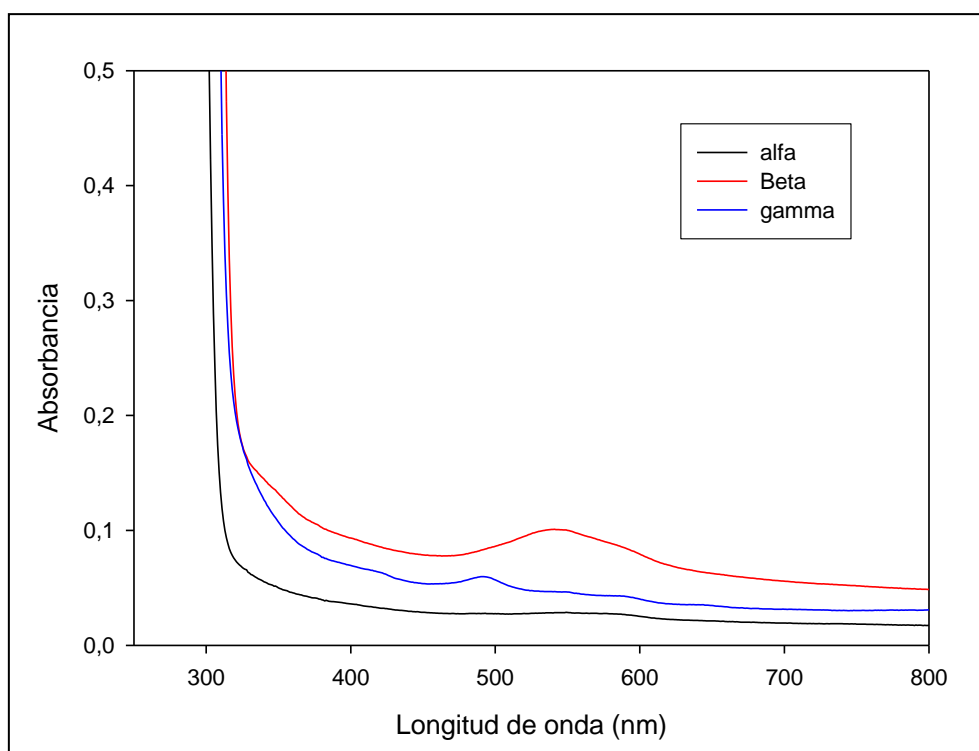


Figura 4.32.

Espectro de absorción uv-visible de las subunidades de B-PE en medio tampón fosfato pH 7, 20mM.

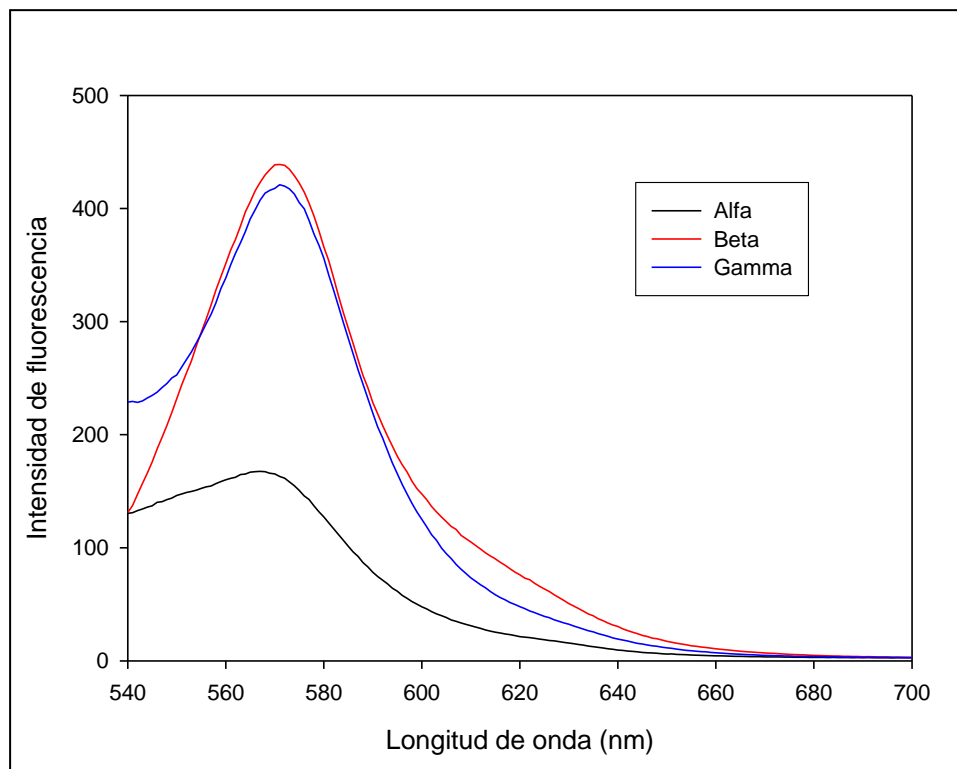


Figura 4.33.

Espectro de emisión de fluorescencia en estado estacionario de las subunidades α y de B-PE en tampón fosfato pH 7, 20mM. ($\lambda_{exc}= 520$; $\Delta\lambda_{exc}=5$; $\Delta\lambda_{em}=10$).

4.4.- APLICACION DE FICOERITRINA COMO COLORANTE NATURAL

Una vez realizada una caracterización fisicoquímica completa de B-PE, se ha estudiado la incorporación directa de disoluciones de esta macromolécula en muestras reales de alimentos y bebidas. Así, utilizando el extracto rico en ficoeritrina obtenido previamente por cromatografía de lecho expandido, se han realizado ensayos de coloración de diferentes matrices reales, para determinar las propiedades colorantes de dicho extracto. Además, se ha estudiado la estabilidad de las matrices adicionadas con los extractos 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 $L^*a^*b^*$. El extracto enriquecido en ficoeritrina obtenido a partir de la microalga utilizada (*Porphyridium cruentum*), muestra un color rosa fuerte transparente (Imagen 4.21.) y las coordenadas de color determinadas para el extracto, se muestran en la Tabla 4.32.



Imagen 4.21.

Extracto enriquecido en B-PE procedente de CALE, listo para ser adicionado a distintas matrices de alimentos y bebidas, en los ensayos de coloración.

Tabla 4.32.

Coordenadas cromáticas del extracto de ficoeritrina utilizado.

Microalga origen	L*	a*	b*
<i>Porphyridium Cruentum</i>	37'42	72'57	-8'25

4.4.1.-ENSAYOS DE COLORACIÓN

Los ensayos de coloración se han realizado añadiendo sobre cada matriz, cantidades diferentes del extracto enriquecido en ficoeritrina procedente de CALE, determinándose de esta forma la curva de saturación de color del 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 que es necesario añadir para alcanzar o aproximarse lo máximo posible a dicho color. Las matrices ensayadas han sido: batidos, yogures, yogures líquidos, helados, bebidas gaseosas, mostos, bebidas isotónicas y licores sin alcohol (ver Tabla 3.2. de Métodos). Estas matrices se han elegido debido a que en el mercado existen variedades de las mismas, que poseen tonalidades rosadas y por tanto susceptibles de ser reproducidas por adición del extracto rico en B-PE a las matrices correspondientes.

4.4.1.1. Aplicación a matrices lácteas

4.4.1.1.1.-Batidos

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para batidos, utilizando el extracto de ficoeritrina adicionado sobre una matriz blanco constituida por leche semidesnatada Pascual, para tratar de reproducir los batidos de fresa de las marcas Pascual, Puleva y Covap que se venden en el mercado (Tablas 4.33. a 4.35.).



Tabla 4.33.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de leche adicionadas con el extracto enriquecido en B-PE de *Porphyridium cruentum*, para intentar reproducir el batido de fresa Pascual. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0'227 \text{ mg B-PE/ml extracto}$.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*_{ab}
ESTANDAR	Pascual		7'46	28'67	12'33	31'22	23'27				
1	leche Pascual semi+0	0	23'23	5'15	34'93	35'30	81'60	15'77	-23'52	22'59	36'23
2	leche Pascual +25	0'025	20'41	14'88	30'97	34'36	64'33	12'95	-13'79	18'64	26'56
3	leche Pascual + 50	0'050	18'68	20'05	28'49	34'84	54'87	11'22	-8'62	16'17	21'49
4	leche pascual + 75	0'075	17'57	23'15	27'08	35'62	49'47	10'12	-5'52	14'75	18'72
5	leche pascual + 100	0'1	16'77	25'16	25'99	36'17	45'93	9'31	-3'51	13'66	16'90
6	leche pascual + 125	0'125	16'08	26'46	25'01	36'41	43'38	8'62	-2'20	12'69	15'50
7	leche pascual + 150	0'150	15'58	27'35	24'29	36'58	41'61	8'12	-1'32	11'96	14'52
8	leche pascual + 175	0'175	15'17	28'02	23'75	36'73	40'28	7'71	-0'65	11'42	13'80
9	leche pascual + 200	0'2	14'77	28'43	23'26	36'73	39'29	7'31	-0'24	10'93	13'16
10	leche pascual + 250	0'25	14'11	28'99	22'36	36'61	37'64	6'65	0'32	10'03	12'04
11	leche pascual + 300	0'3	13'53	29'29	21'50	36'33	36'29	6'08	0'62	9'17	11'03
12	leche pascual + 350	0'35	12'97	29'51	20'72	36'06	35'07	5'51	0'84	8'39	10'08
13	leche pascual + 400	0'4	12'54	29'61	20'12	35'80	34'19	5'08	0'94	7'80	9'36
14	leche pascual + 450	0'45	12'06	29'64	19'41	35'43	33'22	4'60	0'97	7'08	8'50
15	leche pascual + 500	0'5	11'70	29'62	18'83	35'09	32'45	4'24	0'95	6'50	7'82



Tabla 4.33.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de leche adicionadas con el extracto enriquecido en B-PE de *Porphyridium cruentum*, para intentar reproducir el batido de fresa Pascual. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0'227 \text{ mg B-PE/ml extracto}$.

(Continuación Tabla 4.33.)

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*ab
16	leche pascual + 550	0'55	11'31	29'61	18'29	34'80	31'70	3'85	0'94	5'96	7'16
17	leche pascual + 600	0'6	10'99	29'56	17'77	34'49	31'01	3'53	0'89	5'44	6'55
18	leche pascual + 700	0'7	10'38	29'45	16'89	33'94	29'83	2'92	0'77	4'56	5'47
19	leche pascual + 800	0'8	9'83	29'31	15'96	33'38	28'57	2'38	0'64	3'63	4'39
20	leche pascual + 900	0'9	9'28	29'07	15'14	32'78	27'52	1'82	0'40	2'82	3'38
21	leche pascual + 1000	1	8'82	28'84	14'39	32'23	26'52	1'37	0'17	2'06	2'48
22	leche pascual + 1100	1'1	8'38	28'64	13'74	31'77	25'63	0'93	-0'027	1'42	1'69
23	leche pascual + 1200	1'2	8'00	28'48	13'07	31'33	24'65	0'55	-0'19	0'74	0'94
24	leche pascual + 1300	1'3	7'64	28'22	12'65	30'92	24'15	0'18	-0'45	0'32	0'59
25	leche pascual + 1400	1'4	7'30	27'97	11'99	30'43	23'21	-0'15	-0'69	-0'33	0'79



Tabla 4.34.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de leche adicionadas con el extracto enriquecido en B-PE de *Porphyridium cruentum*, para intentar reproducir el batido de fresa Puleva. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0'227 \text{ mg B-PE/ml extracto}$.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*_{ab}
ESTANDAR	Puleva		2'49	14'3	4'14	14'89	16'13				
1	leche Pascual semi+0	0	23'23	5'15	34'93	35'30	81'60	20'74	-9'15	30'79	38'2347251
2	leche Pascual +25	0'025	20'41	14'88	30'97	34'36	64'33	17'92	0'58	26'83	20'7721183
3	leche Pascual + 50	0'050	18'68	20'05	28'49	34'84	54'87	14'19	5'75	24'35	15'3047509
4	leche pascual + 75	0'075	17'57	23'15	27'08	35'62	49'47	15'08	8'85	22'94	15'4597704
5	leche pascual + 100	0'1	16'77	25'16	25'99	36'17	45'93	14'28	10'86	21'85	14'4619017
6	leche pascual + 125	0'125	16'08	26'46	25'01	36'41	43'38	13'59	12'16	20'87	13'6871655
7	leche pascual + 150	0'150	15'58	27'35	24'29	36'58	41'61	13'09	13'05	20'15	13'1399619
8	leche pascual + 175	0'175	15'17	28'02	23'75	36'73	40'28	12'68	13'72	19'61	12'709166
9	leche pascual + 200	0'2	14'77	28'43	23'26	36'73	39'29	12'28	14'13	19'12	12'2966093
10	leche pascual + 250	0'25	14'11	28'99	22'36	36'61	37'64	11'62	14'69	18'22	11'6682475
11	leche pascual + 300	0'3	13'53	29'29	21'50	36'33	36'29	11'04	14'99	17'36	11'0775087
12	leche pascual + 350	0'35	12'97	29'51	20'72	36'06	35'07	10'48	15'21	16'58	10'5112892
13	leche pascual + 400	0'4	12'54	29'61	20'12	35'80	34'19	10'05	15'31	15'98	10'0683911
14	leche pascual + 450	0'45	12'06	29'64	19'41	35'43	33'22	9'57	15'34	15'27	9'59634826
15	leche pascual + 500	0'5	11'70	29'62	18'83	35'09	32'45	9'21	15'32	14'69	9'22826636



Tabla 4.34.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de leche adicionadas con el extracto enriquecido en B-PE de *Porphyridium cruentum*, para intentar reproducir el batido de fresa Puleva. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0'227 \text{ mg B-PE/ ml extracto}$.

(Continuación Tabla 4.34.)

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*_{ab}
16	leche pascual + 550	0'55	11'31	29'61	18'29	34'80	31'70	8'82	15'31	14'15	8'83652081
17	leche pascual + 600	0'6	10'99	29'56	17'77	34'49	31'01	8'5	15'26	13'63	8'51603781
18	leche pascual + 700	0'7	10'38	29'45	16'89	33'94	29'83	7'89	15'15	12'75	7'93968513
19	leche pascual + 800	0'8	9'83	29'31	15'96	33'38	28'57	7'34	15'01	11'82	7'40000676
20	leche pascual + 900	0'9	9'28	29'07	15'14	32'78	27'52	6'79	14'77	11	6'84354444
21	leche pascual + 1000	1	8'82	28'84	14'39	32'23	26'52	6'33	14'54	10'25	6'37842457
22	leche pascual + 1100	1'1	8'38	28'64	13'74	31'77	25'63	5'89	14'34	9'6	5'92913147
23	leche pascual + 1200	1'2	8'00	28'48	13'07	31'33	24'65	5'51	14'18	8'93	5'55289114
24	leche pascual + 1300	1'3	7'64	28'22	12'65	30'92	24'15	5'15	13'92	8'51	5'17363509
25	leche pascual + 1400	1'4	7'30	27'97	11'99	30'43	23'21	4'81	13'67	7'85	4'86150183



Tabla 4.35.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de leche adicionadas con el extracto de *Porphyridium cruentum*, para reproducir batido Covap de fresa. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0'227 \text{ mg B-PE/ml extracto}$.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*_{ab}
ESTÁNDAR Covap											
			5'82	28'57	9'87	30'2	19'06				
1	leche Pascual semi+0	0	23'23	5'15	34'93	35'30	81'60	17'41	-23'42	25'06	38'4656743
2	leche Pascual +25	0'025	20'41	14'88	30'97	34'36	64'33	14'59	-13'69	21'1	29'077383
3	leche Pascual + 50	0'050	18'68	20'05	28'49	34'84	54'87	10'86	-8'52	18'62	23'1783175
4	leche pascual + 75	0'075	17'57	23'15	27'08	35'62	49'47	11'75	-5'42	17'21	21'5319066
5	leche pascual + 100	0'1	16'77	25'16	25'99	36'17	45'93	10'95	-3'41	16'12	19'7834527
6	leche pascual + 125	0'125	16'08	26'46	25'01	36'41	43'38	10'26	-2'11	15'14	18'4103042
7	leche pascual + 150	0'150	15'58	27'35	24'29	36'58	41'61	9'76	-1'22	14'42	17'455154
8	leche pascual + 175	0'175	15'17	28'02	23'75	36'73	40'28	9'35	-0'55	13'88	16'7445334
9	leche pascual + 200	0'2	14'77	28'43	23'26	36'73	39'29	8'95	-0'14	13'39	16'1063404
10	leche pascual + 250	0'25	14'11	28'99	22'36	36'61	37'64	8'29	0'42	12'49	14'9966863
11	leche pascual + 300	0'3	13'53	29'29	21'50	36'33	36'29	7'71	0'72	11'63	13'9720936
12	leche pascual + 350	0'35	12'97	29'51	20'72	36'06	35'07	7'15	0'94	10'85	13'0279929
13	leche pascual + 400	0'4	12'54	29'61	20'12	35'80	34'19	6'72	1'04	10'25	12'3005081
14	leche pascual + 450	0'45	12'06	29'64	19'41	35'43	33'22	6'24	1'07	9'54	11'4496332
15	leche pascual + 500	0'5	11'70	29'62	18'83	35'09	32'45	5'88	1'05	8'96	10'7684029



Tabla 4.35.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de leche adicionadas con el extracto de *Porphyridium cruentum*, para reproducir batido Covap de fresa. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0'227 \text{ mg B-PE/ml extracto}$.

(Continuación Tabla 4.35.)

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*_{ab}
16	leche pascual + 550	0'55	11'31	29'61	18'29	34'80	31'70	5'49	1'04	8'42	10'1053501
17	leche pascual + 600	0'6	10'99	29'56	17'77	34'49	31'01	5'17	0'99	7'9	9'49310276
18	leche pascual + 700	0'7	10'38	29'45	16'89	33'94	29'83	4'56	0'88	7'02	8'41714916
19	leche pascual + 800	0'8	9'83	29'31	15'96	33'38	28'57	4'01	0'74	6'09	7'32910636
20	leche pascual + 900	0'9	9'28	29'07	15'14	32'78	27'52	3'46	0'5	5'27	6'32412049
21	leche pascual + 1000	1	8'82	28'84	14'39	32'23	26'52	3	0'27	4'52	5'43169403
22	leche pascual + 1100	1'1	8'38	28'64	13'74	31'77	25'63	2'56	0'07	3'87	4'64062496
23	leche pascual + 1200	1'2	8'00	28'48	13'07	31'33	24'65	2'18	-0'09	3'2	3'8730479
24	leche pascual + 1300	1'3	7'64	28'22	12'65	30'92	24'15	1'82	-0'35	2'78	3'3411525
25	leche pascual + 1400	1'4	7'30	27'97	11'99	30'43	23'21	1'48	-0'6	2'12	2'65420421



Llegado este punto, 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^* y 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 4.35.).

$$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

Ecuación 4.4

Así, un criterio bastante utilizado en colorimetría, 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%.

La Figura 4.34. muestra la variación de los parámetros de color respecto del volumen de extracto añadido. En ella se puede apreciar a título de ejemplo como se requiere de una adición de 250 μ l de extracto de ficoeritrina para reproducir el valor del parámetro a^* originario del batido de fresa Pascual.



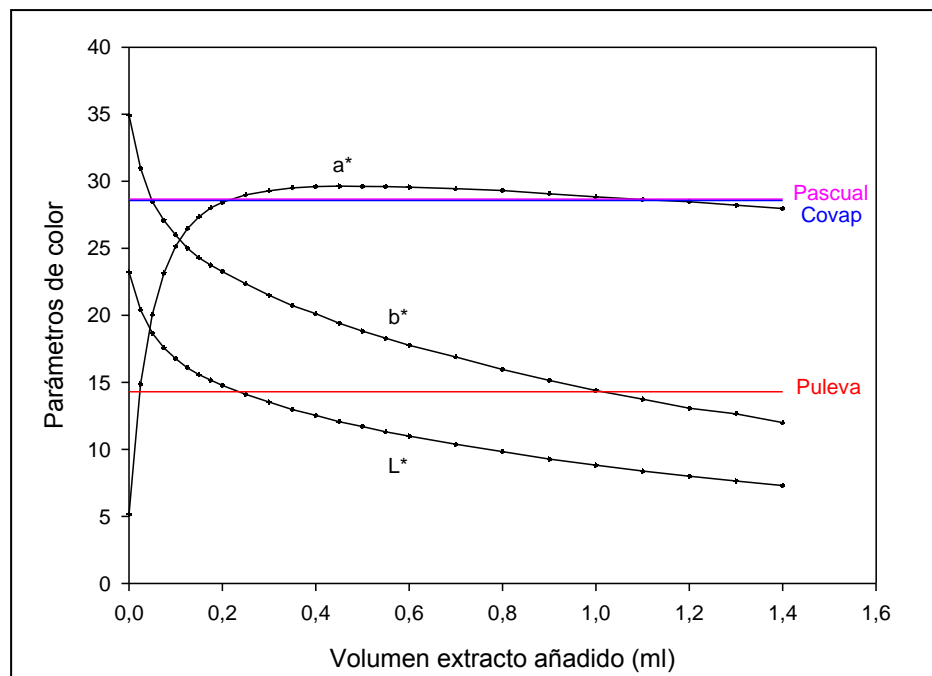


Figura 4.34.

Variación de los parámetros del color en función del volumen de extracto de ficoeritrina adicionado sobre leche semidesnatada y valor del parámetro a^* de los productos comerciales batidos de fresa Pascual (—), Puleva (—) y Covap (—).

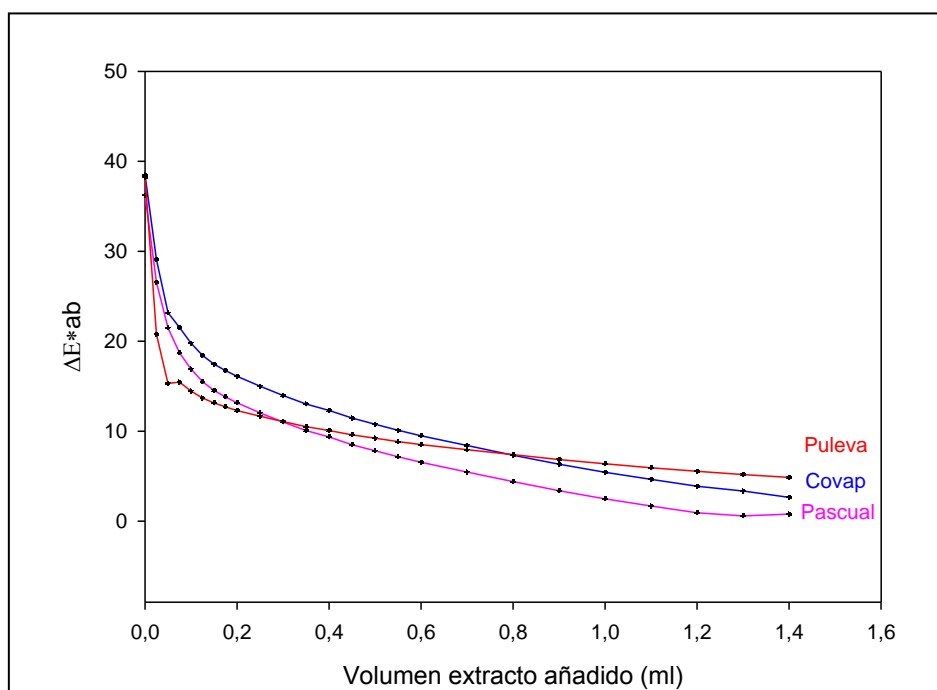


Figura 4.35.

Desviación de los parámetros del color (ΔE^*ab) respecto a los productos comerciales batidos de fresa Pascual (—), Puleva (—) y Covap (—), en función del volumen de extracto de *Porphyridium cruentum* añadido sobre leche semidesnatada.



Como se aprecia en la Figura 4.35., para el batido de fresa Pascual el valor de ΔE^*_{ab} va disminuyendo progresivamente a medida que se va adicionando un volumen creciente del extracto rico en ficoeritrina y alcanza un valor de ΔE^*_{ab} próximo a 5, cuando se ha adicionado un total de 700 μL de extracto. No obstante, si se sigue adicionando más cantidad el valor de ΔE^*_{ab} sigue disminuyendo hasta llegar a 0,79, donde se ha detenido el proceso de adición. La coloración de la muestra generada por adición de extracto colorante, es muy similar a la del producto comercial, cuando los niveles de $\Delta E^*_{ab} \leq 5$ y difiere bastante, cuando los valores de ΔE^*_{ab} están alejados de ese valor (Imagen 4.22.).



Imagen 4.22.

Detalle de los ensayos de coloración utilizando leche blanca a la que se va adicionando cantidad creciente de extracto colorante, para tratar de reproducir el color de distintos batidos de fresa comerciales.

Análogamente, la Tabla 4.34. y las Figuras 4.34. y 4.35. muestran los resultados obtenidos para las muestras coloreadas con extracto rico de ficoeritrina, para intentar reproducir el batido de fresa Puleva.

En este caso se puede apreciar como tras la primera adición de extracto (25 μ l), se alcanza un valor de a^* igual a 14'88 que es muy similar al del batido de fresa Puleva (14'3). No obstante aunque este valor es muy próximo, el color generado tras esta primera adición, está muy lejos de parecerse al de la muestra comercial. La Figura 4.35. muestra como es necesario añadir un volumen de extracto de ficoeritrina cercano a 1300 μ l, para conseguir obtener un valor de color generado muy próximo al del producto comercial, obteniendo un ΔE^*_{ab} aproximadamente igual a 5.

La Tabla 4.35. y las Figuras 4.34 y 4.35. muestran los resultados obtenidos para las muestras coloreadas con extracto rico en ficoeritrina, en el intento de reproducir la tercera muestra comercial ensayada que ha sido el batido de fresa Covap.

La Figura 4.34. muestra como al llegar a 200 μ l de extracto rico en ficoeritrina adicionado, se obtiene un valor del parámetro a^* muy similar al que posee el producto comercial. Sin embargo el color de la muestra tras esta adición, todavía no se parece mucho al del producto comercial. Por último, la Figura 4.35. muestra como la coloración de la muestra generada por adición del extracto colorante, es muy similar a la del producto comercial cuando se ha añadido 1 ml del mismo consiguiendo un valor de ΔE^*_{ab} próximo a 5.

A modo de resumen y comparando los tres casos, se puede apreciar que los valores del parámetro a^* para los batidos comerciales Pascual y Covap son muy similares y bastante diferentes de ese valor para el caso de la marca Puleva, necesitándose para alcanzar este valor únicamente 25 μ l de extracto y del orden de ocho veces más (200 μ l) para el caso de las otras dos marcas comerciales.



Del análisis de la Figura 4.35., la Tabla 4.36. y la Imagen 4.23. se desprende que la matriz comercial más fácil de reproducir, es la del batido Pascual, pues requiere la adición del menor volumen de extracto (700 μl) para alcanzar un valor de $\Delta E^*_{ab} \leq 5$. Le sigue la matriz constituida por batido Covap, siendo la más difícil de reproducir por requerir más volumen de extracto, el batido de fresa Puleva, que curiosamente era el que precisaba la menor cantidad de extracto para ser reproducido en cuanto al parámetro a^* .

Tabla 4.36.

Volúmenes de extracto rico en ficoeritrina, necesarios adicionar a leche semidesnatada, para intentar reproducir distintas marcas comerciales.

Batido	Parámetro a^*	Volumen extracto necesario para reproducir a^* (μl)	Volumen extracto para $\Delta E^*_{ab} \leq 5$ (μl)
Covap	28'57	200	1000
Puleva	14'30	25	1300
Pascual	28'67	200	700





Imagen 4.23.

Detalle de la coloración obtenida por adición del extracto de ficoeritrina sobre la matriz de leche semidesnatada para intentar reproducir los batidos de fresa Covap, Puleva y Pascual.

4.4.1.1.2.-Yogures

También se ha ensayado la utilización del extracto colorante en alimentos semisólidos como los constituidos por yogures. A continuación, se muestran los resultados obtenidos utilizando yogur natural de la marca Danone como matriz, tratando de conseguir un producto de color rosa similar a los yogures de fresa o Macedonia que se encuentran en el Mercado.

La Tablas 4.37., 4.38., 4.39. y 4.40. y las Figuras 4.36. 4.37. muestran los resultados obtenidos utilizando extracto de ficoeritrina, para los ensayos de coloración de una matriz de yogur natural, intentando reproducir los yogures de fresa (Danone, Clesa y Auchan) y Macedonia (Clesa).

Tabla 4.37.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de yogur adicionadas con el extracto enriquecido en B-PE de *Porphyridium cruentum*, para intentar reproducir el yogur de fresa Danone. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0'227 \text{ mg B-PE/ml extracto}$.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*ab
ESTANDAR	Danone		7'35	25'86	11'80	28'42	24'54	0	0	0	0
1	Yogur natural Danone +0	0	22'03	1'42	31'70	31'74	87'44	14'68	-24'4	19'9	34'768175
2	Yogur natural Danone +25	0'025	18'17	11'18	25'20	27'57	66'07	10'82	-14'68	13'4	22'630395
3	Yogur natural Danone +50	0'05	15'92	16'81	21'65	27'41	52'17	8'57	-9'05	9'85	15'886154
4	Yogur natural Danone +75	0'075	14'46	20'53	20'03	28'69	44'29	7'11	-5'33	8'23	12'111725
5	Yogur natural Danone +100	0'100	13'50	22'19	18'35	28'80	39'59	6'15	-3'67	6'55	9'7053541
6	Yogur natural Danone +125	0'125	12'62	23'50	17'24	29'15	36'26	5'27	-2'36	5'44	7'9332275
7	Yogur natural Danone +175	0'175	11'48	24'49	15'19	28'82	31'82	4'13	-1'37	3'39	5'5159677
8	Yogur natural Danone +200	0'200	10'12	25'95	13'86	29'42	28'11	2'77	0'09	2'06	3'4532014
9	Yogur natural Danone +350	0'350	9'11	25'64	12'25	28'424	25'52	1'76	-0'22	0'45	1'8298907
10	Yogur natural Danone +450	0'450	7'69	25'55	10'64	27'68	22'61	0'34	-0'31	-1'16	1'2479182



Tabla 4.38.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de yogur adicionadas con el extracto enriquecido en B-PE de *Porphyridium cruentum*, para intentar reproducir el yogur de fresa Clesa. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0'227 \text{ mg B-PE/ ml extracto}$.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*ab
ESTANDAR	Clesa		8'57	24'26	14'40	28'21	30'69	0	0	0	0
1	Yogur natural Danone +0	0	22'03	1'42	31'70	31'74	87'44	13'46	-22'84	17'3	31'65663927
2	Yogur natural Danone +25	0'025	18'17	11'18	25'20	27'57	66'07	9'6	-13'08	10'8	19'4906747
3	Yogur natural Danone +50	0'05	15'92	16'81	21'65	27'41	52'17	7'35	-7'45	7'25	12'7313589
4	Yogur natural Danone +75	0'075	14'46	20'53	20'03	28'69	44'29	5'89	-3'73	5'63	8'96113274
5	Yogur natural Danone +100	0'100	13'50	22'19	18'35	28'80	39'59	4'93	-2'07	3'95	6'64772894
6	Yogur natural Danone +125	0'125	12'62	23'50	17'24	29'15	36'26	4'05	-0'76	2'84	5'00456791
7	Yogur natural Danone +175	0'175	11'48	24'49	15'19	28'82	31'82	2'91	0'23	0'79	3'02408664
8	Yogur natural Danone +200	0'200	10'12	25'95	13'86	29'42	28'11	1'55	1'69	-0'54	2'35588625
9	Yogur natural Danone +350	0'350	9'11	25'64	12'25	28'424	25'52	0'54	1'38	-2'15	2'61122577
10	Yogur natural Danone +450	0'450	7'69	25'55	10'64	27'68	22'61	-0'88	1'29	-3'76	4'07137569



Tabla 4.39.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de yogur adicionadas con el extracto enriquecido en B-PE de *Porphyridium cruentum*, para intentar reproducir el yogur de fresa Auchan. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0'227 \text{ mg B-PE/ ml extracto}$.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*ab
ESTANDAR	Auchan		6'62	25'05	11'04	27'38	23'79	0	0	0	0
1	Yogur natural Danone +0	0	22'03	1'42	31'70	31'74	87'44	15'41	-23'63	20'66	34'96685
2	Yogur natural Danone +25	0'025	18'17	11'18	25'20	27'57	66'07	11'55	-13'87	14'16	22'9409023
3	Yogur natural Danone +50	0'05	15'92	16'81	21'65	27'41	52'17	9'3	-8'24	10'61	16'3389014
4	Yogur natural Danone +75	0'075	14'46	20'53	20'03	28'69	44'29	7'84	-4'52	8'99	12'7560221
5	Yogur natural Danone +100	0'100	13'50	22'19	18'35	28'80	39'59	6'88	-2'86	7'31	10'4379165
6	Yogur natural Danone +125	0'125	12'62	23'50	17'24	29'15	36'26	6	-1'55	6'2	8'7659854
7	Yogur natural Danone +175	0'175	11'48	24'49	15'19	28'82	31'82	4'86	-0'56	4'15	6'41527084
8	Yogur natural Danone +200	0'200	10'12	25'95	13'86	29'42	28'11	3'5	0'9	2'82	4'58392845
9	Yogur natural Danone +350	0'350	9'11	25'64	12'25	28'424	25'52	2'49	0'59	1'21	2'83060064
10	Yogur natural Danone +450	0'450	7'69	25'55	10'64	27'68	22'61	1'07	0'5	-0'4	1'24695629



Tabla 4.40.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de yogur adicionadas con el extracto enriquecido en B-PE de *Porphyridium cruentum*, para intentar reproducir el yogur de Macedonia Clesa. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0'227 \text{ mg B-PE/ml extracto}$.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*ab
ESTANDAR	Clesa Macedonia		13'45	18'07	22'46	28'82	51'17	0	0	0	0
1	Yogur natural Danone +0	0	22'03	1'42	31'70	31'74	87'44	8'57	-16'66	9'25	20'89
2	Yogur natural Danone +25	0'025	18'17	11'18	25'20	27'57	66'07	4'72	-6'89	2'75	8'79
3	Yogur natural Danone +50	0'05	15'92	16'81	21'65	27'41	52'17	2'46	-1'26	-0'81	2'89
4	Yogur natural Danone +75	0'075	14'46	20'53	20'03	28'69	44'29	1'01	2'46	-2'42	3'60
5	Yogur natural Danone +100	0'100	13'50	22'19	18'35	28'80	39'59	0'05	4'12	-4'09	5'81
6	Yogur natural Danone +125	0'125	12'62	23'50	17'24	29'15	36'26	-0'83	5'43	-5'21	7'57
7	Yogur natural Danone +175	0'175	11'48	24'49	15'19	28'82	31'82	-1'97	6'42	-7'26	9'89
8	Yogur natural Danone +200	0'200	10'12	25'95	13'86	29'42	28'11	-3'33	7'87	-8'59	12'12
9	Yogur natural Danone +350	0'350	9'11	25'64	12'25	28'424	25'52	-4'34	7'57	-10'21	13'43
10	Yogur natural Danone +450	0'450	7'69	25'55	10'64	27'68	22'61	-5'76	7'48	-11'81	15'12



En primer lugar, la Tabla 4.37. y las Figuras 4.36 y 4.37. muestran los resultados obtenidos para las muestras coloreadas con extracto rico de ficoeritrina, para intentar reproducir el yogur de fresa Danone. En este caso, en la Figura 4.36. se puede apreciar como se requiere de una adición de 200 μl de extracto de ficoeritrina para reproducir el valor del parámetro a^* originario del yogur de fresa Danone. Así, la Figura 4.37. muestra la desviación del color obtenido respecto al producto comercial yogur de fresa Danone y en ella puede observarse como con una adición de 175 μl de extracto, es suficiente para alcanzarse un valor de ΔE^*_{ab} aproximadamente igual a 5, lo que indica que se reproduce satisfactoriamente el color del producto comercial elegido. Es importante resaltar que en este caso, es necesario menos volumen de extracto para obtener un valor óptimo de ΔE^*_{ab} , que para reproducir el parámetro a^* .

Del mismo modo, la Tabla 4.38. y las Figuras 4.36 y 4.37. muestran los resultados obtenidos para las muestras coloreadas con extracto rico de ficoeritrina, para intentar reproducir el yogur de fresa Clesa. Se puede apreciar como tras una adición de extracto de 175 μl , se alcanza un valor de a^* igual a 24'49 que es muy similar al del yogur de fresa Clesa (24'26). Sin embargo, la Figura 4.37. muestra como sólo es necesario añadir un volumen de extracto de ficoeritrina cercano a 125 μl , para conseguir obtener un valor de color generado ($\Delta E^*_{ab} \leq 5$) muy próximo al del producto comercial.

En tercer lugar, la Tabla 4.39. y las Figuras 4.36 y 4.37. muestran los resultados obtenidos para las muestras coloreadas con extracto rico en ficoeritrina, en el intento de reproducir el yogur de fresa Auchan. La Figura 4.36. muestra como al llegar a 175 μl de extracto rico en ficoeritrina adicionado, se obtiene un valor del parámetro a^* muy similar al que posee el producto comercial. Sin embargo el color de la muestra tras esta adición, todavía no se parece mucho al del producto comercial. Así, la Figura 4.37. muestra como la coloración de la muestra generada por adición del extracto colorante, es muy similar a la del producto comercial cuando se ha añadido 200 μl del mismo consiguiendo un valor de ΔE^*_{ab} próximo a 5 (4'58).



Finalmente, la Tabla 4.40. y las Figuras 4.36 y 4.37. muestran los resultados obtenidos para las muestras coloreadas con extracto rico en ficoeritrina, en el intento de reproducir el yogur de macedonia Clesa. La Figura 4.36. muestra como para reproducir el parámetro a^* del yogur de Macedonia Clesa, son necesarios únicamente unos 50 μl de extracto con los cuales, el parámetro ΔE^*_{ab} adquiere un valor mínimo de 2'89. Se puede observar como en este caso los valores de a^* y ΔE^*_{ab} se alcanzan para el mismo volumen de extracto adicionado, adquiriendo un color muy similar al comercial (Figura 4.37., Imagen 4.24.)

En términos globales, la matriz más fácil de reproducir ha sido la constituida por yogur de macedonia Clesa y dentro de los tres yogures de fresa, el de la marca Clesa fue el que requirió menor volumen de extracto para alcanzar un valor de $\Delta E^*_{ab} \leq 5$. Es interesante observar como en el caso del yogur de macedonia, el valor de ΔE^*_{ab} disminuye rápidamente al principio y tras la tercera adición alcanza un mínimo, para a partir de este momento comenzar a aumentar de forma progresiva.



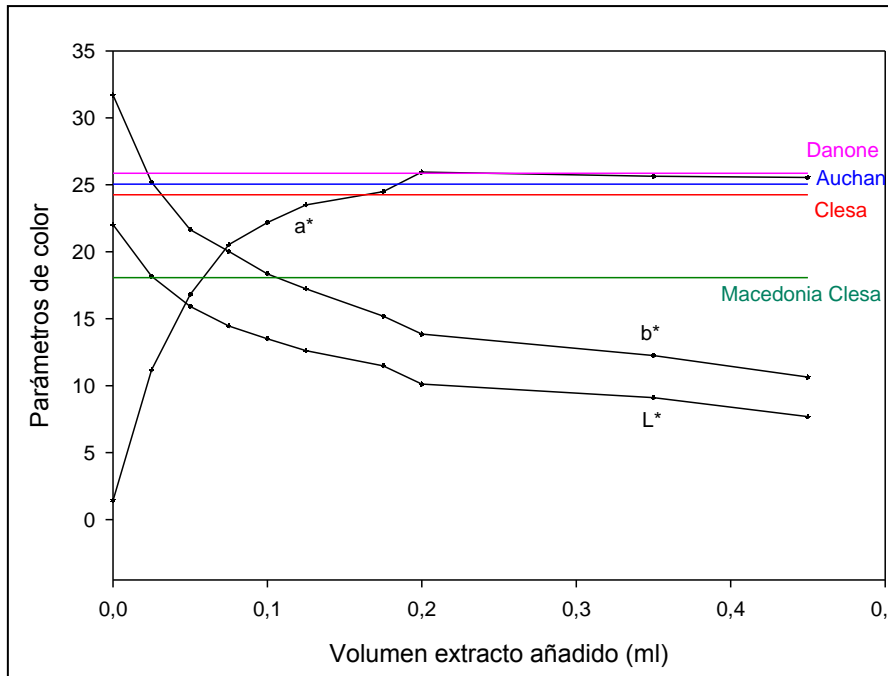


Figura 4.36.

Variación de los parámetros del color en función del volumen de extracto de ficoeritrina adicionado sobre yogur natural y valor del parámetro a^* de los productos comerciales yogures de fresa Danone (—), Clesa (—) y Auchan (—) y yogur de macedonia Clesa (—).

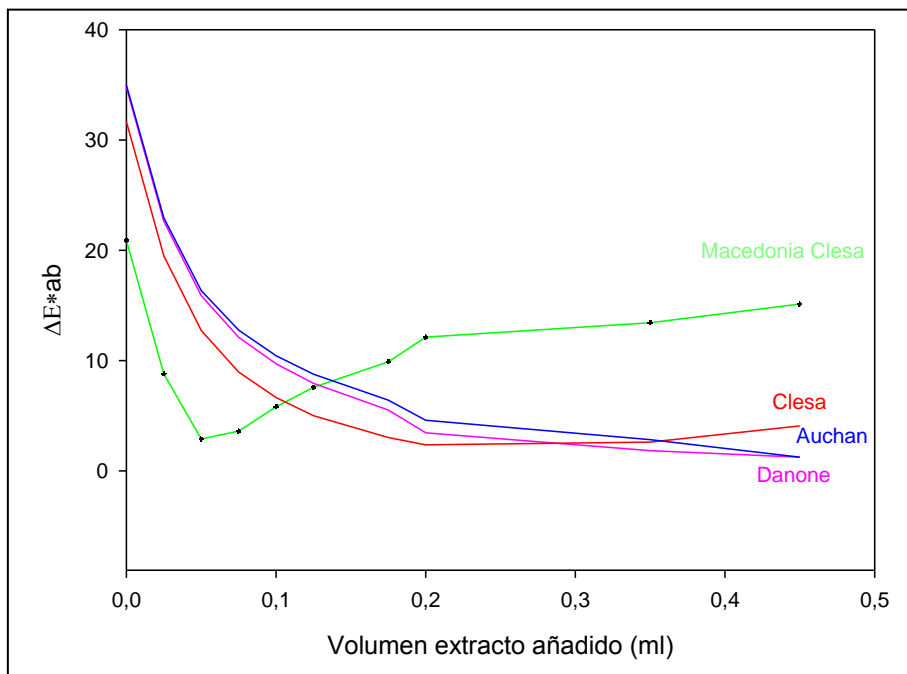


Figura 4.37.

Desviación de los parámetros del color (ΔE^*ab) respecto a los productos comerciales yogures de fresa Danone (—), Clesa (—) y Auchan (—) y yogur de macedonia Clesa (—), en función del volumen de extracto de *Porphyridium cruentum* añadido sobre yogur natural.



Tabla 4.41.

Volúmenes de extracto rico en ficoeritrina, necesarios adicionar a yogur natural, para intentar reproducir distintas marcas comerciales.

Yogur	Parámetro a*	Volumen extracto necesario para reproducir a* (μl)	Volumen extracto para $\Delta E^*_{ab} \leq 5$ (μl)
Fresa Danone	25'86	200	175
Fresa Clesa	24'26	175	125
Fresa Auchan	25'05	175	200
Macedonia Clesa	18'07	50	50

**Imagen 4.24.**

Detalle de los colores alcanzados por adición de extracto de ficoeritrina procedente de *Porphyridium cruentum* para intentar reproducir yogures con tonalidades rosas de fresa y macedonia.

4.4.1.1.3.-Yogures líquidos

A continuación se muestran los resultados obtenidos utilizando yogur líquido como matriz. En este caso, se ha utilizado yogur líquido natural de la marca Actimel (Danone) como matriz y se ha tratado de conseguir un producto de color rosa similar a los yogures de fresa líquidos, de las marcas Kaiku, Clesa, Actimel y Auchan.

La Tablas 4.42., 4.43., 4.44. y 4.45. y las Figuras 4.38. y 4.39. muestran los resultados obtenidos utilizando extracto de ficoeritrina, para los ensayos de coloración de una matriz de yogur líquido natural.



Tabla 4.42.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de yogur líquido adicionadas con el extracto enriquecido en B-PE de *Porphyridium cruentum*, para intentar reproducir el yogur líquido de fresa Actimel. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0.227 \text{ mg B-PE/ml extracto}$.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*_{ab}
ESTANDAR	Actimel		3'47	13'79	5'82	14'97	22'87	0	0	0	0
1	yogur líquido natural+0	0	12'86	13'67	21'54	25'52	57'59	9'39	-0'12	15'72	18'3113326
2	yogur líquido natural+ 25	0'025	11'67	17'66	19'54	26'34	47'88	8'2	3'87	13'72	16'4455252
3	yogur líquido natural +50	0'050	10'67	20'03	17'87	26'84	41'74	7'2	6'24	12'05	15'3616438
4	yogur líquido natural +75	0'075	9'93	21'67	16'61	27'30	37'47	6'46	7'88	10'79	14'8408254
5	yogur líquido natural+100	0'100	9'42	22'90	15'78	27'81	34'57	5'95	9'11	9'96	14'7511423
6	yogur líquido natural +125	0'125	8'87	23'61	14'84	27'89	32'16	5'4	9'82	9'02	14'3858542
7	yogur líquido natural +150	0'150	8'65	24'09	14'58	28'16	31'18	5'18	10'3	8'76	14'4796409
8	yogur líquido natural +175	0'175	8'23	24'32	13'80	27'96	29'57	4'76	10'53	7'98	14'0434647
9	yogur líquido natural +200	0'200	8'05	24'73	13'50	28'18	28'63	4'58	10'94	7'68	14'1294869
10	yogur líquido natural +225	0'225	7'82	24'88	13'14	28'13	27'84	4'35	11'09	7'32	13'9818811
11	yogur líquido natural +275	0'275	7'36	24'90	12'31	27'77	26'30	3'89	11'11	6'49	13'441886
12	yogur líquido natural +350	0'350	6'87	25'01	11'54	27'55	24'77	3'4	11'22	5'72	13'0447997



Tabla 4.43.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de yogur líquido adicionadas con el extracto enriquecido en B-PE de *Porphyridium cruentum*, para intentar reproducir el yogur líquido de fresa Clesa. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0'227 \text{ mg B-PE/ml extracto}$.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*ab
ESTANDAR Clesa											
1	yogur liquido natural+0	0	12'86	13'67	21'54	25'52	57'59	7'89	-8'2	14'04	18'0724569
2	yogur liquido natural+ 25	0'025	11'67	17'66	19'54	26'34	47'88	6'7	-4'21	12'04	14'4074876
3	yogur liquido natural +50	0'050	10'67	20'03	17'87	26'84	41'74	5'7	-1'84	10'37	11'9754958
4	yogur liquido natural +75	0'075	9'93	21'67	16'61	27'30	37'47	4'96	-0'2	9'11	10'3746663
5	yogur liquido natural+100	0'100	9'42	22'90	15'78	27'81	34'57	4'45	1'03	8'28	9'45631006
6	yogur liquido natural +125	0'125	8'87	23'61	14'84	27'89	32'16	3'9	1'74	7'34	8'49194913
7	yogur liquido natural +150	0'150	8'65	24'09	14'58	28'16	31'18	3'68	2'22	7'08	8'28234266
8	yogur liquido natural +175	0'175	8'23	24'32	13'80	27'96	29'57	3'26	2'45	6'3	7'50467188
9	yogur liquido natural +200	0'200	8'05	24'73	13'50	28'18	28'63	3'08	2'86	6	7'32570816
10	yogur liquido natural +225	0'225	7'82	24'88	13'14	28'13	27'84	2'85	3'01	5'64	6'99944283
11	yogur liquido natural +275	0'275	7'36	24'90	12'31	27'77	26'30	2'39	3'03	4'81	6'16677387
12	yogur liquido natural +350	0'350	6'87	25'01	11'54	27'55	24'77	1'9	3'14	4'04	5'45813155



Tabla 4.44.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de yogur líquido adicionadas con el extracto enriquecido en B-PE de *Porphyridium cruentum*, para intentar reproducir el yogur líquido de fresa Kaiku. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0'227 \text{ mg B-PE/ml extracto}$.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*ab
ESTANDAR	Kaiku		5'15	22'56	8'49	24'11	20'63	0	0	0	0
1	yogur liquido natural+0	0	12'86	13'67	21'54	25'52	57'59	7'71	-8'89	13'05	17'5721
2	yogur liquido natural+ 25	0'025	11'67	17'66	19'54	26'34	47'88	6'52	-4'9	11'05	13'7340052
3	yogur liquido natural +50	0'050	10'67	20'03	17'87	26'84	41'74	5'52	-2'53	9'38	11'1738847
4	yogur liquido natural +75	0'075	9'93	21'67	16'61	27'30	37'47	4'78	-0'89	8'12	9'46440172
5	yogur liquido natural+100	0'100	9'42	22'90	15'78	27'81	34'57	4'27	0'34	7'29	8'45532968
6	yogur liquido natural +125	0'125	8'87	23'61	14'84	27'89	32'16	3'72	1'05	6'35	7'4339357
7	yogur liquido natural +150	0'150	8'65	24'09	14'58	28'16	31'18	3'5	1'53	6'09	7'18881075
8	yogur liquido natural +175	0'175	8'23	24'32	13'80	27'96	29'57	3'08	1'76	5'31	6'38592985
9	yogur liquido natural +200	0'200	8'05	24'73	13'50	28'18	28'63	2'9	2'17	5'01	6'18215173
10	yogur liquido natural +225	0'225	7'82	24'88	13'14	28'13	27'84	2'67	2'32	4'65	5'84241388
11	yogur liquido natural +275	0'275	7'36	24'90	12'31	27'77	26'30	2'21	2'34	3'82	4'9952077
12	yogur liquido natural +350	0'350	6'87	25'01	11'54	27'55	24'77	1'72	2'45	3'05	4'27356994



Tabla 4.45.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de yogur líquido adicionadas con el extracto enriquecido en B-PE de *Porphyridium cruentum*, para intentar reproducir el yogur líquido de fresa Auchan. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0'227 \text{ mg B-PE/ml extracto}$.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*_{ab}
ESTANDAR	Auchan		3'21	14'43	5'37	15'40	20'43	0	0	0	0
1	yogur liquido natural+0	0	12'86	13'67	21'54	25'52	57'59	9'65	-0'75	16'17	18'84
2	yogur liquido natural+ 25	0'025	11'67	17'66	19'54	26'34	47'88	8'46	3'24	14'17	16'82
3	yogur liquido natural +50	0'050	10'67	20'03	17'87	26'84	41'74	7'46	5'6	12'49	15'59
4	yogur liquido natural +75	0'075	9'93	21'67	16'61	27'30	37'47	6'72	7'24	11'24	14'96
5	yogur liquido natural+100	0'100	9'42	22'90	15'78	27'81	34'57	6'21	8'47	10'40	14'78
6	yogur liquido natural +125	0'125	8'87	23'61	14'84	27'89	32'16	5'66	9'18	9'47	14'35
7	yogur liquido natural +150	0'150	8'65	24'09	14'58	28'16	31'18	5'44	9'66	9'21	14'42
8	yogur liquido natural +175	0'175	8'23	24'32	13'80	27'96	29'57	5'02	9'89	8'43	13'93
9	yogur liquido natural +200	0'200	8'05	24'73	13'50	28'18	28'63	4'84	10'30	8'13	13'99
10	yogur liquido natural +225	0'225	7'82	24'88	13'14	28'13	27'84	4'61	10'45	7'76	13'81
11	yogur liquido natural +275	0'275	7'36	24'90	12'31	27'77	26'30	4'15	10'47	6'93	13'22
12	yogur liquido natural +350	0'350	6'87	25'01	11'54	27'55	24'77	3'66	10'58	6'17	12'78



En el primer caso, la Tabla 4.42. y las Figuras 4.38 y 4.39. muestran los resultados obtenidos para las muestras coloreadas con extracto rico de ficoeritrina, para intentar reproducir el yogur líquido de fresa Actimel. Así, puede apreciarse como el valor del parámetro a^* de la marca Actimel (13'79) se alcanza prácticamente sin realizar ninguna adición (13'67) (Figura 4.38.), mientras que el valor de ΔE^*ab va disminuyendo hasta un valor de 13'04, a partir del cual es necesaria la adición de grandes volúmenes de extracto para conseguir disminuciones poco relevantes de este parámetro. No obstante, se obtiene una muestra con un color bastante atractivo y similar al comercial (Imagen 4.25., Figura 4.39).

Del mismo modo, la Tabla 4.43. y las Figuras 4.38. y 4.39. muestran los resultados obtenidos para las muestras coloreadas con extracto rico de ficoeritrina, para intentar reproducir el yogur líquido de fresa Clesa. Se puede apreciar como tras una adición de extracto de 75 μ l, se alcanza un valor de a^* igual a 21'67 que es muy similar al del yogur líquido de fresa Clesa (21'87) (Figura 4.38.). Sin embargo, la Figura 4.39. muestra como sólo es necesario añadir un volumen de extracto de ficoeritrina cercano a 350 μ l ($\Delta E^*ab=3'45$), para conseguir obtener un valor de color generado muy próximo al del producto comercial.

En tercer lugar, la Tabla 4.44. y las Figuras 4.38 y 4.39. muestran los resultados obtenidos para las muestras coloreadas con extracto rico en ficoeritrina, en el intento de reproducir el yogur líquido de fresa Kaiku. La Figura 4.38. muestra como al llegar a 100 μ l de extracto rico en ficoeritrina adicionado, se obtiene un valor del parámetro a^* muy similar al que posee el producto comercial. Sin embargo el color de la muestra tras esta adición, todavía no se parece mucho al del producto comercial. Así, la Figura 4.39. muestra como la coloración de la muestra generada por adición del extracto colorante, es muy similar a la del producto comercial cuando se ha añadido 275 μ l del mismo consiguiendo un valor de ΔE^*ab igual a 5.

Por último, la Tabla 4.45. y las Figuras 4.38 y 4.39. muestran los resultados obtenidos para las muestras coloreadas con extracto rico en ficoeritrina, en el intento de reproducir el yogur líquido de fresa Auchan.



Así, la Figura 4.38. muestra como para reproducir el parámetro a^* del yogur líquido de fresa Auchan, no es prácticamente necesario realizar ninguna adición. Por otro lado, el parámetro ΔE^*_{ab} va disminuyendo hasta un valor de 12'78 (Figura 4.39.), por lo que sería necesario adicionar grandes cantidades de extracto para conseguir valores próximos a 5. No obstante, se obtiene una muestra con un color bastante atractivo comercialmente (Imagen 4.25.).

Podemos concluir que el yogur líquido más fácil de reproducir es Kaiku, seguido de Clesa, mientras que las otras dos marcas precisan de cantidades muy superiores de extracto para intentar ser reproducidas.



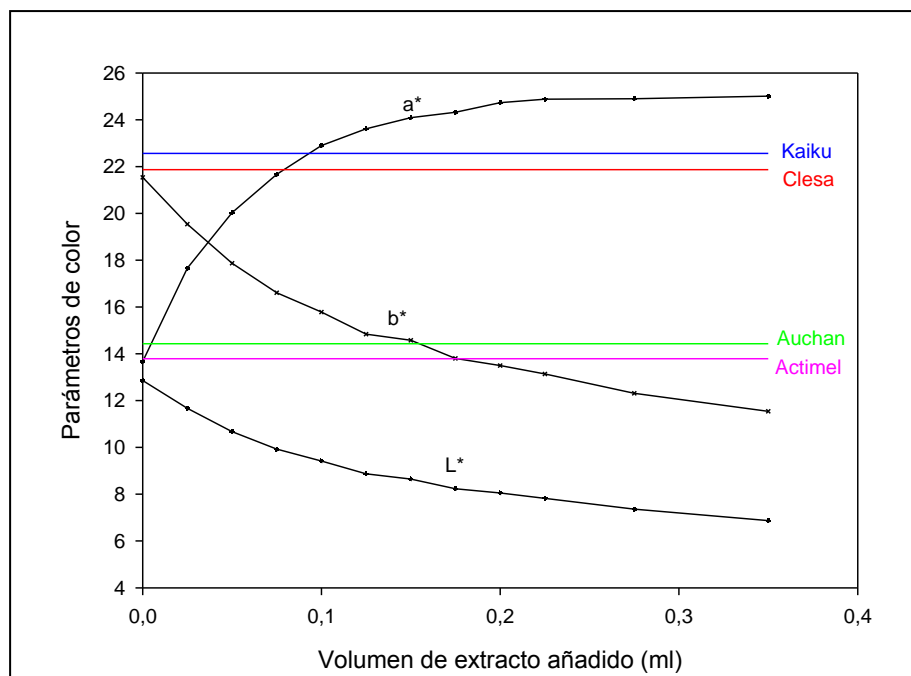


Figura 4.38.

Variación de los parámetros del color en función del volumen de extracto de ficoeritrina adicionado sobre yogur líquido natural y valor del parámetro a^* de los productos comerciales yogures líquidos de fresa Actimel (—), Clesa (—), Kaiku (—) y Auchan (—).

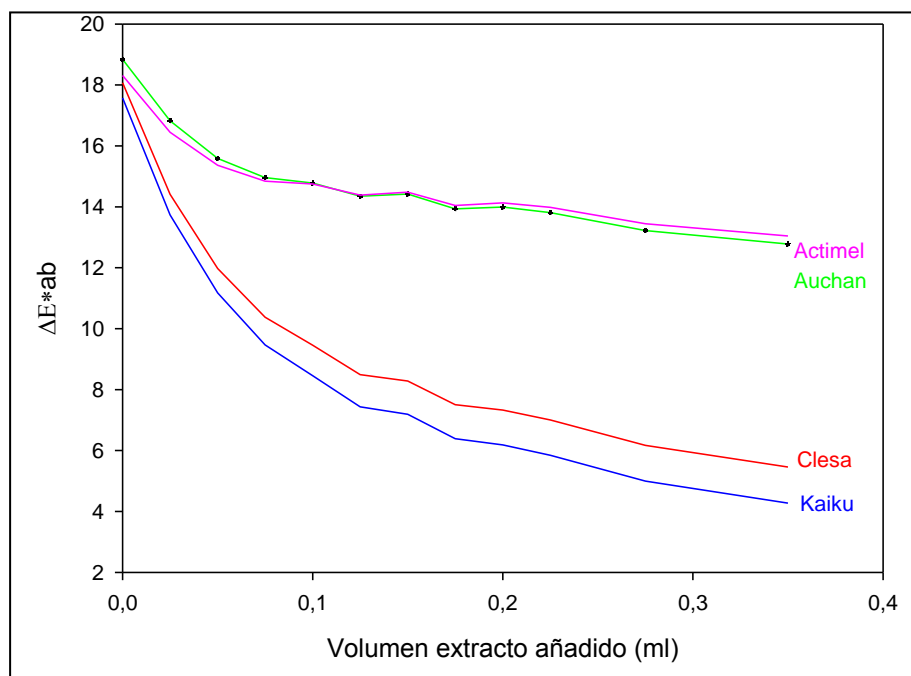


Figura 4.39.

Desviación de los parámetros del color (ΔE^*ab) respecto a los productos comerciales yogures líquidos de fresa Actimel (—), Clesa (—), Kaiku (—) y Auchan (—), en función del volumen de extracto de *Porphyridium cruentum* añadido sobre yogur líquido natural.



Tabla 4.46.

Volúmenes de extracto rico en ficoeritrina, necesarios adicionar a yogur líquido natural, para intentar reproducir distintas marcas comerciales.

Yogur líquido	Parámetro a*	Volumen extracto necesario para reproducir a* (µl)	Volumen extracto para $\Delta E^*_{ab} \leq 5$ (µl)
Fresa Actimel	13'79	0	>350
Fresa Clesa	21'87	75	350
Fresa Kaiku	22'56	100	275
Fresa Auchan	14'43	0	>350



Imagen 4.25.

Detalle de los colores alcanzados por adición de extracto de ficoeritrina procedente de *Porphyridium cruentum* para intentar reproducir los productos comerciales de yogures líquidos de tonalidades rosas.

4.4.1.1.4.-Helados

Otro ejemplo de muestras alimenticias ensayadas, han sido los helados. A continuación se muestran los resultados obtenidos utilizando helado de nata de la marca Nestlé como matriz y tratando de conseguir un producto de color rosa similar al existente en helado de fresa, de las marcas Nestlé y Auchan.

Las Tablas 4.47. y 4.48. y las Figuras 4.40. y 4.41. muestran los resultados obtenidos utilizando extracto de ficoeritrina, para los ensayos de coloración usando una matriz de helado de nata.



Tabla 4.47.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de helado adicionadas con el extracto enriquecido en B-PE de *Porphyridium cruentum*, para intentar reproducir el Helado de fresa Nestlé. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0'227 \text{ mg B-PE/ ml extracto}$.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*ab
ESTANDAR	Nestlé		1'15	5'96	1'83	6'24	17'1	0	0	0	0
1	Helado nata + 0	0	22'38	2'30	34'11	34'19	86'15	21'23	-3'66	32'27	38'80
2	Helado nata + 10	0'01	22'33	6'25	33'59	34'16	79'46	21'17	0'29	31'75	38'17
3	Helado nata + 35	0'035	21'98	12'94	32'74	35'21	68'43	20'83	6'98	30'91	37'92
4	Helado nata + 85	0'085	19'97	20'37	29'68	35'99	55'54	18'82	14'40	27'85	36'57
5	Helado nata + 135	0'135	17'94	26'97	26'93	38'12	44'96	16'78	21'01	25'10	36'79
6	Helado nata + 185	0'185	16'64	29'31	25'27	38'70	40'78	15'48	23'34	23'44	36'53
7	Helado nata + 335	0'335	15'53	30'12	23'87	38'43	38'40	14'37	24'16	22'03	35'72
8	Helado nata + 435	0'435	14'91	30'70	23'01	38'37	36'85	13'75	24'74	21'18	35'35



Tabla 4.48.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de helado adicionadas con el extracto enriquecido en B-PE de *Porphyridium cruentum*, para intentar reproducir el Helado de fresa Auchan. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0'227 \text{ mg B-PE/ml extracto}$.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*_{ab}
ESTÁNDAR	Auchan		0'45	2'32	0'62	2'40	15	0	0	0	0
1	Helado nata + 0	0	22'38	2'30	34'11	34'19	86'15	21'93	-0'02	33'49	40'0313052
2	Helado nata + 10	0'01	22'33	6'25	33'59	34'16	79'46	21'88	3'93	32'97	39'7643081
3	Helado nata + 35	0'035	21'98	12'94	32'74	35'21	68'43	21'53	10'62	32'12	40'1001209
4	Helado nata + 85	0'085	19'97	20'37	29'68	35'99	55'54	19'52	18'05	29'06	39'3867554
5	Helado nata + 135	0'135	17'94	26'97	26'93	38'12	44'96	17'49	24'65	26'31	40'0716695
6	Helado nata + 185	0'185	16'64	29'31	25'27	38'70	40'78	16'19	26'99	24'65	39'9774774
7	Helado nata + 335	0'335	15'53	30'12	23'87	38'43	38'40	15'08	27'8	23'25	39'2531387
8	Helado nata + 435	0'435	14'91	30'70	23'01	38'37	36'85	14'46	28'38	22'39	38'9336371



En primer lugar, la Tabla 4.47. y las Figuras 4.40 y 4.41. muestran los resultados obtenidos para las muestras coloreadas con extracto rico de ficoeritrina, para intentar reproducir el helado de fresa Nestlé.

En la Figura 4.40. se puede apreciar como bastan unos 10 μ l de extracto, para llegar a un valor de a^* similar al de la muestra comercial constituida por el helado de fresa Nestlé. Por otro lado, los valores de ΔE^*_{ab} reflejados en la Tabla 4.47., denotan que el valor mínimo alcanzado por adición de extracto es de 35'35 y que para provocar una ligera disminución en este parámetro ya es necesaria la adición de grandes volúmenes de extracto. No obstante, es importante resaltar que con 435 μ l añadidos se consigue un color que, sin llegar a ser muy cercano al de los helados comerciales, sí es suficientemente atractivo como para pensar en su hipotética utilización en el mercado (Imagen 4.26.)

Del mismo modo, la Tabla 4.48. y las Figuras 4.40. y 4.41. muestran los resultados obtenidos para las muestras coloreadas con extracto rico de ficoeritrina, para intentar reproducir el helado de fresa Auchan. Así, la Figura 4.40. muestra como para reproducir el parámetro a^* del helado de fresa Auchan, no es prácticamente necesario realizar ninguna adición. Por otro lado, el parámetro ΔE^*_{ab} va disminuyendo hasta un valor de 38'93 (Figura 4.41.), por lo que sería necesario adicionar grandes cantidades de extracto para conseguir valores próximos a 5.

A la vista de estos resultados, puede concluirse que aunque no llegan a reproducirse los colores correspondientes a los helados comerciales ensayados, si se consiguen colores atractivos que podrían ser bien aceptados por los consumidores.



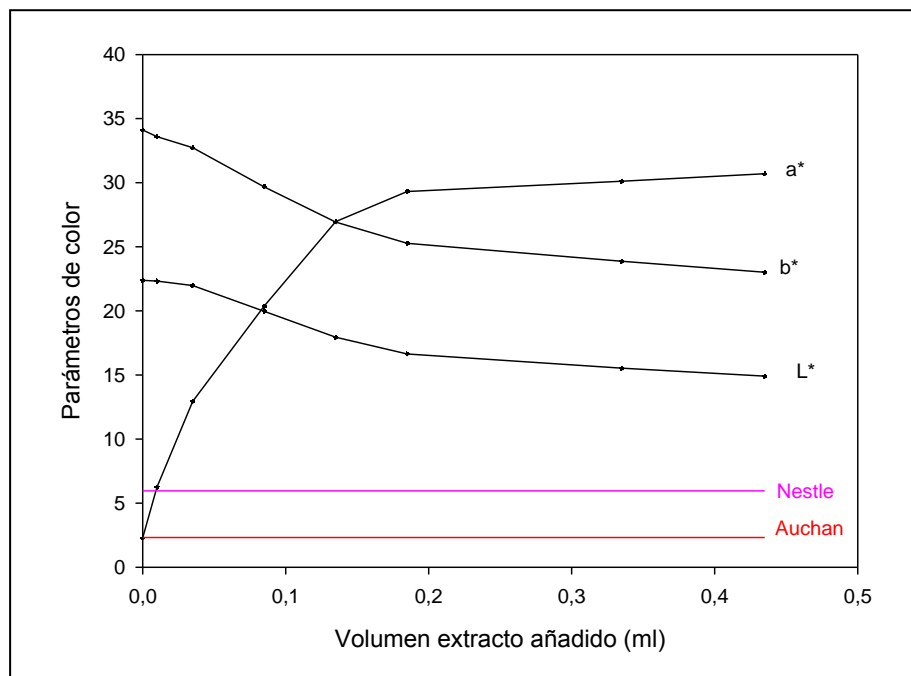


Figura 4.40.

Variación de los parámetros del color en función del volumen de extracto de ficoeritrina adicionado sobre helado de nata y valor del parámetro a^* de los productos comerciales helados de fresa Nestle (—) y Auchan (—).

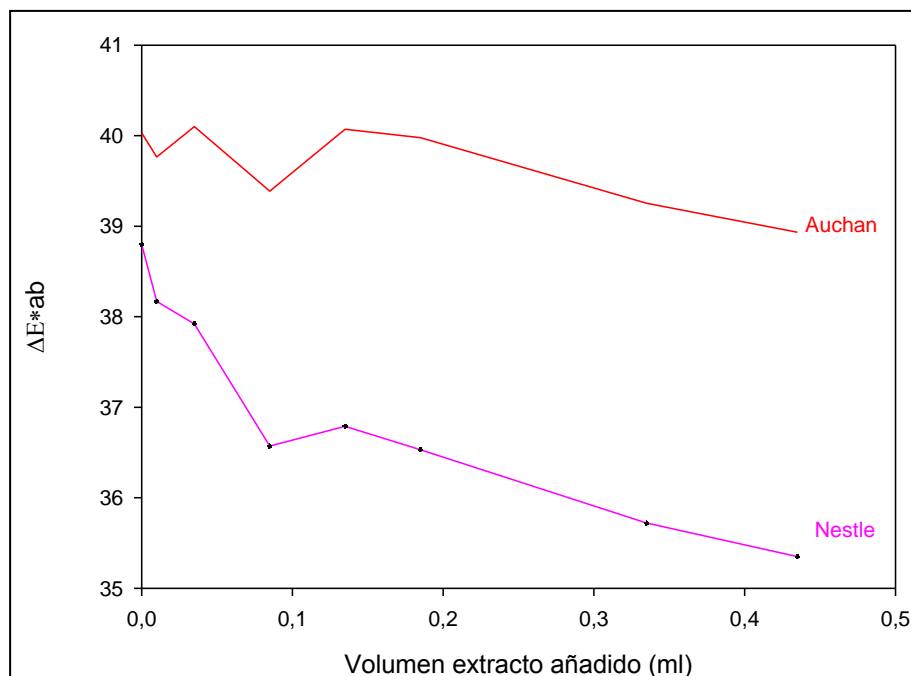


Figura 4.41.

Desviación de los parámetros del color (ΔE^*ab) respecto a los productos comerciales helados de fresa Nestle (—) y Auchan (—), en función del volumen de extracto de *Porphyridium cruentum* añadido sobre helado de nata.



Tabla 4.49.

Volúmenes de extracto rico en ficoeritrina, necesarios adicionar a helado de nata, para intentar reproducir distintas marcas comerciales.

Helado	Parámetro a*	Volumen extracto necesario para reproducir a* (μl)	Volumen extracto para $\Delta E^*_{ab} \leq 5$ (μl)
Fresa Nestle	5'96	10	>435
Fresa Auchan	2'32	0	>435

**Imagen 4.26.**

Detalle de los colores alcanzados por adición de extracto de ficoeritrina procedente de *Porphyridium cruentum* para intentar reproducir los productos comerciales de helados de fresa.

4.4.1.2. Aplicación a otras matrices

4.4.1.2.1. Bebidas isotónicas

A continuación y a título de ejemplo, se muestran los resultados obtenidos para bebidas isotónicas, utilizando el extracto de ficoeritrina adicionado sobre una matriz blanco constituida por Powerade incoloro, para tratar de reproducir el Radical de fresa y el Powerade naranja que se venden comercialmente.

La Tabla 4.50. y las Figuras 4.42. y 4.43. muestran los resultados obtenidos para las muestras coloreadas por adición de extracto rico en ficoeritrina. Se puede apreciar como es difícil obtener el valor del parámetro a^* original de Radical (62'36), precisándose de la adición de aproximadamente 1100 μ l de extracto para llegar a un valor similar. No obstante, el color que se consigue es muy diferente al que se persigue como puede apreciarse en la Imagen 4.27. Se puede observar, que el color generado por adición de extracto colorante está muy próximo al rosa fuerte, y alejado de los colores granate fuerte y anaranjado, que presentan Radical fresa y Powerade naranja respectivamente. Observando la Tabla 4.50., se aprecia como el valor de ΔE^*ab calculado a título de ejemplo respecto a Powerade naranja, disminuye desde el valor inicial (81'20), pero no baja del valor situado alrededor de 66, lo que indica la gran diferencia de colores existentes.

Se puede concluir en este caso, que no es posible reproducir los colores de los productos comerciales ensayados, utilizando el extracto de ficoeritrina, debido fundamentalmente a la diferencia que ya existía de partida entre el color del extracto a utilizar y el de las bebidas isotónicas a reproducir. No obstante el color generado por adición del extracto sobre la matriz incolora, puede catalogarse de similar y podría ser atractivo desde el punto de vista del consumidor.



Tabla 4.50.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de bebidas isotónicas adicionadas con el extracto enriquecido en B-PE de *Porphyridium cruentum*, para intentar reproducir el Powerade naranja. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0'227 \text{ mg B-PE/ml extracto}$.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*_{ab}
ESTANDAR	Radical fresa		42'50	62'36	26'35	67'70	22'91				
ESTÁNDAR	Powerade naranja		61'18	65'14	29'24	71'40	24'17	0	0	0	0
1	Powerade + 0	0	99'95	0'069	-0'028	0'075	337'92	38'77	-65'071	-29'268	81'2032251
2	Powerade + 10	0'01	99'53	0'881	-0'594	1'06	325'98	38'35	-64'259	-29'834	80'560593
3	Powerade + 35	0'035	98'40	3'17	-2'178	3'84	325'62	37'22	-61'97	-31'418	78'8206827
4	Powerade + 85	0'085	96'12	7'82	-5'27	9'43	326'03	34'94	-57'32	-34'51	75'4806339
5	Powerade + 160	0'16	92'89	14'41	-9'53	17'28	326'51	31'71	-50'73	-38'77	71'2893393
6	Powerade + 260	0'26	88'93	22'71	-14'79	27'10	326'91	27'75	-42'43	-44'03	67'1491497
7	Powerade + 360	0'36	85'60	30'14	-18'96	35'61	327'82	24'42	-35	-48'2	64'3783846
8	Powerade + 500	0'5	81'61	38'89	-23'82	45'61	328'52	20'43	-26'25	-53'06	62'6243643
9	Powerade + 650	0'65	77'96	46'98	-28'12	54'76	329'09	16'78	-18'16	-57'36	62'4621774
10	Powerade + 800	0'8	74'86	53'84	-31'47	62'37	329'69	13'68	-11'3	-60'71	63'2497945
11	Powerade + 950	0'95	72'19	59'60	-34'15	68'69	330'18	11'01	-5'54	-63'39	64'5771151
12	Powerade + 1100	1'1	70'12	64'24	-36'11	73'69	330'66	8'94	-0'9	-65'35	65'9648096



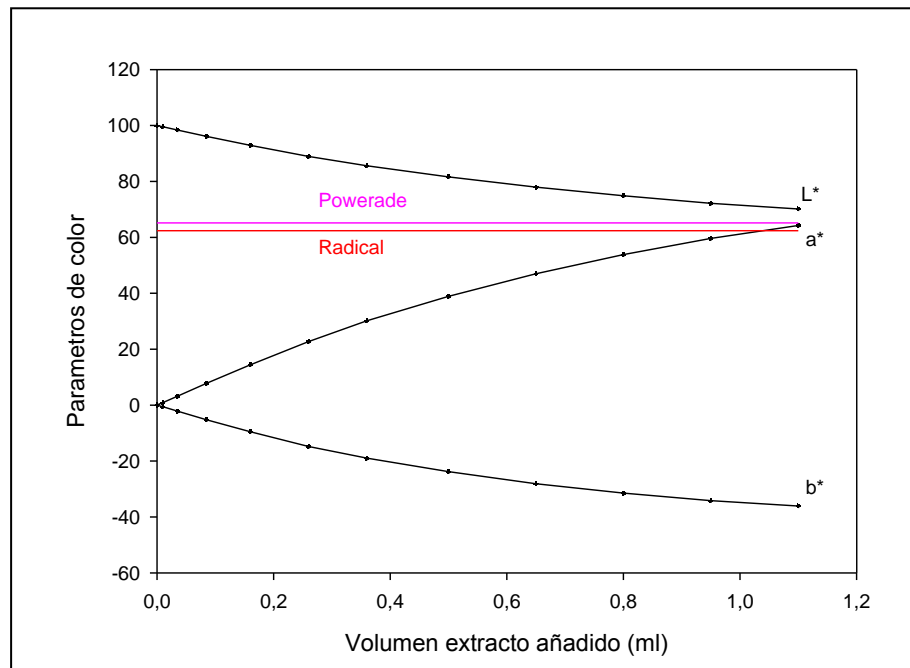


Figura 4.42.

Variación de los parámetros del color en función del volumen de extracto de ficoeritrina adicionado sobre Powerade incoloro y valor del parámetro a^* de los productos comerciales Powerade naranja (—) y Radical de fresa (—).

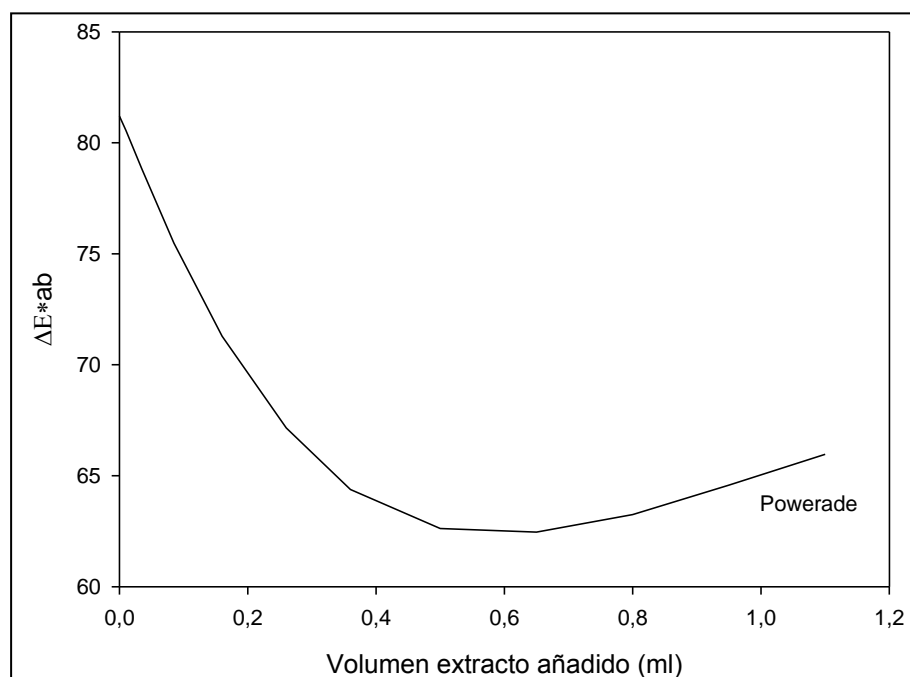


Figura 4.43.

Desviación de los parámetros del color (ΔE^*_{ab}) respecto al producto comercial Powerade naranja, en función del volumen de extracto de *Porphyridium cruentum* añadido sobre Powerade incoloro.





Imagen 4.27.

Detalle de la coloración obtenida por adición del extracto de ficoeritrina sobre la matriz de bebida isotónica para intentar reproducir los productos comerciales Radical y Powerade de fresa.

4.4.1.2.2.-Licores sin alcohol

A continuación, se muestran los resultados obtenidos por adición extracto de ficoeritrina sobre matrices de licores sin alcohol. Así, Se han utilizado tres productos comerciales (Dama de Baza, Tropic Rives y Frutaysol) y se ha tratado de reproducir su color, usando como matriz a la que ir adicionando el extracto de ficoeritrina, licor de manzana incoloro.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.51. y en las Figuras 4.44. y 4.45. Estas Figuras muestran como varían los parámetros colorimétricos trás las correspondientes adiciones de extracto. Así, se puede apreciar que son

necesarios aproximadamente 900 μl de extracto para llegar a reproducir el valor de a^* para el caso de licor Frutaysol.

La Figura 4.45. muestra la variación del parámetro ΔE^*_{ab} y se puede observar la existencia de un valor mínimo situado aproximadamente a $\Delta E^*_{ab} = 24$. Si se sigue adicionando extracto, el parámetro ΔE^*_{ab} comienza a aumentar lo que implica un alejamiento en la similitud con el color de la muestra que se pretende reproducir.

La Imagen 4.28. muestra el color obtenido por adición al estándar de 650 μl de extracto que es la que genera un valor de ΔE^*_{ab} mínimo (24). Aunque el valor de este parámetro sea el mínimo conseguido, todavía está muy lejos del considerado necesario para poder hablar de colores muy similares ($\Delta E^*_{ab} \leq 5$). Se puede apreciar que las diferencias de color entre la muestra generada y las comerciales, son bastante apreciables, siendo con el licor Frutaysol con el que existe una mayor similitud.



Tabla 4.51.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de licores sin alcohol adicionadas con el extracto enriquecido en B-PE de *Porphyridium cruentum*, para intentar reproducir el licor Frutaysol. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0'227 \text{ mg B-PE/ml extracto}$.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*_{ab}
ESTÁNDAR	Dama de Baza		35'74	71'88	61'26	94'44	40'44				
ESTANDAR	Tropic Rives		43'89	75'28	73'09	104'93	44'15				
ESTANDAR	Frutaysol		72'55	47'64	-4'74	47'87	354'32	0	0	0	0
1	Licor manzana + 0	0	100'02	-0'057	0'240	0'246	103'37	27'47	-47'69	4'98	55'26
2	Licor manzana + 10	0'01	99'60	0'627	-0'309	0'699	333'76	27'04	-47'01	4'43	54'42
3	Licor manzana + 35	0'035	98'57	2'689	-1'748	3'207	326'96	26'01	-44'95	2'99	52'02
4	Licor manzana + 85	0'085	96'52	6'275	-4'42	7'674	324'84	23'97	-41'36	0'32	47'81
5	Licor manzana + 185	0'185	92'68	13'40	-9'48	16'41	324'74	20'13	-34'23	-4'74	39'99
6	Licor manzana + 285	0'285	89'20	19'85	-13'91	24'24	324'97	16'64	-27'79	-9'17	33'67
7	Licor manzana + 385	0'385	86'13	25'34	-17'64	30'87	325'15	13'57	-22'29	-12'90	29'12
8	Licor manzana + 500	0'5	82'86	31'50	-21'66	38'23	325'48	10'31	-16'13	-16'92	25'55
9	Licor manzana + 650	0'65	79'09	38'97	-26'13	46'92	326'15	6'54	-8'66	-21'40	24'00
10	Licor manzana + 800	0'8	75'95	44'86	-29'71	53'81	326'48	3'39	-2'77	-24'98	25'36
11	Licor manzana + 900	0'9	73'10	50'13	-32'84	59'93	326'77	0'55	2'49	-28'10	28'22
12	Licor manzana + 1100	1'1	70'62	54'96	-35'26	65'29	327'31	-1'93	7'32	-30'52	31'45
13	Licor manzana + 1350	1'35	66'95	61'68	-38'79	72'86	327'83	-5'59	14'04	-34'05	37'26



Tabla 4.51.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de licores sin alcohol adicionadas con el extracto enriquecido en B-PE de *Porphyridium cruentum*, para intentar reproducir el licor Frutaysol. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0'227 \text{ mg B-PE/ ml extracto}$.

(Continuación Tabla 4.51.)

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*_{ab}
14	Licor manzana + 1600	1'6	64'04	66'94	-41'34	78'67	328'29	-8'51	19'29	-36'61	42'25
15	Licor manzana + 1850	1'85	61'58	71'32	-43'25	83'41	328'76	-10'98	23'68	-38'517	46'53
16	Licor manzana + 2100	2'1	59'48	74'79	-44'688	87'11	329'15	-13'07	27'15	-39'931	50'02
17	Licor manzana + 2500	2'5	56'71	78'89	-46'3161	91'48	329'58	-15'84	31'26	-41'578	54'38



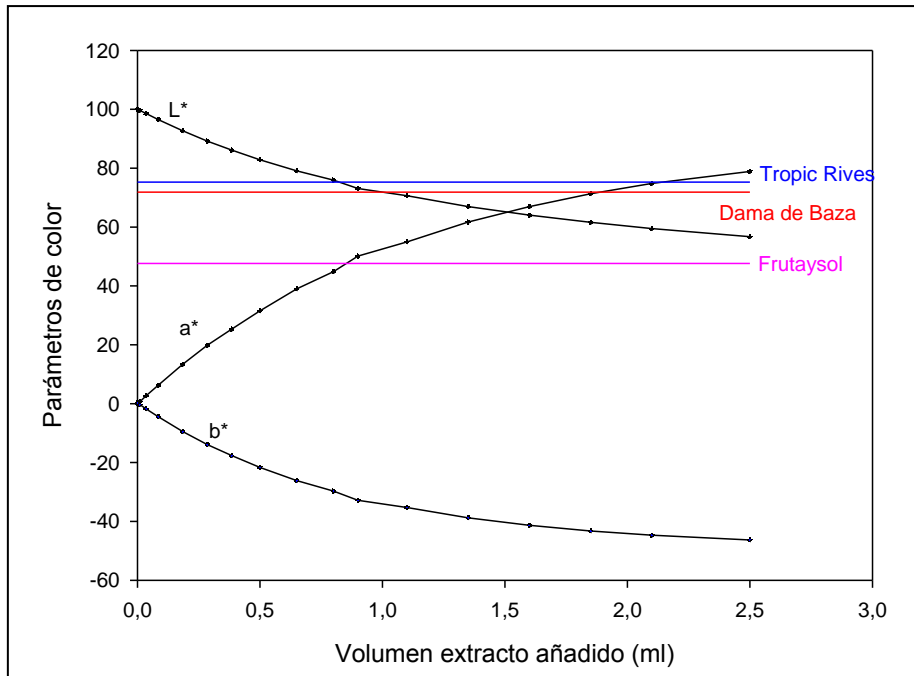


Figura 4.44.

Variación de los parámetros del color en función del volumen de extracto de ficoeritrina adicionado sobre licor de manzana y valor del parámetro a^* de los productos comerciales Licor Frutaysol (—), Dama de Baza (—) y Tropic Rives (—).

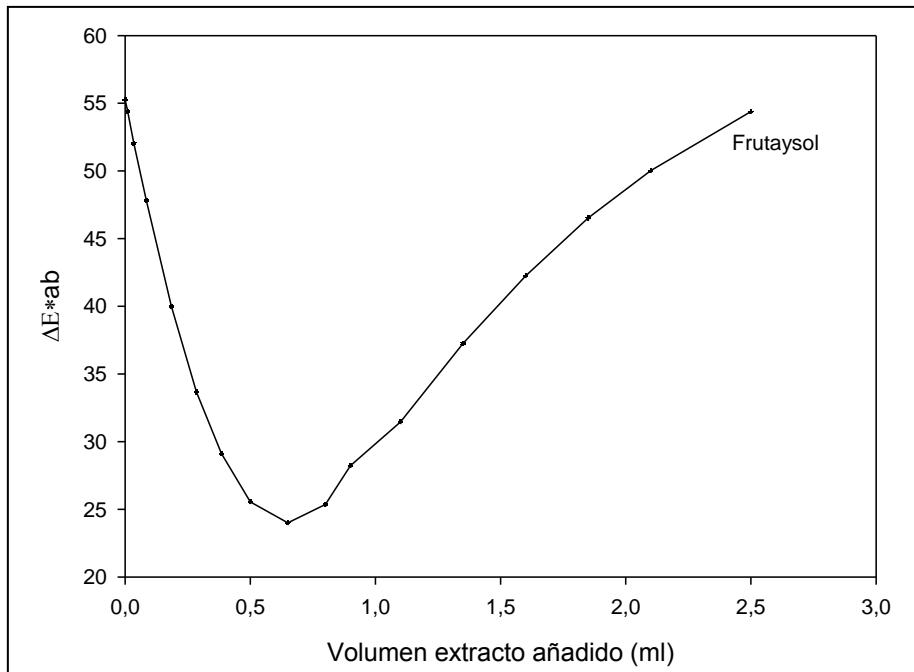


Figura 4.45.

Desviación de los parámetros del color (ΔE^*ab) respecto al producto comercial licor Frutaysol, en función del volumen de extracto de *Porphyridium cruentum* añadido sobre licor de manzana.



Imagen 4.28.

Detalle de los colores alcanzados por adición de extracto de ficoeritrina procedente de *Porphyridium cruentum* para intentar reproducir los productos comerciales de licores sin alcohol de diferentes tonalidades.

4.4.1.2.3.-Gaseosas

A continuación, se muestran los resultados obtenidos utilizando bebidas carbonatadas. En este caso, se ha utilizado gaseosa blanca de la marca La Inesperada, como matriz y se ha tratado de conseguir un producto de color similar al de las bebidas gaseosas La Inesperada, Clipper y Schweppes.

La Tabla 4.52. y las Figuras 4.46. y 4.47. muestran los resultados obtenidos utilizando extracto de ficoeritrinas, para los ensayos de coloración de una matriz de gaseosa blanca.

A título de ejemplo, se puede apreciar que son necesarios aproximadamente 1900 μl de extracto para llegar a reproducir el valor de a^* correspondiente a La Inesperada (Figura 4.46.).

Por otro lado, la Figura 4.47. muestra la variación del parámetro ΔE^*_{ab} y se puede observar la existencia de un valor mínimo situado aproximadamente a $\Delta E^*_{ab} = 49'40$. Si se sigue adicionando extracto, el parámetro ΔE^*_{ab} comienza a aumentar lo que implica un alejamiento en la similitud con el color de la muestra que se pretende reproducir.

La Imagen 4.29. muestra el color obtenido por adición al estándar de 1000 μl de extracto que es la que genera un valor de ΔE^*_{ab} mínimo (49'40). Aunque el valor de este parámetro sea el mínimo conseguido, todavía está muy lejos del considerado necesario para poder hablar de colores similares ($\Delta E^*_{ab} \leq 5$).



Tabla 4.52.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de gaseosas adicionadas con el extracto enriquecido en B-PE de *Porphyridium cruentum*, para intentar reproducir la gaseosa de fresa La Inesperada. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0'227 \text{ mg B-PE/ml extracto}$.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*ab
	ESTÁNDAR Bitterkas		63'16	62'61	14'66	64'30	13'18				
	ESTANDAR Clipper		61'82	42'86	70'66	82'64	58'76				
	ESTANDAR Schweppes		70'80	32'78	12'66	35'14	21'11				
	ESTANDAR La Inesperada		58'73	76'16	9'90	76'80	7'41	0	0	0	0
1	Gaseosa + 0	0	99'54	0'078	0'028	0'083	19'43	40'81	-76'082	-9'872	86'8986951
2	Gaseosa + 10	0'01	99'52	0'647	-0'32	0'71	333'82	40'79	-75'513	-10'22	86'4319713
3	Gaseosa + 35	0'035	98'75	2'23	-1'37	2'62	328'47	40'02	-73'93	-11'27	84'8189731
4	Gaseosa + 85	0'085	96'58	6'55	-4'29	7'83	326'77	37'85	-69'61	-14'19	80'4955322
5	Gaseosa + 135	0'135	94'52	10'72	-7'05	12'83	326'69	35'79	-65'44	-16'95	76'489347
6	Gaseosa + 185	0'185	92'64	14'52	-9'45	17'32	326'95	33'91	-61'64	-19'35	72'9643762
7	Gaseosa + 260	0'260	89'95	19'91	-13'02	23'79	326'83	31'22	-56'25	-22'92	68'2940503
8	Gaseosa + 360	0'360	86'58	27'00	-17'32	32'08	327'32	27'85	-49'16	-27'22	62'7156799
9	Gaseosa + 500	0'500	82'72	35'20	-22'09	41'56	327'88	23'99	-40'96	-31'99	57'241609
10	Gaseosa + 700	0'700	78'04	45'19	-27'58	52'94	328'61	19'31	-30'97	-37'48	52'3141224
11	Gaseosa + 1000	1	72'21	57'74	-33'92	66'97	329'56	13'48	-18'42	-43'82	49'4084932



Tabla 4.52.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de gaseosas adicionadas con el extracto enriquecido en B-PE de *Porphyridium cruentum*, para intentar reproducir la gaseosa de fresa La Inesperada. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0'227 \text{ mg B-PE/ ml extracto}$.
(Continuación Tabla 4.52.)

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*_{ab}
12	Gaseosa + 1300	1'3	68'06	66'61	-37'71	76'55	330'48	9'33	-9'55	-47'61	49'4465722
13	Gaseosa + 1600	1'6	65'01	72'83	-39'95	83'07	331'25	6'28	-3'33	-49'85	50'3542431
14	Gaseosa + 1900	1'9	62'69	76'77	-40'90	86'98	331'95	3'96	0'61	-50'8	50'9577639
15	Gaseosa + 2200	2'2	60'74	80'09	-41'65	90'27	332'52	2'01	3'93	-51'55	51'7386461



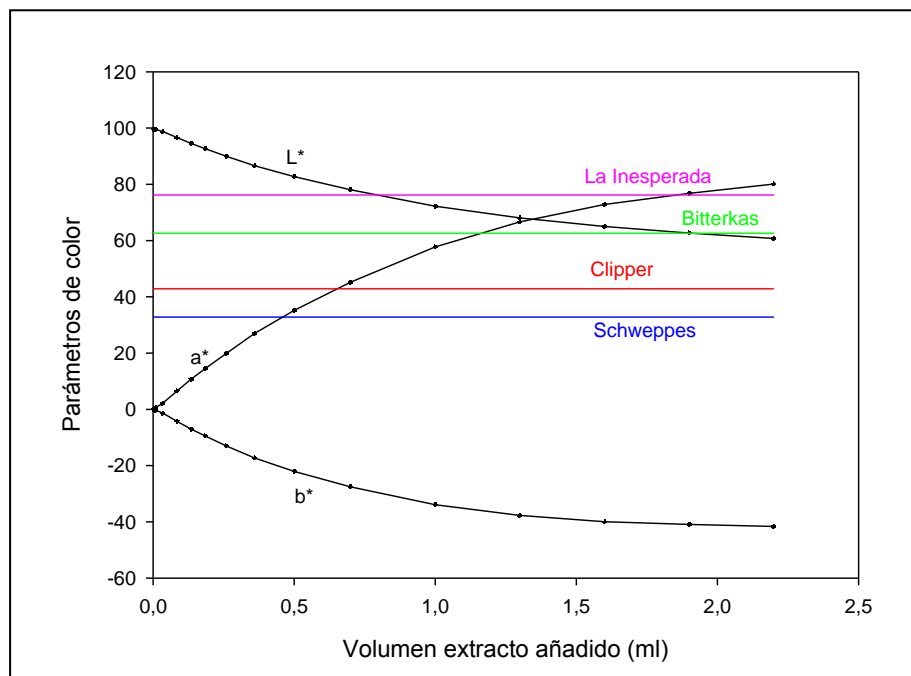


Figura 4.46.

Variación de los parámetros del color en función del volumen de extracto de ficoeritrina adicionado sobre gaseosa incolora y valor del parámetro a^* de los productos comerciales Gaseosa de fresa La Inesperada (—), Clipper (—), Schweppes (—) y Bitterkas (—).

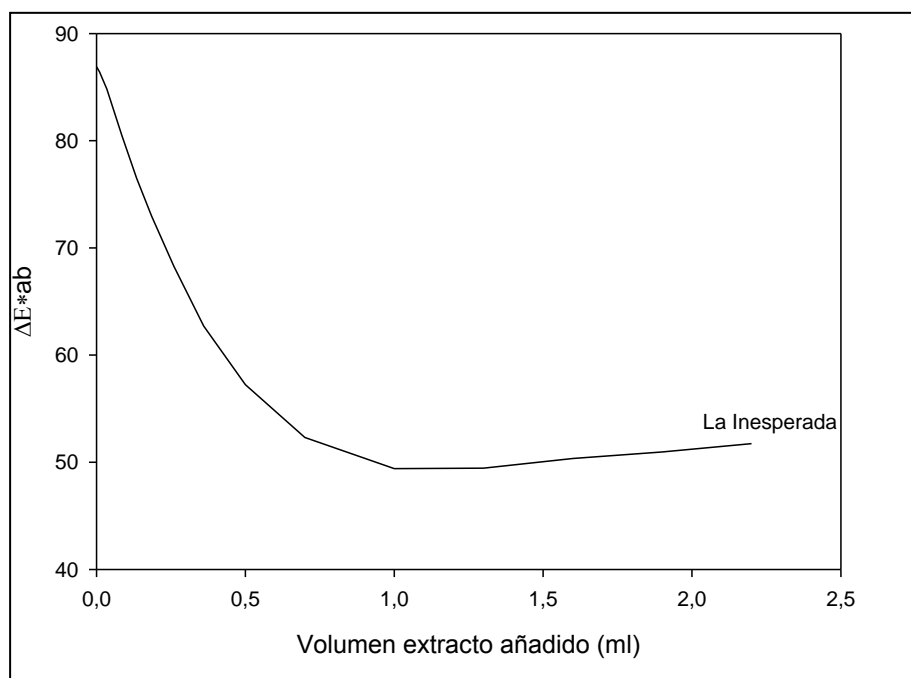


Figura 4.47.

Desviación de los parámetros del color (ΔE^*ab) respecto al producto comercial gaseosa de fresa La Inesperada, en función del volumen de extracto de *Porphyridium cruentum* añadido sobre gaseosa incolora.





Imagen 4.29.

Detalle de los colores alcanzados por adición de extracto de ficoeritrinas procedente de *Porphyridium cruentum* para intentar reproducir los productos comerciales de gaseosas de tonalidades rosas.

4.4.1.2.4.-Mostos

Por ultimo, se muestran los resultados obtenidos utilizando mostos. En este caso, se ha utilizado mosto blanco de la marca Greip como matriz y se ha tratado de conseguir un producto de color similar al del mosto tinto de las marcas Greip, Castillo de Salobreña y Don Simón.

La Tabla 4.53. y las Figuras 4.48. y 4.49. muestran los resultados obtenidos utilizando extracto de ficoeritrinas, para los ensayos de coloración de una matriz de mosto blanco.

A título de ejemplo, se puede apreciar que son necesarios aproximadamente unos 1200 μl de extracto para llegar a reproducir el valor de a^* del mosto marca Greip (Figura 4.48.).

Finalmente, la Figura 4.49. muestra la variación del parámetro ΔE^*_{ab} y se puede observar la existencia de un valor mínimo situado aproximadamente a $\Delta E^*_{ab} = 49$. Si se sigue adicionando extracto, el parámetro ΔE^*_{ab} comienza a aumentar lo que implica un alejamiento en la similitud con el color de la muestra que se pretende reproducir.

La Imagen 4.30. muestra el color obtenido por adición al estándar de 700 μl de extracto que es la que genera un valor de ΔE^*_{ab} mínimo (49). Al igual que ocurría con las matrices ensayadas anteriormente aunque el valor de este parámetro sea el mínimo conseguido, todavía está muy lejos del considerado necesario para poder hablar de colores muy similares ($\Delta E^*_{ab} \leq 5$).



Tabla 4.53.

Caracterización colorimétrica correspondiente a las muestras de mostos adicionadas con el extracto enriquecido en B-PE de *Porphyridium cruentum*, para intentar reproducir el mosto Greip tinto. $[B-PE]_{\text{extracto}} = 0'227 \text{ mg B-PE/ml extracto}$.

Muestra n°	Nombre	Volumen Adicionado (ml)	L*	a*	b*	C*	h	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*_{ab}
ESTÁNDAR	Greip tinto		46'77	58'78	23'95	63'47	22'17	0	0	0	0
ESTANDAR	Castillo de salobreña tinto		33'00	57'07	55'46	79'58	44'18				
ESTANDAR	Don Simon tinto		51'23	45'70	41'71	61'87	42'39				
1	Mosto blanco Greip + 0	0	96'54	-1'27	14'59	14'65	94'97	49'77	-60'05	-9'36	78'5535804
2	Mosto blanco + 10	0'01	96'03	-0'35	13'83	13'83	91'46	49'26	-59'13	-10'12	77'6229277
3	Mosto blanco + 35	0'035	94'83	1'78	12'21	12'34	81'70	48'06	-57	-11'74	75'4757656
4	Mosto blanco + 85	0'085	92'41	6	9'04	10'85	56'42	45'64	-52'78	-14'91	71'3515669
5	Mosto blanco + 135	0'135	90'17	9'85	6'19	11'64	32'16	43'4	-48'93	-17'76	67'7725793
6	Mosto blanco + 185	0'185	87'89	13'71	3'32	14'14	13'61	41'12	-45'07	-20'63	64'403076
7	Mosto blanco + 260	0'260	84'63	19'02	-0'47	19'03	358'57	37'86	-39'76	-24'42	60'0880487
8	Mosto blanco + 360	0'360	80'81	25'23	-4'76	25'68	349'31	34'04	-33'55	-28'71	55'7547146
9	Mosto blanco + 500	0'500	76'61	32'59	-9'40	33'92	343'91	29'84	-26'19	-33'35	51'8513664
10	Mosto blanco + 700	0'700	71'41	42'09	-14'99	44'68	340'39	24'64	-16'69	-38'94	49'0102979
11	Mosto blanco + 900	0'900	67'39	49'74	-19'15	53'30	338'93	20'62	-9'04	-43'1	48'6262892
12	Mosto blanco + 1200	1'2	62'85	58'67	-23'61	63'24	338'08	16'08	-0'11	-47'56	50'2049012
13	Mosto blanco + 2200	2'2	54'67	73'57	-28'88	79'04	338'56	7'9	14'79	-52'83	55'4270963



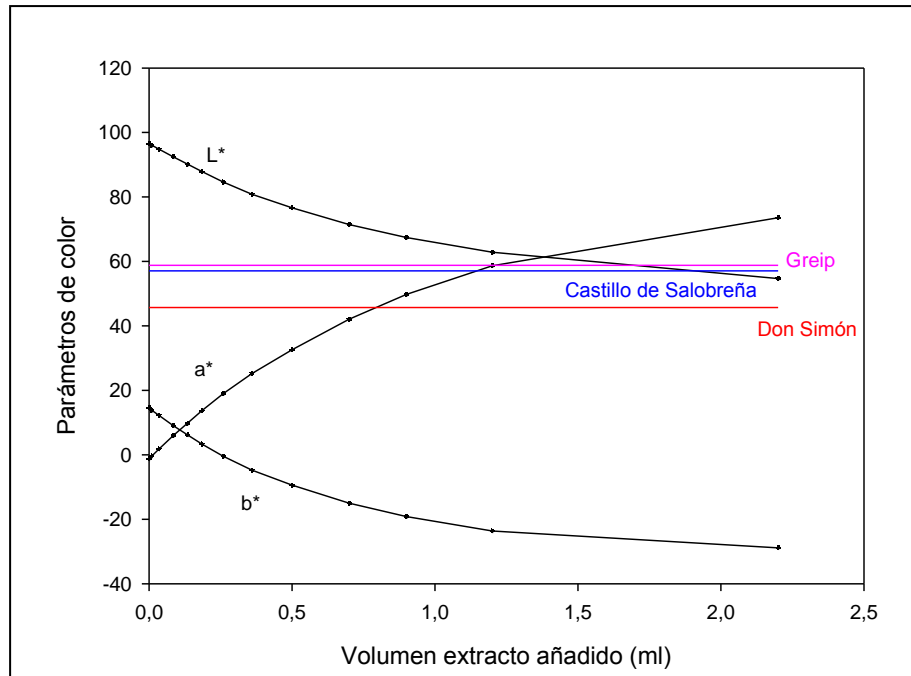


Figura 4.48.

Variación de los parámetros del color en función del volumen de extracto de ficoeritrina adicionado sobre mosto incolor y valor del parámetro a^* de los productos comerciales Mosto tinto Greip (—), Don Simón (—) y Castillo de Salobreña(—).

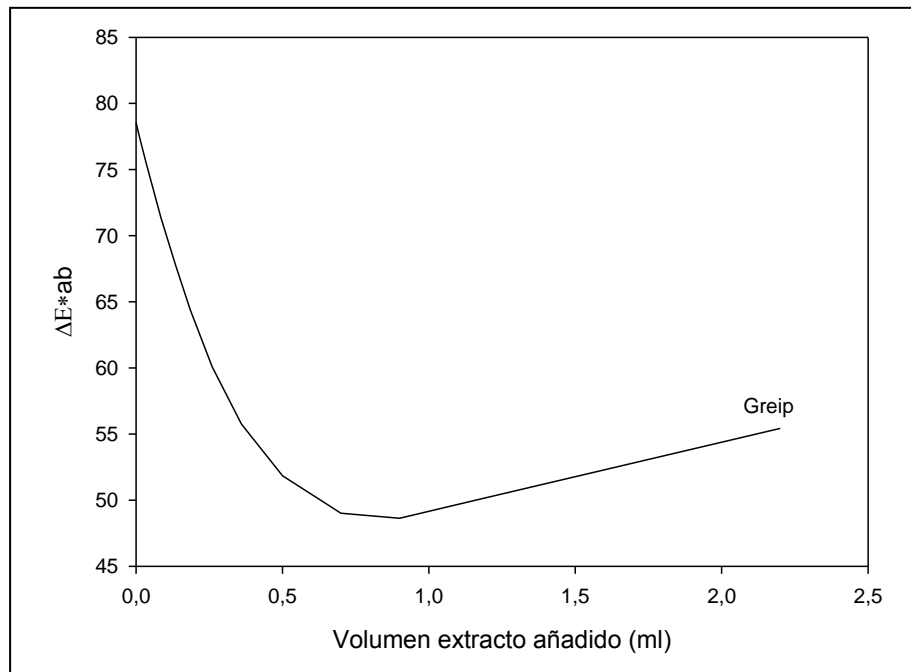


Figura 4.49.

Desviación de los parámetros del color (ΔE^*ab) respecto al producto comercial mosto tinto Greip, en función del volumen de extracto de *Porphyridium cruentum* añadido sobre mosto incoloro.



Imagen 4.30.

Detalle de los colores alcanzados por adición de extracto de ficoeritrinas procedente de *Porphyridium cruentum* para intentar reproducir los productos comerciales de mostos tintos.

4.4.2.-Ensayos de estabilidad

Se han llevado a cabo ensayos de estabilidad del color de las diferentes matrices comerciales aditivadas con el extracto de ficoeritrina (Figuras 4.50. a 4.54.). Del análisis de los resultados se observa como el color del helado es muy estable produciéndose desviaciones inferiores a 0'8 unidades de ΔE^*_{ab} , mientras que el resto de matrices ensayadas muestran estabilidades menores.

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.

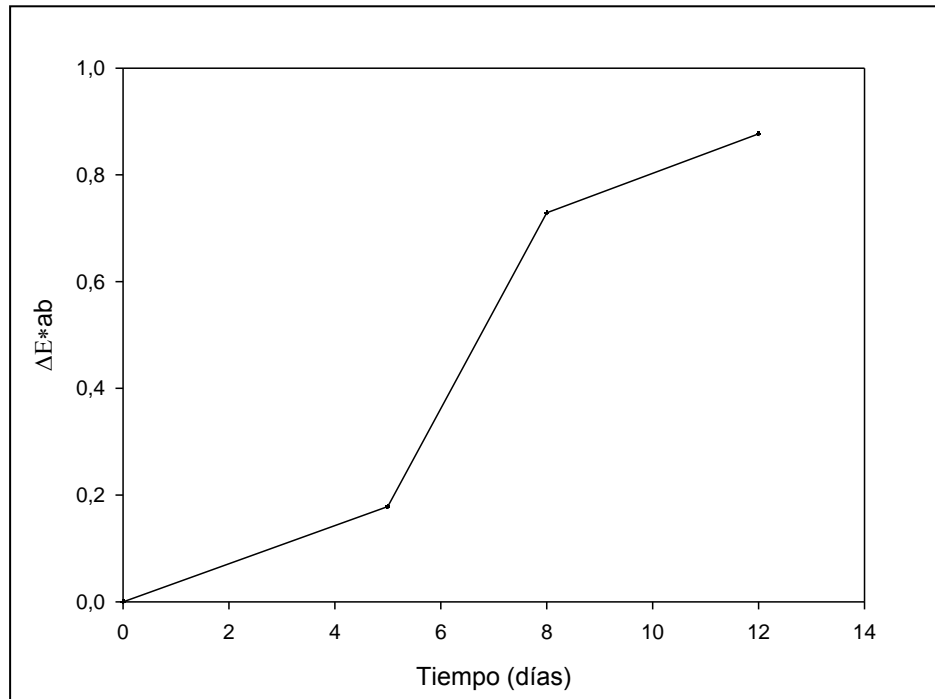
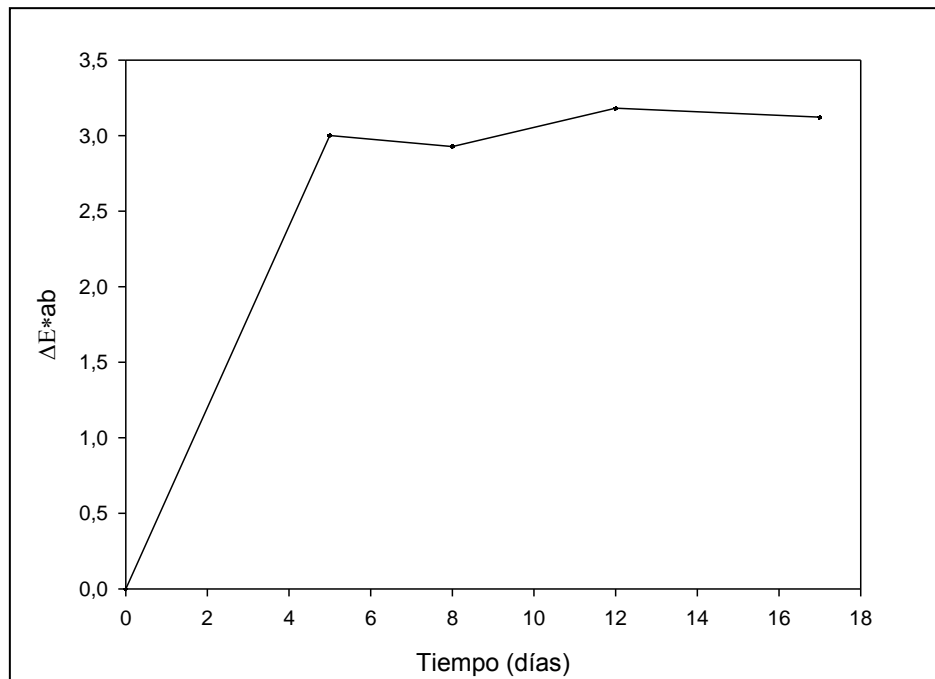


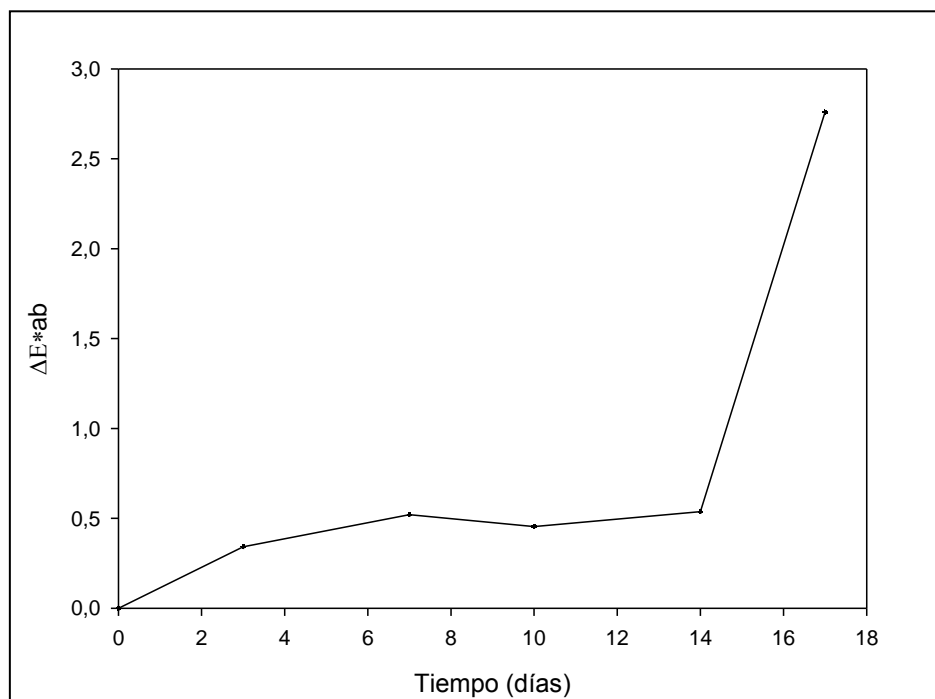
Figura 4.50.

Estabilidad del color de la muestra de matriz de helado coloreada con extracto de B-PE en función del tiempo.

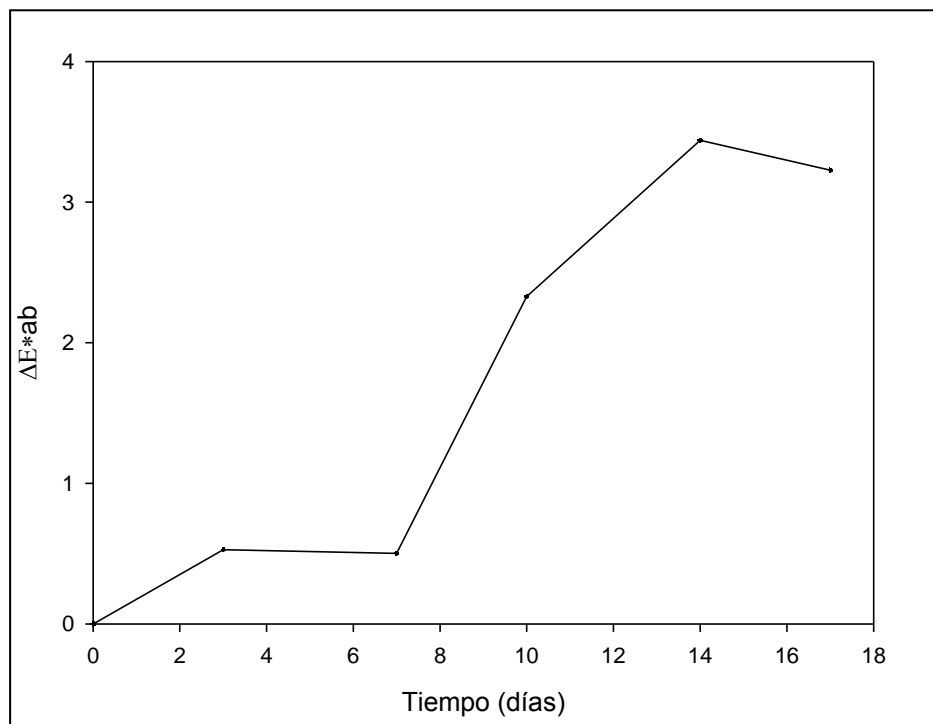
En orden de estabilidad decreciente, tras los helados estarían, yogures y yogures líquidos, batidos y por último las bebidas isotónicas ensayadas.

**Figura 4.51.**

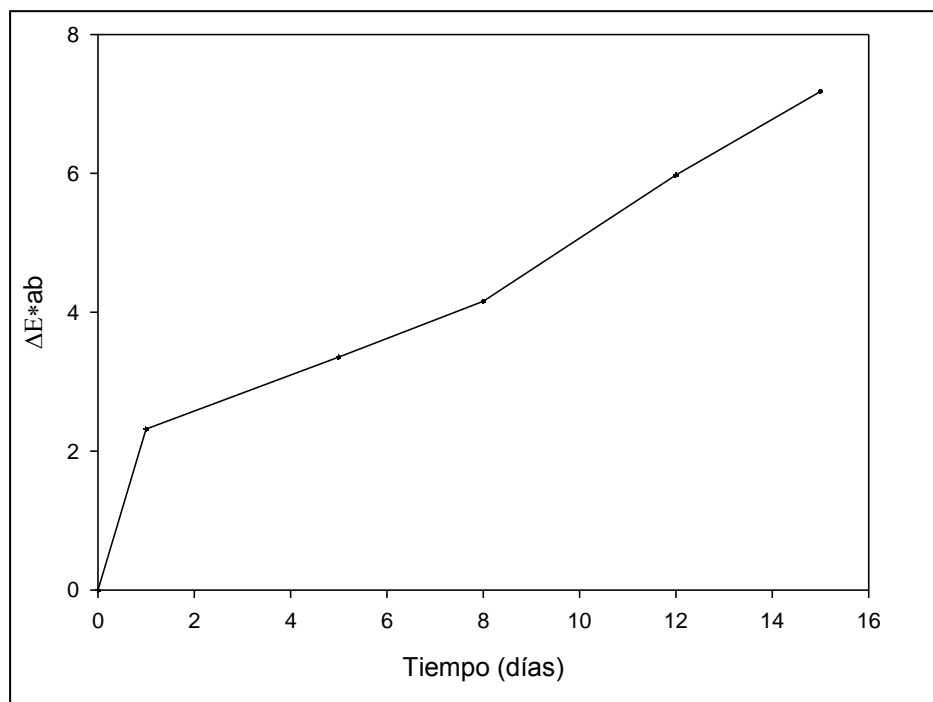
Estabilidad del color de la muestra de matriz de yogur coloreada con extracto de B-PE en función del tiempo.

**Figura 4.52.**

Estabilidad del color de la muestra de matriz de yogur líquido coloreada con extracto de B-PE en función del tiempo.

**Figura 4.53.**

Estabilidad del color de las muestras de matriz de batidos coloreadas con extracto de B-PE en función del tiempo.

**Figura 4.54.**

Estabilidad del color de las muestra de matriz de bebida isotónica coloreada con extracto de B-PE en función del tiempo.



4.4.3.-Factores de tinción

Una vez comprobada la utilidad del extracto de ficoeritrina como colorante, se ha calculado los factores de tinción necesarios para obtener muestras comerciales atractivas por adición del extracto sobre las matrices reales ensayadas. Así, se han calculado estos factores, como la cantidad de ficoeritrina, en mg de B-PE 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) (Tablas 4.54. y 4.55.).

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 4.54.

Factores de tinción para las diferentes matrices lácteas ensayadas.

Muestra	Factor de Tinción Experimental (mg B-PE/ml muestra)			Factor de Tinción Aceptable (mg B-PE/ml muestra)		
	ΔE^{*ab}	Volumen	Factor*	Volumen	Factor	
		(μ l)		(μ l)		
Batidos	Fresa Pascual	5'47	700	0'0133	199	0'0037
	Fresa Puleva	5'17	1300	0'0247		
	Fresa Covap	5'43	1000	0'0190		
Yogures	Fresa Danone	5'51	175	0'0033	50	0'0009
	Fresa Clesa	5'00	125	0'0023		
	Fresa Auchan	4'58	200	0'0038		
	Macedonia Clesa	2'89	50	0'0009		
Yogures líquidos	Fresa Actimel	-	>350	-	50	0'0009
	Fresa Clesa	5'45	350	0'0066		
	Fresa Kaiku	4'99	275	0'0052		
	Fresa Auchan	-	>350	-		
Helados	Fresa Nestle	-	>435	-	85	0'0011
	Fresa Auchan	-	>435	-		

a*) Ejemplo de cálculo de factor de tinción experimental para muestras líquidas.

Batido de fresa Pascual:

$$\frac{0'7ml \cdot 0'227mg \text{ B-PE/ml extracto}}{11'9ml \text{ muestra}} = 0'0133mg \text{ B-PE/ml muestra}$$

b*) Ejemplo de cálculo de factor de tinción experimental para muestras semisólidas (helados y yogures).

Yogur de fresa Danone:

$$\frac{0'175ml \cdot 0'227mg \text{ B-PE/ml extracto}}{\frac{12'83g}{1'0778g/ml \text{ muestra}}} = 0'0033mg \text{ B-PE/ml muestra}$$



Tabla 4.55.

Factores de tinción para el resto de matrices ensayadas.

Muestra	Factor de Tinción Experimental (mg B-PE/ml muestra)			Factor de Tinción Aceptable (mg B-PE/ml muestra)	
	ΔE^{*ab}	Volumen	Factor	Volumen	Factor
		(μ l)		(μ l)	
Powerade naranja	-	>1100	-	1100	0'0209
Licor Frutaysol	-	>2500	-	1500	0'2861
Gaseosa La inesperada	-	>2200	-	50	0'0009
Mosto tinto Don Simón	-	>2200	-	262	0'0049

Puede apreciarse que los menores factores de tinción experimental se encuentran en los yogures normales, seguidos de los yogures líquidos y los batidos. No obstante, los valores de factores de tinción tanto reales como aceptables, son suficientemente pequeños, como para pensar en la potencialidad del extracto de ficoeritrina como colorante, pues permitiría utilizar pequeñas cantidades de extracto para colorear grandes volúmenes de muestra.

Respecto a las matrices no lácteas, los resultados no son satisfactorios en cuanto a la reproducción de los productos comerciales, aunque se generan colores que también podrían ser considerados atractivos.

A la vista de los resultados, puede concluirse que el extracto de ficoeritrina procedente de CALE, podría considerarse potencial colorante para alimentación, cuya utilización sería muy interesante dado el carácter natural de dicha macromolécula y la recomendación de la EFSA (European Food Safety Agency) de investigar en la obtención de nuevos colorantes de tipo natural, frente a los



mayoritariamente utilizados (colorantes sintéticos).





5. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, 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 ficoeritrina utilizando un proceso que consta de tres etapas: tratamientos previos, cromatografía de adsorción en lecho expandido y cromatografía de intercambio iónico en lecho empaquetado o convencional.
- 2) Se ha evaluado el contenido total de biliproteínas en la biomasa microalgal de la especie *Porphyridium cruentum*, siendo éste de 3'1%.
- 3) La etapa de tratamientos previos a la que se ha sometido a 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 acetato pH 5'5 50mM.
- 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 ficoeritrina.
- 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: 1'068 mP y relación (carga proteica/ml de adsorbente) igual a 0'88 mg/ml para el extracto de ficoeritrina.
- 6) Se ha realizado el escalado del proceso de purificación de ficoeritrina a través de CALE empleando columnas de diámetros 1'5, 2'5, 4, 6 y 9 cm obteniéndose rendimientos de recuperación en torno al 78%. Además, se ha conseguido desarrollar una planta piloto utilizando una columna de 15 cm, pudiendo obtener



cantidades de ficoeritrina del orden de gramos, lo que permitiría el desarrollo de ciertas aplicaciones a nivel industrial.

7) Se ha conseguido obtener ficoeritrina ultrapura a través de cromatografía de intercambio iónico, utilizando como matriz cromatográfica DE-52, con un rendimiento de recuperación en B-PE del 69'6%.

8) El rendimiento de recuperación en ficoeritrina del proceso global de purificación constituido por las tres etapas, ha sido del 54%.

9) La cantidad que se obtiene de B-PE ultrapura respecto a la cantidad de biomasa microalgal de partida es del 1'4%.

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 la ficoeritrina frente al pH, la temperatura y el tiempo.

12) Se han obtenido a nivel preparativo y caracterizado las subunidades α , β y γ constituyentes de B-ficoeritrina. Así, se ha utilizado RP-HPLC para la obtención y medidas espectroscópicas para la caracterización.

13) Se ha ensayado la capacidad colorante del extracto enriquecido en ficoeritrina, en diferentes matrices. Los mejores resultados se han obtenido utilizando matrices lácteas tales como yogures, batidos y helados.

14) Los coeficientes de tinción calculados en los ensayos en diferentes matrices, han sido lo suficientemente pequeños como para apostar por la potencialidad de la ficoeritrina como colorante natural alternativo a los compuestos sintéticos 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.
- Akhilender, K., Sarada, R., Manoj, G., Khan, M.Y., Mahadeva, M., Viswanatha, S., Narasimha, M., Ravinshankar, G.A. and Srinivas, L. (1999). *Food Biotechnology*, 13; 51-66.
- 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.
- 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. (1998). *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.
- Bermejo, R., Ramos, A., Cuesta, R., Galvez, N. y Dominguez-Vera, J.M. (2011a). 5th International Conference on Advanced Computational Engineering and Experimenting (ACE-X 2011) (Vilanoma, Portugal). Libro de resúmenes, 168-169.
- Bermejo, R., Ramos, A., Cuesta, R., Galvez, N. y Dominguez-Vera, J.M. (2011b). III Jornadas Ibéricas de Fotoquímica (Granada). Libro de resúmenes 63-64.
- 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.
- Bhat, V.B. y Madyastha, K.M. (2000). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275, 20-25.
- 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., 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., Ación, 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'Agnolo, 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. (2010). *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.
- 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.
- 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, Amstedenam.
- Duval, J.C., Lichtlè, C. y Lemoine, Y. (1987). *Biochimica et Biophysica Acta*, 894, 76-90.

E

- European Food Safety Authority, (2011). www.efsa.europa.eu.
- 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

- 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.
- 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.
- 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.



- 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). *Analytical Biochemistry*, 136, 491-492.



- González, C.V., Ación, 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.
- Guard Friar, D., Hanlik, C. and MacColl, R. (1989). *Biochimica et Biophysica Acta*; 973;118-123.
- 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.
- 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



- 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.
- Kirk, E., Hoffman, N. and Grossman, R. (1993). *The Journal of Biological Chemistry*; 268; 16208-16215
- 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.
- Koller, K., and Wehrmeyer, W. (1975). *Archives of Microbiology*.; 104; 255-261
- Konica Minolta (2007), Precise color communication, 9242-4830-92, <http://konicaminolta.com/instruments/about/network>.
- Koptera, Z.P. (1970). *Microbiologiya Zhournal (Kiev)*, 32, 355-360.
- Kronick, M.N. y Grossman, P.D. (1983). *Clinical Chemistry*, 29, 1582-1586.

L

- Laemmli, U.K., (1970). *Nature*, 227, 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.
- 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.
- 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.
- 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.



- 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.
- 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 Biophysica 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.
- 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.
- Protein Data Bank (PDB). <http://www.pdb.org>.
- 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.
- Ramos, A., Ación, F.G., Fernández-Sevilla, J.M., González, C.V. y Bermejo, R. (2010). *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, 85, 783-792.
- Ramos, A., Ación, F.G., Fernández-Sevilla, J.M., González, C.V. y Bermejo, R. (2011). *Journal of chromatography B*, 879, 511-519.
- Reboloso, M.M., Acien, G.G., Sánchez, J.A. y Guil, J.L. (2000). *Food Chemistry*, 70, 345-353.
- Redlinger, T. and Gantt, E. (1981). *Plant Physiology*; 68; 1375-1379
- 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.
- Ramirez, 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.
- 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, 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*.
- 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., Mussgnug, 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.

U

- Uniprot KB: <http://www.uniprot.org>.

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.



W

- 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.
- 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.
- Zhao, J., Yao, S. y Lin, D. (2009). *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 17, 678-687.
- 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.





7. ANEXOS



7.1. ANEXO I

Tabla 4.23.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de aplicación y lavado del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 9 cm.

APLICACIÓN Y LAVADO	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅
	1	179	89'5	0'021
	2	180	769	0'026
	3	179	1448'5	0'028
	4	178	2127	0'031
	5	180	2806	0'032
	6	180	3486	0'033
	7	180	4166	0'035
	8	179	4845'5	0'032
	9	178	5524	0'035
	10	180	6203	0'034
	11	179	6882'5	0'034
	12	179	7561'5	0'038
	13	180	8241	0'040
	14	178	8920	0'038
	15	180	9599	0'036
	16	180	10279	0'039
	17	180	10959	0'042
	18	179	11638'5	0'040
	19	180	12318	0'042
	20	179	12997'5	0'041
	21	179	13676'5	0'041
	22	179	14355'5	0'043
	23	179	15034'5	0'042
24	180	15714	0'042	



Tabla 4.23.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de aplicación y lavado del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 9 cm.

(Continuación Tabla 4.23.)

APLICACIÓN Y LAVADO	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅
	25	179	16393'5	0'043
	26	180	17752	0'043
	27	180	19111	0'043
	28	179	24546'5	0'045
	29	179	25225'5	0'045
	30	179	26584'5	0'046
	31	178	27263	0'043
	32	180	27942	0'047
	33	179	28621'5	0'045
	34	180	29301	0'046
	35	180	29981	0'047
	36	179	30660'5	0'046
	37	180	32021	0'045
	38	179	32700'5	0'046
	39	179	35418	0'048
	40	181	36098	0'049
	41	179	36778	0'047
	42	180	37457'5	0'048
	43	180	38137'5	0'047
	44	179	43574	0'049
	45	180	44253'5	0'050
	46	180	44933'5	0'046
	47	180	45613'5	0'047
48	179	46293	0'049	



Tabla 4.23.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de aplicación y lavado del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 9 cm.

(Continuación Tabla 4.23.)

APLICACIÓN Y LAVADO	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅
	49	179	46972	0'047
	50	180	47651'5	0'045
	51	180	49368'5	0'047
	52	179	50447'5	0'047
	53	180	50807	0'047
	54	180	51167	0'047
	55	181	51527'5	0'037
	56	179	51887'5	0'027
	57	180	52247	0'021
	58	180	52607	0'016
	59	179	52966'5	0'013
	60	180	53326	0'010
	61	180	53686	0'010
	62	178	54045	0'008
	63	179	54403'5	0'007
	64	178	54762	0'007
	65	180	55121	0'006
	66	180	55481	0'006
	67	178	55840	0'006
	68	179	56198'5	0'005
	69	179	56557'5	0'006
	70	178	56916	0'005
	71	179	57274'5	0'005
72	179	57633'5	0'005	



Tabla 4.23.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de aplicación y lavado del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 9 cm.

(Continuación Tabla 4.23.)

APLICACIÓN Y LAVADO	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅
	73	179	57992'5	0'005
	74	179	58351'5	0'005
	75	179	58710'5	0'005
	76	179	59069'5	0'005
	77	206	59442	0'004
	78	178	59814	0'004
	79	178	60172	0'004
	80	179	60530'5	0'005
	81	179	60889'5	0'005
	82	180	61569	0'004
	83	180	61929	0'004
	84	180	62289	0'004



Tabla 4.24.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de elución del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 9 cm.

ELUCIÓN	Nº TUBO	V _{TUBO}	V _{MEDIO}	A ₅₆₅	A ₆₂₀	A ₆₅₀	F.D.	[B-PE]	mg B-PE
	1	30	62394	0'004	0'001	0	1	0'000285	0'008552
	2	30	62424	0'004	0'001	0'001	1	0'000306	0'009179
	3	29	62453'5	0'004	0'001	0'001	1	0'000306	0'008873
	4	31	62483'5	0'004	0'001	0'001	1	0'000306	0'009485
	5	29	62513'5	0'004	0'001	0	1	0'000285	0'008267
	6	29	62542'5	0'005	0'002	0'001	1	0'000354	0'010291
	7	29	62571'5	0'005	0'001	0'001	1	0'000384	0'011157
	8	30	62601	0'004	0'001	0	1	0'000285	0'008552
	9	30	62631	0'004	0'001	0'001	1	0'000306	0'009179
	10	29	62660'5	0'006	0'002	0'002	1	0'000454	0'013180
	11	30	62690	0'006	0'002	0'001	1	0'000433	0'013008
	12	28	62719	0'006	0'002	0'001	1	0'000433	0'012140
	13	28	62747	0'007	0'002	0'001	1	0'000512	0'014345
	14	29	62775'5	0'008	0'002	0'002	1	0'000612	0'017747
	15	29	62804'5	0'01	0'003	0'001	1	0'000718	0'020842
	16	29	62833'5	0'019	0'004	0'001	1	0'001397	0'040526
	17	29	62862'5	0'038	0'008	0'002	1	0'002794	0'081053
	18	29	62891'5	0'071	0'016	0'004	1	0'005196	0'150690
	19	30	62921	0'118	0'025	0'005	1	0'008649	0'259471
	20	29	62950'5	0'194	0'042	0'009	1	0'014209	0'412063
	21	28	62979	0'279	0'059	0'011	1	0'020435	0'572206
	22	30	63008	0'381	0'079	0'015	1	0'027953	0'838608
	23	29	63037'5	0'499	0'102	0'018	1	0'036620	1'061996
24	28	63066	0'623	0'126	0'022	1	0'045751	1'281028	



Tabla 4.24.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de elución del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 9 cm.

(Continuación Tabla 4.24.)

Nº TUBO	V _{TUBO}	V _{MEDIO}	A ₅₆₅	A ₆₂₀	A ₆₅₀	F.D.	[B-PE]	mg B-PE
25	30	63095	0'768	0'153	0'026	1	0'056445	1'693361
26	30	63125	0'882	0'198	0'054	6	0'064662	1'939888
27	30	63155	1'032	0'216	0'048	6	0'075810	2'274323
28	29	63184'5	1'188	0'246	0'054	6	0'087323	2'532380
29	30	63214	1'35	0'288	0'066	6	0'099075	2'972268
30	29	63243'5	1'548	0'318	0'072	6	0'113895	3'302966
31	30	63273	1'728	0'354	0'078	6	0'127118	3'813558
32	29	63302'5	1'86	0'378	0'084	6	0'136920	3'970703
33	29	63331'5	2'046	0'408	0'084	6	0'150670	4'369437
34	29	63360'5	2'226	0'444	0'096	6	0'164018	4'756549
35	30	63390	2'328	0'45	0'096	6	0'171871	5'156135
36	30	63420	2'352	0'45	0'09	6	0'173635	5'209064
37	30	63450	2'472	0'468	0'09	6	0'182546	5'476397
38	30	63480	2'544	0'48	0'102	6	0'188108	5'643249
39	30	63510	2'574	0'474	0'096	6	0'190524	5'715728
40	30	63540	2'586	0'474	0'096	6	0'191469	5'744075
41	28	63569	2'532	0'462	0'096	6	0'187575	5'252119
42	29	63597'5	2'586	0'462	0'09	6	0'191702	5'559363
43	29	63626'5	2'478	0'444	0'096	6	0'183861	5'331982
44	29	63655'5	2'376	0'426	0'09	6	0'176242	5'111024
45	29	63684'5	2'304	0'402	0'078	6	0'171038	4'960130
46	30	63714	2'262	0'408	0'09	6	0'167803	5'034107
47	29	63743'5	2'148	0'384	0'084	6	0'159418	4'623143
48	31	63773'5	2'082	0'39	0'096	6	0'154293	4'783100



Tabla 4.24.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de elución del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 9 cm.

(Continuación Tabla 4.24.)

Nº TUBO	V _{TUBO}	V _{MEDIO}	A ₅₆₅	A ₆₂₀	A ₆₅₀	F.D.	[B-PE]	mg B-PE
49	30	63804	1'998	0'36	0'078	6	0'148199	4'445976
50	30	63834	1'986	0'354	0'072	6	0'147308	4'419243
51	30	63864	1'878	0'342	0'072	6	0'139162	4'174879
52	29	63893'5	1'776	0'336	0'084	6	0'131561	3'815279
53	30	63923	1'668	0'3	0'06	6	0'123631	3'708930
54	30	63953	1'632	0'294	0'06	6	0'120975	3'629268
55	30	63983	1'53	0'27	0'054	6	0'113535	3'406068
56	30	64013	1'536	0'276	0'06	6	0'113954	3'418628
57	30	64043	1'428	0'264	0'06	6	0'105808	3'174265
58	30	64073	1'374	0'27	0'072	6	0'101628	3'048857
59	30	64103	1'362	0'246	0'048	6	0'100898	3'026963
60	30	64133	1'32	0'24	0'048	6	0'097770	2'933128
61	30	64163	1'26	0'228	0'048	6	0'093405	2'802150
62	29	64192'5	1'236	0'222	0'048	6	0'091694	2'659140
63	30	64222	1'194	0'21	0'042	6	0'088620	2'658613
64	30	64252	1'158	0'216	0'048	6	0'085732	2'571960
65	31	64282'5	1'098	0'204	0'048	6	0'081366	2'522349
66	29	64312'5	1'104	0'21	0'048	6	0'081659	2'368119
67	30	64342	1'056	0'192	0'042	6	0'078292	2'348761
68	30	64372	1'026	0'192	0'042	6	0'075929	2'277895
69	29	64401'5	1'134	0'204	0'048	6	0'084200	2'441821
70	30	64431	0'99	0'198	0'054	6	0'073166	2'195006
71	30	64461	0'936	0'174	0'036	6	0'069255	2'077664
72	29	64490'5	0'906	0'174	0'042	6	0'067018	1'943543



Tabla 4.24.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de elución del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 9 cm.

(Continuación Tabla 4.24.)

Nº TUBO	V _{TUBO}	V _{MEDIO}	A ₅₆₅	A ₆₂₀	A ₆₅₀	F.D.	[B-PE]	mg B-PE
73	29	64519'5	0'888	0'168	0'036	6	0'065655	1'904001
74	31	64549'5	0'876	0'162	0'036	6	0'064889	2'011576
75	30	64580	0'858	0'156	0'03	6	0'063526	1'905780
76	31	64610'5	0'822	0'15	0'024	6	0'060745	1'883099
77	30	64641	0'822	0'156	0'036	6	0'060816	1'824505
78	30	64671	0'786	0'144	0'03	6	0'058215	1'746456
79	30	64701	0'762	0'138	0'024	6	0'056379	1'691376
80	29	64730'5	0'744	0'138	0'03	6	0'055087	1'597534
81	29	64759'5	0'775	0'142	0'028	1	0'057367	1'663643
82	30	64789	0'751	0'138	0'027	1	0'055575	1'667274
83	30	64819	0'742	0'139	0'03	1	0'054900	1'647000
84	30	64849	0'705	0'131	0'027	1	0'052162	1'564887
85	32	64880	0'712	0'131	0'026	1	0'052693	1'686181
86	31	64911'5	0'699	0'134	0'03	1	0'051663	1'601570
87	30	64942	0'674	0'126	0'025	1	0'049829	1'494885
88	30	64972	0'66	0'123	0'023	1	0'048774	1'463248
89	29	65001'5	0'652	0'122	0'023	1	0'048174	1'397071
90	30	65031	0'64	0'119	0'023	1	0'047319	1'419589
91	29	65060'5	0'62	0'117	0'025	1	0'045846	1'329545
92	30	65090	0'609	0'114	0'023	1	0'045028	1'350841
93	30	65120	0'602	0'116	0'027	1	0'044500	1'335023
94	30	65150	0'585	0'114	0'027	1	0'043221	1'296658
95	28	65179	0'573	0'107	0'022	1	0'042381	1'186685
96	29	65207'5	0'56	0'106	0'022	1	0'041387	1'200248



Tabla 4.24.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de elución del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 9 cm.

(Continuación Tabla 4.24.)

Nº TUBO	V _{TUBO}	V _{MEDIO}	A ₅₆₅	A ₆₂₀	A ₆₅₀	F.D.	[B-PE]	mg B-PE
97	29	65236'5	0'554	0'106	0'022	1	0'040915	1'186547
98	30	65266	0'558	0'106	0'022	1	0'041230	1'236911
99	29	65295'5	0'547	0'104	0'021	1	0'040403	1'171689
100	29	65324'5	0'54	0'102	0'021	1	0'039911	1'157438
101	30	65354	0'532	0'1	0'02	1	0'039320	1'179617
102	28	65383	0'526	0'103	0'024	1	0'038842	1'087580
103	29	65411'5	0'516	0'1	0'023	1	0'038123	1'105580
104	30	65441	0'506	0'096	0'02	1	0'037392	1'121784
105	29	65470'5	0'498	0'096	0'021	1	0'036783	1'066730
106	28	65499	0'487	0'093	0'018	1	0'035944	1'006447
107	29	65527'5	0'469	0'087	0'015	1	0'034643	1'004668
108	29	65556'5	0'466	0'088	0'016	1	0'034398	0'997558
109	29	65585'5	0'457	0'086	0'015	1	0'033728	0'978133
110	29	65614'5	0'451	0'084	0'015	1	0'033316	0'966165
111	29	65643'5	0'45	0'084	0'017	1	0'033279	0'965094
112	29	65672'5	0'444	0'084	0'018	1	0'032827	0'952000
113	29	65701'5	0'432	0'082	0'018	1	0'031942	0'926331
114	28	65730	0'428	0'08	0'016	1	0'031645	0'886072
115	27	65757'5	0'424	0'081	0'017	1	0'031321	0'845680
116	27	65784'5	0'412	0'077	0'015	1	0'030454	0'822266
117	29	65812'5	0'404	0'076	0'016	1	0'029875	0'866379
118	29	65841'5	0'399	0'075	0'015	1	0'029490	0'855222
119	28	65870	0'396	0'075	0'015	1	0'029254	0'819117
120	28	65898	0'39	0'073	0'015	1	0'028841	0'807562

ELUCIÓN



Tabla 4.23.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de elución del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 9 cm.

(Continuación Tabla 4.24.)

Nº TUBO	V _{TUBO}	V _{MEDIO}	A ₅₆₅	A ₆₂₀	A ₆₅₀	F.D.	[B-PE]	mg B-PE
121	29	65926'5	0'387	0'074	0'016	1	0'028596	0'829293
122	28	65955	0'38	0'073	0'016	1	0'028075	0'786100
123	29	65983'5	0'377	0'072	0'016	1	0'027868	0'808191
124	28	66012	0'37	0'071	0'016	1	0'027347	0'765726
125	29	66040'5	0'361	0'07	0'016	1	0'026668	0'773389
126	30	66070	0'365	0'068	0'013	1	0'026980	0'809416
127	28	66099	0'357	0'067	0'013	1	0'026380	0'738654
128	28	66127	0'354	0'067	0'014	1	0'026165	0'732625
129	29	66155'5	0'352	0'067	0'014	1	0'026007	0'754224
130	29	66184'5	0'345	0'064	0'012	1	0'025504	0'739625
131	26	66212	0'337	0'063	0'013	1	0'024925	0'648055
132	30	66240	0'337	0'064	0'013	1	0'024895	0'74686
133	28	66269	0'337	0'065	0'015	1	0'024907	0'697403
134	28	66297	0'328	0'063	0'014	1	0'024237	0'678648
135	28	66325	0'319	0'061	0'013	1	0'023567	0'659893
136	28	66353	0'32	0'061	0'014	1	0'023667	0'662683
137	27	66380'5	0'318	0'059	0'011	1	0'023506	0'634684
138	28	66408	0'314	0'059	0'012	1	0'023212	0'649957
139	29	66436'5	0'31	0'059	0'013	1	0'022918	0'664642
140	29	66465'5	0'305	0'058	0'012	1	0'022533	0'653485
141	29	66494'5	0'303	0'057	0'011	1	0'022385	0'649178
142	28	66523	0'301	0'057	0'012	1	0'022248	0'622969
143	29	66551'5	0'297	0'056	0'012	1	0'021963	0'636950
144	28	66580	0'293	0'056	0'012	1	0'021648	0'606167



Tabla 4.24.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de elución del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 9 cm.

(Continuación Tabla 4.24.)

Nº TUBO	V _{TUBO}	V _{MEDIO}	A ₅₆₅	A ₆₂₀	A ₆₅₀	F.D.	[B-PE]	mg B-PE
145	29	66608'5	0'282	0'054	0'011	1	0'020821	0'603824
146	29	66637'5	0'282	0'052	0'009	1	0'020839	0'604344
147	29	66666'5	0'285	0'056	0'014	1	0'021060	0'610761
148	28	66695	0'276	0'052	0'011	1	0'020408	0'571447
149	28	66723	0'273	0'051	0'01	1	0'020181	0'565084
150	28	66751	0'268	0'049	0'009	1	0'019826	0'555148
151	29	66779'5	0'267	0'05	0'01	1	0'019739	0'572431
152	29	66808'5	0'264	0'049	0'01	1	0'019532	0'566447
153	29	66837'5	0'262	0'049	0'01	1	0'019375	0'561880
154	30	66867	0'254	0'046	0'008	1	0'018793	0'563792
155	30	66897	0'249	0'046	0'009	1	0'018420	0'552608
156	30	66927	0'249	0'046	0'008	1	0'018399	0'551981
157	30	66957	0'244	0'044	0'008	1	0'018065	0'541962
158	30	66987	0'243	0'045	0'009	1	0'017977	0'539331
159	29	67016'5	0'239	0'044	0'008	1	0'017671	0'512479
160	29	67045'5	0'233	0'043	0'008	1	0'017229	0'499645
161	29	67074'5	0'234	0'042	0'008	1	0'017337	0'502795
162	29	67103'5	0'233	0'043	0'008	1	0'017229	0'499645
163	29	67132'5	0'232	0'044	0'009	1	0'017141	0'497102
164	29	67161'5	0'228	0'043	0'009	1	0'016856	0'488834
165	29	67190'5	0'215	0'039	0'007	1	0'015910	0'461402
166	30	67220	0'218	0'04	0'008	1	0'016137	0'484130
167	29	67249'5	0'214	0'041	0'009	1	0'015813	0'458598
168	29	67278'5	0'211	0'04	0'008	1	0'015586	0'452008



Tabla 4.24.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de elución del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 9 cm.

(Continuación Tabla 4.24.)

Nº TUBO	V _{TUBO}	V _{MEDIO}	A ₅₆₅	A ₆₂₀	A ₆₅₀	F.D.	[B-PE]	mg B-PE
169	29	67307'5	0'206	0'039	0'008	1	0'015222	0'441457
170	29	67336'5	0'204	0'038	0'008	1	0'015095	0'437756
171	29	67365'5	0'205	0'039	0'009	1	0'015164	0'439780
172	29	67394'5	0'205	0'039	0'008	1	0'015143	0'439173
173	29	67423'5	0'205	0'04	0'01	1	0'015155	0'439520
174	30	67453	0'2	0'039	0'009	1	0'014771	0'443134
175	29	67482'5	0'195	0'039	0'01	1	0'014398	0'417552
176	30	67512	0'194	0'037	0'009	1	0'014358	0'430753
177	30	67542	0'189	0'036	0'007	1	0'013952	0'418583
178	30	67572	0'191	0'037	0'009	1	0'014122	0'423666
179	29	67601'5	0'186	0'035	0'007	1	0'013746	0'398647
180	30	67631	0'188	0'036	0'009	1	0'013915	0'417476
181	29	67660'5	0'189	0'039	0'011	1	0'013946	0'404457
182	30	67690	0'185	0'036	0'008	1	0'013658	0'409762
183	31	67720'5	0'183	0'035	0'008	1	0'013531	0'419465
184	29	67750'5	0'18	0'035	0'008	1	0'013294	0'385552
185	28	67779	0'176	0'037	0'011	1	0'012982	0'363522
186	30	67808	0'171	0'033	0'007	1	0'012625	0'378752
187	30	67838	0'174	0'034	0'008	1	0'012852	0'385570
188	30	67868	0'175	0'035	0'009	1	0'012922	0'387664
189	29	67897'5	0'17	0'032	0'007	1	0'012576	0'364710
190	30	67927	0'168	0'032	0'007	1	0'012418	0'372562
191	30	67957	0'17	0'032	0'006	1	0'012555	0'376659
192	30	67987	0'169	0'031	0'005	1	0'012485	0'374566



Tabla 4.24.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de elución del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 9 cm.

(Continuación Tabla 4.24.)

Nº TUBO	V _{TUBO}	V _{MEDIO}	A ₅₆₅	A ₆₂₀	A ₆₅₀	F.D.	[B-PE]	mg B-PE
193	28	68016	0'166	0'031	0'006	1	0'012270	0'343566
194	30	68045	0'164	0'031	0'006	1	0'012112	0'363382
195	179	68149'5	0'149	0'029	0'006	1	0'010991	1'967460
196	178	68328	0'142	0'027	0'006	1	0'010499	1'868994
197	180	68507	0'134	0'025	0'005	1	0'009908	1'783599
198	180	68687	0'129	0'025	0'005	1	0'009515	1'712732
199	178	68866	0'115	0'022	0'005	1	0'008502	1'513434
200	178	69044	0'116	0'022	0'005	1	0'008581	1'527450
201	179	69222'5	0'109	0'02	0'004	1	0'008068	1'444322
202	175	69399'5	0'107	0'02	0'004	1	0'007911	1'384487
203	180	69577	0'104	0'019	0'004	1	0'007705	1'386902
204	178	69756	0'1	0'018	0'004	1	0'007419	1'320746
205	179	69934'5	0'095	0'018	0'004	1	0'007026	1'257694
206	178	70113	0'095	0'018	0'005	1	0'007047	1'254390
207	177	70290'5	0'092	0'017	0'004	1	0'006819	1'207118
208	175	70466'5	0'084	0'015	0'003	1	0'006228	1'090039
209	177	70642'5	0'082	0'014	0'003	1	0'006101	1'079910
210	178	70820	0'079	0'014	0'003	1	0'005864	1'043964
211	178	70998	0'071	0'013	0'003	1	0'005264	0'937155
212	173	71173'5	0'07	0'012	0'002	1	0'005195	0'898759
213	176	71348	0'07	0'013	0'003	1	0'005186	0'912767
214	180	71526	0'074	0'016	0'006	1	0'005474	0'985365
215	176	71704	0'071	0'013	0'004	1	0'005285	0'930306
216	178	71881	0'062	0'012	0'004	1	0'004607	0'820054



Tabla 4.24.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de elución del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 9 cm.

(Continuación Tabla 4.24.)

Nº TUBO	V _{TUBO}	V _{MEDIO}	A ₅₆₅	A ₆₂₀	A ₆₅₀	F.D.	[B-PE]	mg B-PE
217	177	72058'5	0'065	0'012	0'003	1	0'004822	0'853556
218	176	72235	0'059	0'009	0'001	1	0'004397	0'773997
219	180	72413	0'057	0'008	0'001	1	0'004270	0'768619
220	174	72590	0'051	0'009	0'002	1	0'003788	0'659234
221	182	72768	0'055	0'01	0'002	1	0'004073	0'741429
222	179	72948'5	0'05	0'008	0'001	1	0'003718	0'665687
223	174	73125	0'043	0'008	0'002	1	0'003188	0'554826
224	176	73300	0'036	0'007	0'002	1	0'002667	0'469453
225	184	73480	0'06	0'009	0'001	1	0'004476	0'823667
226	176	73660	0'058	0'008	0'001	1	0'004348	0'765397
227	178	73837	0'057	0'008	0'001	1	0'004270	0'760078
228	174	74013	0'056	0'008	0'001	1	0'004191	0'729297
229	177	74188'5	0'055	0'007	0'001	1	0'004142	0'733222
230	176	74365	0'053	0'007	0'001	1	0'003985	0'701363
231	175	74540'5	0'052	0'007	0'001	1	0'003906	0'683599
232	176	74716	0'05	0'006	0	1	0'003757	0'661366
233	176	74892	0'049	0'007	0'001	1	0'003670	0'645930
234	175	75067'5	0'047	0'006	0'001	1	0'003542	0'619929
235	173	75241'5	0'046	0'006	0'001	1	0'003463	0'599222
236	176	75416	0'046	0'006	0'001	1	0'003463	0'609613
237	177	75592'5	0'046	0'007	0'002	1	0'003454	0'611490
238	176	75769	0'045	0'006	0'001	1	0'003384	0'595755
239	178	75946	0'046	0'007	0'002	1	0'003454	0'614945
240	177	76123'5	0'046	0'006	0'001	1	0'003463	0'613077



Tabla 4.24.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de elución del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 50 · 9 cm.

(Continuación Tabla 4.24.)

ELUCIÓN	Nº TUBO	V _{TUBO}	V _{MEDIO}	A ₅₆₅	A ₆₂₀	A ₆₅₀	F.D.	[B-PE]	mg B-PE
		241	178	76301	0'246	0'021	0'005	1	0'018847
	242	2215	77497'5	0'861	0'075	0'027	1	0'066119	146'4543
								total	478'6830

Las absorbancias cuyo factor de dilución es 6, se encuentran ya multiplicadas por este valor.





7.2. ANEXO II

Tabla 4.26.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de aplicación y lavado del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 130 · 15 cm.

APLICACIÓN Y LAVADO	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅
	1	177	10088'5	0
	2	178	11266	0
	3	180	13445	0
	4	178	15624	0'004
	5	182	17804	0'016
	6	182	19986	0'052
	7	179	22166'5	0'091
	8	180	24346	0'111
	9	180	26526	0'128
	10	180	28706	0'135
	11	176	30884	0'126
	12	174	33059	0'13
	13	178	35235	0'144
	14	183	37415'5	0'146
	15	180	39597	0'134
	16	178	41776	0'136
	17	177	43953'5	0'137
	18	180	46132	0'136
	19	180	48312	0'137
	20	180	50492	0'137
	21	175	52669'5	0'136
	22	172	54843	0'106
23	179	57018'5	0'132	



Tabla 4.26.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de aplicación y lavado del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 130 · 15 cm.

(Continuación Tabla 4.26.)

APLICACIÓN Y LAVADO	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅
	24	179	57018'5	0'132
	25	175	61374'5	0'098
	26	179	63551'5	0'103
	27	175	65728'5	0'101
	28	175	67903'5	0'107
	29	170	70076	0'104
	30	180	72251	0'0985
	31	181	74431'5	0'105
	32	178	76611	0'106
	33	177	78788'5	0'112
	34	181	80967'5	0'112
	35	177	83146'5	0'103
	36	177	85323'5	0'111
	37	177	87500'5	0'111
	38	173	89675'5	0'105
	39	207	91865'5	0'113
	40	145	94041'5	0'115
	41	172	96200	0'114
	42	179	98375'5	0'105
	43	179	100554'5	0'0978
	44	181	102734'5	0'0901
45	182	104916	0'076	



Tabla 4.26.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de aplicación y lavado del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 130 · 15 cm.

(Continuación Tabla 4.26.)

APLICACIÓN Y LAVADO	Nº TUBO	VOL.-TUBO	VOL.-MEDIO	A ₅₆₅
	46	181	107097'5	0'054
	47	175	109275'5	0'041
	48	176	111451	0'035
	49	180	113629	0'026
	50	177	115807'5	0'012
	51	180	117986	0'0076
	52	180	120166	0'0055
	53	183	122347'5	0'0035
	54	357	124617'5	0'0157
	55	1110	127351	0'012
	56	1170	130491	0'0037
	57	1135	133643'5	0'0032
	58	1130	136776	0'0028
	59	1080	139881	0'003
60	360	142601	0'0082	



Tabla 4.27.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de elución del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 130 · 15 cm.

ELUCIÓN	Nº TUBO	V _{TUBO}	V _{MEDIO}	A ₅₆₅	A ₆₂₀	A ₆₅₀	F.D.	[B-PE]	mg B-PE
	1	94	143828	0,0511	0'0115	0'0029	1	0'00374197	0'3517449
	2	102	143926	0,0929	0'0182	0'0018	1	0'00680889	0'6945067
	3	101	144027'5	0,1631	0'0362	0'0061	1	0'01188863	1'2007519
	4	108	144132	0,2646	0'0589	0'0087	1	0'01925698	2'0797541
	5	100	144236	0,403	0'0887	0'013	1	0'02935429	2'9354288
	6	104	144338	0,5477	0'1197	0'017	1	0'03990553	4'1501754
	7	104	144442	0,7366	0'1545	0'0218	1	0'0538403	5'5993912
	8	102	144545	0,458	0'0937	0'0151	2	0'06715908	6'8502262
	9	116	144654	0,533	0'1117	0'0226	2	0'07820831	9'0721638
	10	106	144765	0,633	0'127	0'0231	2	0'0930631	9'8646884
	11	108	144872	0,701	0'1387	0'025	2	0'10315217	11'140434
	12	100	144976	0,754	0'148	0'0267	2	0'11101406	11'101406
	13	105	145078'5	0,821	0'16	0'0287	2	0'12093191	12'697850
	14	108	145185	0,855	0'1678	0'0308	2	0'12590803	13'598067
	15	103	145290'5	0,579	0'116	0'0247	3	0'12792497	13'176272
	16	107	145395'5	0,572	0'114	0'0229	3	0'12633775	13'518139
	17	105	145501'5	0,582	0'119	0'027	3	0'12850906	13'493451
	18	104	145606	0,574	0'113	0'0228	3	0'12689354	13'196928
	19	99	145707'5	0,56	0'1089	0'0196	3	0'12375817	12'252059
	20	99	145806'5	0,547	0'1069	0'0204	3	0'12091172	11'970260
	21	103	145907'5	0,553	0'1099	0'0225	3	0'12219694	12'586284
	22	103	146010'5	0,518	0'11	0'0295	3	0'11435439	11'778502
	23	101	146112'5	0,529	0'11	0'0287	3	0'11690263	11'807165
24	104	146215	0,502	0'0999	0'022	3	0'11100954	11'544992	



Tabla 4.27.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de elución del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 130 · 15 cm.

(Continuación Tabla 4.27.)

Nº TUBO	V _{TUBO}	V _{MEDIO}	A ₅₆₅	A ₆₂₀	A ₆₅₀	F.D.	[B-PE]	mg B-PE
25	101	146317'5	0,493	0'1023	0'0269	3	0'10897587	11'006562
26	103	146419'5	0,487	0'0931	0'017	3	0'10776199	11'099484
27	102	146522	0,464	0'0936	0'0208	3	0'1025225	10'457295
28	102	146624	0,448	0'0923	0'022	3	0'09893477	10'091346
29	103	146726'5	0,434	0'0891	0'0211	3	0'09585801	9'8733752
30	105	146830'5	0,429	0'088	0'0206	3	0'09474413	9'9481332
31	103	146934'5	0,414	0'0882	0'0237	3	0'09137738	9'4118697
32	105	147038'5	0,402	0'0838	0'0216	3	0'08880533	9'3245592
33	101	147141'5	0,389	0'0812	0'0203	3	0'08588592	8'6744782
34	106	147245	0,377	0'0796	0'02	3	0'08317585	8'8166404
35	101	147348'5	0,371	0'0813	0'0233	3	0'0818132	8'2631332
36	103	147450'5	0,333	0'066	0'0125	3	0'0735305	7'5736418
37	101	147552'5	0,347	0'071	0'0159	3	0'07660278	7'7368806
38	102	147654	0,358	0'07	0'0139	3	0'07916535	8'0748661
39	101	147755'5	0,378	0'0768	0'0195	3	0'08363165	8'4467966
40	100	147856	0,397	0'0756	0'0168	3	0'088058	8'8057998
41	104	147958	0,429	0'0802	0'0182	3	0'09529262	9'9104323
42	105	148062'5	0,454	0'0798	0'0167	3	0'10113988	10'619687
43	106	148168	0,481	0'084	0'0213	3	0'10743	11'387579
44	103	148272'5	0,488	0'082	0'0194	3	0'10914359	11'241789
45	102	148375	0,499	0'0829	0'0214	3	0'11178683	11'402256
46	106	148479	0,501	0'082	0'0214	3	0'11233993	11'908032
47	106	148585	0,516	0'0814	0'022	3	0'11597465	12'293312



Tabla 4.27.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de elución del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 130 · 15 cm.

(Continuación Tabla 4.27.)

Nº TUBO	V _{TUBO}	V _{MEDIO}	A ₅₆₅	A ₆₂₀	A ₆₅₀	F.D.	[B-PE]	mg B-PE
49	105	148690'5	0'513	0'0779	0'0195	3	0'11542283	12'119397
50	108	148797	0'525	0'08	0'0205	3	0'118132	12'758256
51	107	148904'5	0'518	0'0772	0'0198	3	0'11668549	12'485347
52	110	149013	0'514	0'0751	0'0195	3	0'11590999	12'750099
53	170	149153	0'505	0'073	0'0192	3	0'1139534	19'372077
54	182	149329	0'477	0'0687	0'0187	3	0'10769323	19'600168
55	177	149508'5	0'463	0'0675	0'0196	3	0'10455016	18'505377
56	182	149688	0'663	0'0912	0'0225	2	0'09990141	18'182057
57	179	149868'5	0'634	0'088	0'0224	2	0'0955215	17'098348
58	176	150046	0'609	0'085	0'023	2	0'09178883	16'154834
59	177	150222'5	0'595	0'084	0'023	2	0'08964386	15'866962
60	182	150402	0'584	0'0845	0'0219	2	0'08783569	15'986095
61	180	150583	0'573	0'083	0'021	2	0'08615539	15'50797
62	175	150760'5	0'524	0'076	0'0186	2	0'07875672	13'782425
63	182	150939	0'474	0'07	0'0196	2	0'07128302	12'973509
64	180	151120	0'898	0'124	0'025	1	0'06752705	12'154868
65	182	151301	0'832	0'114	0'024	1	0'06260803	11'394661
66	178	151481	0'766	0'102	0'0201	1	0'05768811	10'268484
67	180	151660	0'721	0'095	0'0188	1	0'05432674	9'7788131
68	180	151840	0'683	0'0905	0'0179	1	0'0514519	9'2613420
69	181	152020'5	0'648	0'0853	0'0172	1	0'04883503	8'8391403
70	179	152200'5	0'618	0'082	0'0176	1	0'04657978	8'3377797
71	180	152380	0'591	0'077	0'0158	1	0'04456678	8'0220195



Tabla 4.27.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de elución del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 130 · 15 cm.

(Continuación Tabla 4.27.)

Nº TUBO	V _{TUBO}	V _{MEDIO}	A ₅₆₅	A ₆₂₀	A ₆₅₀	F.D.	[B-PE]	mg B-PE
73	181	152560'5	0'571	0'075	0'0161	1	0'04305674	7'7932699
74	178	152740	0'5518	0'0731	0'015	1	0'04157869	7'4010062
75	180	152919	0'535	0'0709	0'0149	1	0'04031948	7'2575072
76	178	153098	0'5159	0'0679	0'0142	1	0'03889053	6'9225146
77	177	153275'5	0'508	0'0687	0'017	1	0'03830314	6'7796555
78	181	153454'5	0'49	0'0649	0'0153	1	0'03696379	6'6904456
79	182	153636	0'476	0'065	0'0177	1	0'03590863	6'5353701
80	190	153822	0'463	0'065	0'0187	1	0'03490592	6'6321242
81	180	154007	0'45	0'0596	0'0143	1	0'0339516	6'1112886
82	181	154187'5	0'438	0'0589	0'0146	1	0'03303391	5'9791372
83	181	154368'5	0'424	0'056	0'014	1	0'03200563	5'7930196
84	180	154549	0'412	0'0554	0'0139	1	0'03107658	5'5937852
85	185	154731'5	0'401	0'0529	0'0133	1	0'03027258	5'6004276
86	178	154913	0'388	0'0513	0'0129	1	0'02929007	5'2136318
87	178	155091	0'376	0'05	0'0142	1	0'02840953	5'0568970
88	182	155271	0'366	0'0484	0'0124	1	0'02763229	5'0290767
89	191	155457'5	0'357	0'0469	0'0122	1	0'02696426	5'1501731
90	181	155643'5	0'35	0'0458	0'0119	1	0'02644113	4'7858442
91	180	155824	0'342	0'0452	0'0123	1	0'02583603	4'6504858
92	177	156002'5	0'333	0'0438	0'0118	1	0'02515874	4'4530968
93	180	156181	0'326	0'0425	0'0114	1	0'02463803	4'4348454
94	180	156361	0'319	0'0419	0'0118	1	0'02411314	4'3403648
95	173	156537'5	0'312	0'0419	0'0119	1	0'02356405	4'0765803
96	173	156710'5	0'305	0'04	0'0115	1	0'02306126	3'9895986



Tabla 4.27.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de elución del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 130 · 15 cm.

(Continuación Tabla 4.27.)

Nº TUBO	V _{TUBO}	V _{MEDIO}	A ₅₆₅	A ₆₂₀	A ₆₅₀	F.D.	[B-PE]	mg B-PE
97	172	156883	0'301	0'0396	0'0116	1	0'02276034	3'9147791
98	174	157056	0'296	0'0416	0'0145	1	0'02236754	3'8919518
99	188	157237	0'289	0'0385	0'0119	1	0'0218546	4'1086643
100	180	157421	0'283	0'037	0'0113	1	0'02141442	3'8545957
101	176	157599	0'28	0'0375	0'012	1	0'0211779	3'7273106
102	170	157772	0'273	0'036	0'0106	1	0'02064226	3'5091833
103	340	158027	0'264	0'036	0'0123	1	0'01996914	6'7895089
104	172	158283	0'259	0'034	0'0108	1	0'01960382	3'3718577
105	174	158456	0'254	0'034	0'0109	1	0'01921221	3'3429252
106	175	158630'5	0'25	0'033	0'0103	1	0'01891458	3'3100516
107	179	158807'5	0'244	0'032	0'01	1	0'01846574	3'3053675
108	175	158984'5	0'241	0'032	0'0106	1	0'01824207	3'1923617
109	175	159159'5	0'239	0'032	0'0116	1	0'0181055	3'1684623
110	175	159334'5	0'233	0'032	0'0117	1	0'01763515	3'0861511
111	176	159510	0'206	0'0253	0'0067	1	0'01560476	2'7464382
112	176	159686	0'201	0'024	0'0059	1	0'01523317	2'6810377
113	178	159863	0'197	0'0233	0'0056	1	0'01493285	2'6580467
114	177	160040'5	0'193	0'0229	0'0055	1	0'01462774	2'5891108
115	181	160219'5	0'189	0'0228	0'0057	1	0'01431995	2'5919116
116	177	160398'5	0'187	0'022	0'0058	1	0'01418846	2'5113581
117	170	160572	0'183	0'0217	0'0054	1	0'0138741	2'3585971
118	181	160747'5	0'179	0'0211	0'0052	1	0'01357288	2'4566917
119	186	160931	0'177	0'021	0'0059	1	0'01343303	2'4985432
120	175	161111'5	0'175	0'022	0'0067	1	0'0132624	2'3209205

ELUCIÓN



Tabla 4.27.

Datos de volúmenes y absorbancias monitorizados durante la fase de elución del proceso de CALE para el extracto de B-PE en columna de 130 · 15 cm.

(Continuación Tabla 4.27.)

ELUCIÓN	Nº TUBO	V _{TUBO}	V _{MEDIO}	A ₅₆₅	A ₆₂₀	A ₆₅₀	F.D.	[B-PE]	mg B-PE
	121	177	161287'5	0'169	0'0198	0'0049	1	0'01281909	2'2689788
	122	177	161464'5	0'1687	0'02	0'0055	1	0'01280099	2'2657760
	123	176	161641	0'1656	0'0193	0'0048	1	0'01256506	2'2114497
	124	180	161819	0'163	0'0192	0'0049	1	0'01236353	2'2254349
	125	181	161999'5	0'161	0'019	0'0049	1	0'0122137	2'2106788
	126	177	162178'5	0'1595	0'019	0'0055	1	0'01210646	2'1428432
	127	176	162355	0'157	0'0186	0'0051	1	0'01191319	2'0967221
	128	176	162531	0'157	0'019	0'0057	1	0'01191379	2'0968272
	129	265	162751'5	0'15	0'0185	0'0057	1	0'01137755	3'0150500
	130	265	163016'5	0'146	0'0175	0'005	1	0'01107782	2'9356229
	131	270	163284	0'144	0'0164	0'0041	1	0'01093438	2'9522834
	132	275	163556'5	0'14	0'0158	0'0039	1	0'01063316	2'9241203
	133	277	163832'5	0'134	0'0164	0'0047	1	0'01015953	2'8141894
	134	575	164258'5	0'131	0'0132	0'0022	1	0'00996663	5'7308100
135	600	164846	0'126	0'0127	0'0023	1	0'00958995	5'7539722	
Total								1362'4935	





7.3. ANEXO III

Recovery of B-phycoerythrin using expanded bed adsorption chromatography: Scale-up of the process

R. Bermejo^a, E. Ruiz^a, F.G. Acien^{b,*}

^a Department of Physical and Analytical Chemistry, E.P.S. of Linares, Jaén University, Linares 23700, Spain

^b Department of Chemical Engineering, Almería University, Almería 04071, Spain

Received 22 May 2006; received in revised form 12 July 2006; accepted 14 July 2006

Abstract

B-phycoerythrin is a major light-harvesting phycobiliprotein in some marine algae. It is widely used as a fluorescent probe and analytical reagent, and could also be used as a natural dye in foods and cosmetics. In the present work, an expanded-bed methodology for large-scale recovery of B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* is developed using Streamline-DEAE as adsorbent. The operation of expanded bed technology was first optimized on a small scale using a column of 15 mm internal diameter. The chromatographic parameters studied were the sample load, viscosity and expansion degree. The optimal conditions proved to be a sample load of 0.88 mg B-PE/mL Streamline DEAE, an expanded bed volume twice the settled bed volume and a sample viscosity of 1.068 mP. The expanded bed adsorption process was then scaled up 16 times by increasing the column diameter, while maintaining the sedimented bed height, linear flow rate and protein load at constant values. The success of the scale-up process was verified by determining the protein breakthrough capacity and product recovery. A comparative study was made of the performance of four columns of 15, 25, 40 and 60 mm internal diameters. The standard deviation of the breakthrough curves ranged from 0.81 to 0.76; the higher the internal diameter the lower the standard deviation. The yield of the EBA chromatography was in the range of 71–78%. These results show that small diameter columns can be effectively used for mimicking the behaviour in scaled up systems providing a useful tool for method scouting studies. The results also show that the large-scale assay (60 mm diameter column) was as efficient as the lab scale one (15 mm diameter column) in recovering B-phycoerythrin from the unclarified crude extract. Results show that expanded bed chromatography is a scaleable technology that allows large quantities of B-PE to be obtained without product loss. It maintains a high protein recovery while reducing both processing costs and times, when compared with previous methodologies.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Phycoerythrins; *Porphyridium cruentum*; Phycobiliproteins; Expanded-bed adsorption chromatography; Scale-up

1. Introduction

Phycobiliproteins are water-soluble proteins that form light-harvesting antenna complexes (phycobilisomes) and act as photosynthetic accessory pigments in red algae, this being the usual source of these compounds [1,2]. In terms of their absorption properties, the phycobiliproteins are divided into four main classes: phycoerythrins (PEs, $\lambda_{\max} \sim 540\text{--}570$ nm), phycoerythrocyanin (PEC, $\lambda_{\max} \sim 570$ nm), phycocyanins (PCs, $\lambda_{\max} \sim 610\text{--}620$ nm) and allophycocyanins (APC, $\lambda_{\max} \sim 650\text{--}655$ nm) [3]. The main application of phycobilipro-

teins is as fluorescent markers of cells and macromolecules in biomedical research and highly sensitive fluorescence techniques [4–6]. Phycobiliproteins have also been shown to have therapeutic value due to their protective effect and anticarcinogenic activity, thus being reported that phycoerythrin has photosensitive activity and can be used to kill cancer cell [7–9]. 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 [10–14]. B-PE has been shown to be particularly useful due to its high fluorescence efficiency and its intense and unique pink colour [15,16]. However, the widespread use of B-PE and other phycobiliproteins has been somewhat limited by the high cost of these purified macromolecules. For this reason, it is necessary to adopt new methodologies to obtain effectively phycobiliproteins in general and B-PE in particular for the application in life and research.

Abbreviations: PE, phycoerythrin; C-PC, C-phycocyanin; APC, allophycocyanin; i.d., internal diameter; DEAE, diethylamino ethyl cellulose; EBAchromatography, expanded-bed adsorption chromatography

* Corresponding author. Tel.: +34 950 015443; fax: +34 950 015484.

E-mail address: facien@ual.es (F.G. Acien).

The conventional schemes for phycobiliprotein purification use multiple unit operations, each operation reducing the yield. These schemes recover phycobiliproteins extracts by a combination of difference and non-scaleable methods. Conventional methodologies involve two steps: the first consists of sample pretreatment in order to liberate the intracellular material, obtaining a crude extract ready for the second step, in which the phycobiliproteins are separated using mainly conventional chromatography. Sample pretreatment consists of disintegration of the cell-wall, for which different methods have been used: ultrasound [1,17–20], lysozyme [21–23], mechanical breakage [24], treatment with rivanol [25], treatment with Triton X-100 and mechanical homogenization [26], ultrasound and extraction with acetone [27]. After cell-wall disintegration, all methods continue with the precipitation of the phycobiliproteins using ammonium sulfate. Centrifugation and dialysis of the samples is usually then necessary to obtain a crude extract ready for the next step. This second step involves one or more chromatographic processes. For phycoerythrin purification, several chromatographic methods are described in the literature. These methods involve adsorption, hydrophobic interaction, gel filtration or ion exchange chromatography [28,17,29,19,20,30]. The high number of unit operations increases the production cost and time necessary to perform purification.

Expanded bed adsorption (EBA) chromatography 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 [31]. In a fluidised bed a stationary phase (adsorbent particles) is fluidised in a liquid stream upwards. This stream increases the distance between the adsorbent particles, thus allowing particles contained in the feed to pass freely in the interstitial volume of the matrix. The position of each particle in the column depends on the particle size and density as well as on the fluid viscosity, density and velocity [31,32]. Provided the adsorbent is chosen in a suitable range of particle size and/or density a so-called classified bed is obtained. A classified bed has some very important advantages such as reduced mobility of the solid phase, reduced axial mixing in the liquid phase and plug flow performance comparable to a packed bed [31,33]. Perfectly classified fluidised beds are termed expanded bed. 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 [34–38]. 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 [39,38].

Commercially available expanded beds range in size from 25 mm to over 1 m in diameter, facilitating scale-up across a wide range of operating volumes. Works performed elsewhere has demonstrated the successful scale-down of an EBA system to 10 mm [40,41] and 1.9 mm diameter [42]. Moreover, a set of analytical methods has been developed and validated to simulate performance of EBA operations [43–47]. In the present work, an expanded-bed methodology for large-scale recovery of B-PE from *Porphyridium cruentum* is developed. The objective is to maximize the phycoerythrin recovery more than the

purity of solution, since the procedure is intended to replace low-resolution steps that result in phycobiliprotein loss. For this, first the operation of expanded bed technology was optimized on a small scale, and the chromatographic parameters of sample load, viscosity and expansion degree were studied. Next, the process was scaled up 16 times by increasing the column diameter, while parameters such as the sedimented bed height, linear flow-rate and protein load remained constant. The success of the scale-up process was verified by determining the protein breakthrough capacity and product recovery. Results show that expanded bed chromatography is a scaleable technology that allows large quantities of B-PE to be obtained without product loss. It maintains a high protein recovery while reducing both processing costs and times, when compared with previous methodologies.

2. Materials and methods

2.1. Microalgal biomass and chemicals

The red microalga *P. cruentum* UTEX 161 was used. The biomass was obtained from chemostat cultures as described elsewhere [48,20]. For phycobiliprotein purification, microalgal cells were removed from the growth medium by centrifugation at $2000 \times g$ for 5 min, and stored at -20°C . Streamline-DEAE anion-exchanger was from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Sodium azide and all other chemicals were from Sigma Diagnostics (St. Louis, MO, USA) and used without further purification.

2.2. Spectroscopic measurements

Absorbance measurements and absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer (Beaconsfield, UK) Lambda-20 UV-vis spectrophotometer with a 1 cm light path. All spectra were recorded at room temperature. The amounts of B-PE and R-PC in the different extracts and biliprotein-containing solutions were calculated from measurements of the absorbance at 565, 620 and 650 nm using the following equations to correct the pigment's spectral overlap [49,50].

$$\text{R-PC (mg mL}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{OD}_{620\text{ nm}} - 0.7\text{OD}_{650\text{ nm}})}{7.38} \quad (1)$$

$$\text{B-PE (mg mL}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{OD}_{565\text{ nm}} - 2.8 [\text{R-C}])}{12.7} \quad (2)$$

2.3. Equilibrium adsorption

Adsorption isotherms were determined by shake flask experiments obtaining the static binding capacity of Streamline DEAE as described elsewhere [39]. The dynamic binding capacity was determined from the breakthrough profile. For this purpose a crude extract solution of B-PE (0.033 mg mL^{-1} and 1.068 mP viscosity) in 50 mM acetic acid–sodium acetate buffer, $\text{pH } 5.5$ (starting buffer) was used. Initially, starting buffer was pumped upwards through the bed at increasing flow rate till 198 cm h^{-1} until the bed stopped expanding. After this, the B-PE crude extract solution was applied to the expanded bed and the breakthrough curve was calculated as the amount of applied B-PE per ml adsorbent at different C/C_0 , where C_0 corresponds to the B-PE concentration in the crude extract and C the B-PE concentration in the flowthrough. Frontal loading was terminated when the outlet concentration of protein rose to equal that in the inlet.

2.4. Expanded bed operation

The column was filled with the necessary volume of adsorbent (Streamline DEAE) 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) regulated the flow-rate. When the bed was stable (after approximately 20–30 min) the column was equilibrated

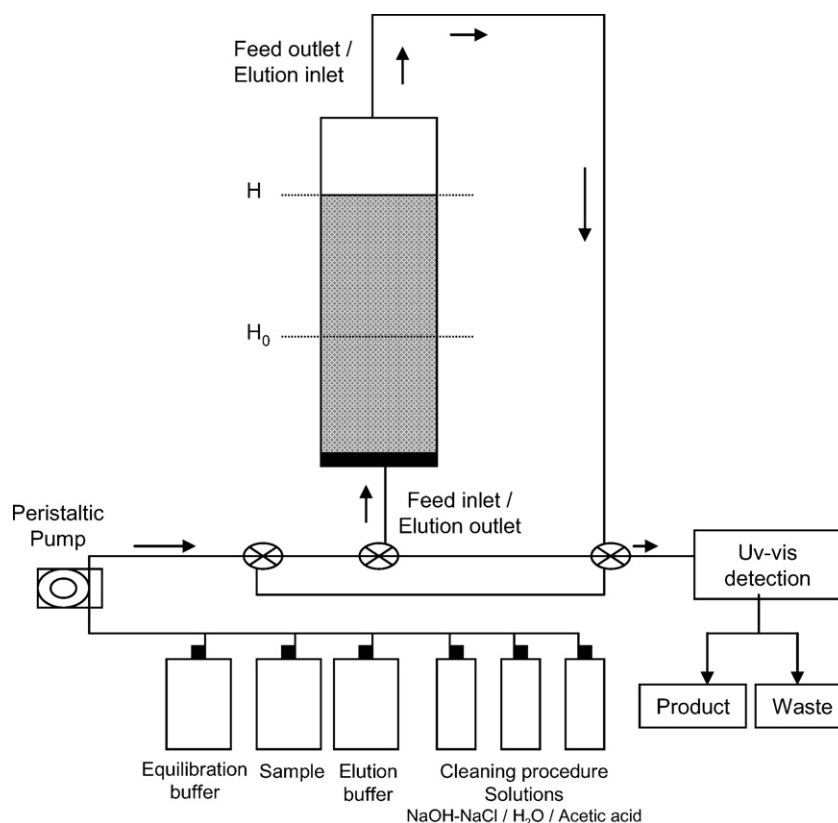


Fig. 1. Experimental set-up for expanded bed adsorption using Streamline-DEAE. The arrows indicate the direction of liquid flow when the column is operated in expanded mode.

with a suitable volume of starting buffer (50 mM acetic acid–sodium acetate buffer, pH 5.5). Next, a 0.033 mg/mL B-PE solution from the extraction step (B-PE crude extract) was used as sample for EBA experiments. The B-PE 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 B-PE 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 with the B-PE crude extract. After application of the total sample volume, the columns were washed with the starting buffer until the absorbance at 565 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 250 mM acetic acid–sodium acetate buffer, pH 5.5. Fractions of 20 mL were collected during elution using a Redifrac fraction collector from GE Healthcare. Phycobiliprotein concentration was determined at 565 and 620 nm and the fractions with a red-purple 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. A schematic diagram of the expanded bed set up is shown in Fig. 1.

2.5. Small scale optimization (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 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 112 to 333 cm h⁻¹. In

these experiments, a sample volume of 710 mL and a protein/adsorbent ratio of 0.88 mg B-PE/mL adsorbent were used. Regarding the viscosity, different sample viscosities were assayed. Samples were prepared by B-PE crude extract 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 Road, State College, PA 16803) calibrated against distilled water at 25 °C.

3. Results and discussion

3.1. Equilibrium adsorption and breakthrough curve

The equilibrium adsorption isotherms on the Streamline-DEAE matrix using either pure B-PE or B-PE crude extract were previously obtained [39]. The adsorption capacity expressed as B-PE mass to volume of adsorbent was 6.1 mg/mL for pure B-PE and 1.8 mg/mL for the crude extract. From these data, the maximum B-PE binding capacities determined using Langmuir's model were 8.3 and 2.4 mg/mL for pure and crude extract, respectively [39]. The capacity of the adsorbent was seen to decrease considerably in the presence of other proteins in the crude extract. The binding capacity for the extract utilized was, therefore, measured once more in the present work. The experimental binding capacity was determined as 1.8 mg B-PE/mL. Results were fitted using Langmuir's isotherm and the maximum binding capacity measured was 2.4 mg B-PE/mL adsorbent. This data was identical to that previously determined, indicating that although the crude extracts were not identical they were of a similar composition. Any differences between them did not

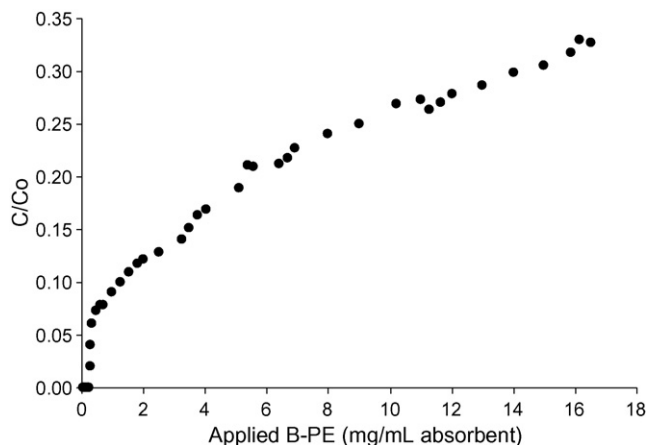


Fig. 2. Breakthrough curve for B-PE crude extract on Streamline DEAE using 15 mm i.d. column. C is the B-PE concentration in the flowthrough and C_0 is the concentration of B-PE in the applied crude extract.

modify the behavior of the adsorption phenomena. The maximum binding capacity allows the calculation of the maximum static load sample for a given adsorbent or column volume. However, for the operation of the expanded bed the dynamic binding capacity must be determined. Thus, the breakthrough curve for B-PE using Streamline DEAE was measured in a 15 mm internal diameter column (Fig. 2). The dynamic capacity of the bed was determined when the B-PE concentration in the column effluent reached 10% of the initial concentration [51]. In these conditions the dynamic capacity determined was 1.65 mg B-PE/mL Streamline DEAE adsorbent at 10% breakthrough. To avoid saturation with B-PE, which would reduce the yield due to the breakthrough of unadsorbed phycobiliprotein, the maximum sample loading was fixed 50% of the estimated dynamic capacity, thus a value of 0.88 mg B-PE/mL adsorbent was used. Note that the value obtained (0.88 mg B-PE/mL adsorbent) had been previously reported to allow the best recovery data using a 25 mm i.d. column [39].

3.2. Effective expanded bed step in small diameter 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. At these conditions the liquid flow through the bed is close to plug flow and the contact efficiency is close to packed bed [52]. To determine the optimal conditions for expanded bed operation, the influence of the degree of bed expansion in protein recovery was analyzed. Experiments were performed using the same sample load (0.88 mg B-PE/mL adsorbent), and so a total sample volume of 710 mL was loaded. In order to obtain the desired degrees of expansion the flow-rate was modified from 112 to 333 cm h⁻¹ (Fig. 3). Results show that maximum recovery (71.0%) was achieved when the expanded bed volume was twice the settled bed volume, and the liquid flow rate necessary to achieve this expansion degree was 198 cm h⁻¹. In these conditions the sample application time was 108 min. The optimal conditions for the operation of expanded bed adsorption units are

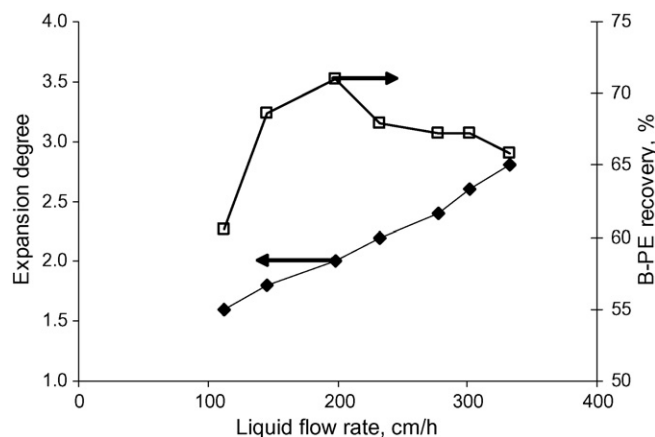


Fig. 3. Influence of the liquid flow rate in the expansion degree and B-PE recovery upon elution in a 15 mm i.d. Streamline-DEAE column. In all experiments the sample volume loaded was 710 mL and the B-PE/adsorbent ratio was 0.88 mg/mL. Sample viscosity was 1.068 mP.

those which combine both a decrease in the processing time and an increase in product recovery, thus improving the productivity of the system [31,40,41]. At liquid flow rates below optimum the expansion degree is low, mass transfer resistance high, product recovery low, and the yield of the system also low. Whereas, 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, causing less amount of proteins being adsorbed on the gel particles. The experimentally determined optimum value of expansion degree is equal to that previously referenced [39], thus supporting the view that an expanded bed with double its settled height provides good results in similar systems.

After the expanded bed adsorption operation, the remaining unbound molecules were removed by washing the bed in the expanded mode using a 12-fold bed volume of starting buffer. In this operation, the superficial velocity was changed smoothly by modifying the flow rate supplied by the pump in order to maintain a constant degree of expansion. This operation is necessary in order to correct small deviations of expanded bed height when the fluid phase modifies. The adsorbed B-PE was eluted using 250 mM acetic acid–sodium acetate buffer, pH 5.5. The elution from Streamline-DEAE was assayed in expanded bed and packed bed modes. As elution in expanded bed mode needed six times higher volumes of sodium acetate buffer, elution in packed bed mode was selected as optimal. Particulate material was not observed in the eluted fractions. The absorbance of effluent from the column during EBA chromatography of crude extract using the 15 mm internal diameter column is shown in Fig. 4. The absorbance of the fractions obtained shows a sharp peak, indicating high elution efficiency. It should be emphasized that it was considered more important to achieve a high rate of phycoerythrin recovery than a highly pure solution, since the procedure is intended to replace low-resolution steps that normally result in phycobiliprotein loss.

Another important factor to be considered in the optimization of expanded bed operations is sample viscosity. In general, the physical properties of the feedstock can be unfavorable for effec-

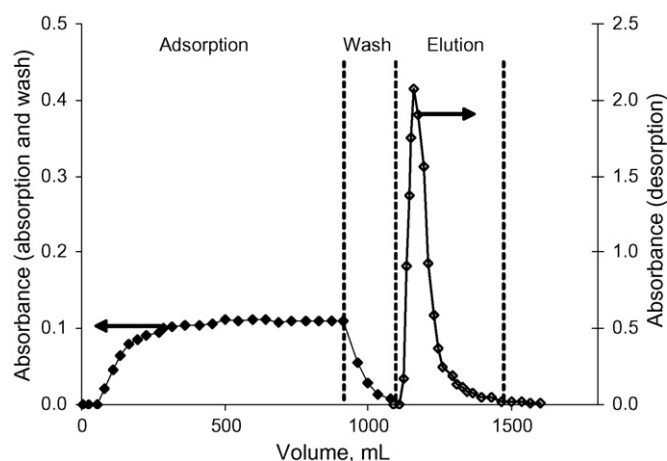


Fig. 4. Absorbance at 565 nm of effluent from the 15 mm i.d. column, during EBA chromatography of crude extract from *Porphyridium cruentum* biomass. Seven hundred and ten milliliters of B-PE crude extract (0.88 mg B-PE/mL adsorbent) was applied to the Streamline-DEAE column. Feed rate = 198 cm h^{-1} , elution rate = 90 cm h^{-1} . In the elution step, the absorbance was measured after suitable eluate dilution. Thus, the absorbance values in ordinate axes are the resulting values after multiplication by the dilution factor.

tive processing in expanded beds. Such situations may occur when disrupted-cell preparations of high viscosity are pumped without dilution into the EBA systems causing flow disturbance, unequal distribution of the sample and poor recovery of the target product [31]. 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 unit. The influence of the viscosity of the sample on the behavior of the system was therefore analyzed. Experiments were conducted at the optimum expansion degree ($H/H_0 = 2$) and sample load (0.88 mg B-PE/mL adsorbent), viscosity of the feedstock being modified from 1.068 to 1.009 mP by dilution. All the experiments performed adequately, the behavior of the expanded bed column being close to plug flow and no channeling phenomena being observed. Results show that the yield of the process increased as sample viscosity decreased, the B-PE recovery increasing from 71.0 to 76.2% when the viscosity decreased from 1.068 to 1.009 mP (Table 1). 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 (5.2%) 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, two-fold, which needs to be applied to the bed, and which may also reduce the efficiency of the expanded-bed

Table 1

Influence of the viscosity on the B-PE recovery percentage upon elution in a 15 mm i.d. Streamline DEAE column

Viscosity (mP)	Conductivity (ms cm^{-1})	Sample volume (mL)	Application time (min)	B-PE recovery (%)
1.068	3.24	710	108	71.0
1.020	3.22	1080	153	74.9
1.009	3.12	1440	176	76.2

In all experiments the extract volume loaded was 710 mL and the B-PE/adsorbent ratio was 0.88 mg/mL, $H/H_0 = 2$ and flow-rate = 198 cm h^{-1} . Buffer equilibration viscosity = 1.001 mP and buffer equilibration conductivity = 2.83 ms cm^{-1} .

Table 2

Variation of the half-saturation time, the breakthrough time and σ with the internal diameter of the column used

Diameter of the column (mm)	Half-saturation time, t_0 (min)	Breakthrough time (min)	σ
15	242	13.9	0.814
25	244	14.2	0.806
40	241	13.6	0.786
60	242	13.7	0.764

Data obtained from experimental breakthrough curves.

procedure in terms of time and economy. For this reason it was concluded that no additional dilution should be performed. Previous experiments performed in similar conditions also showed a reduction in B-PE recovery when the viscosity of the crude extract increases, although in these experiments the product load was also modified [39]. For the same sample load as reported here, i.e. 0.88 mg B-PE/mL adsorbent, 80% B-PE recovery was reported for a sample viscosity of 1.020 mP [39].

3.3. Expanded bed scale-up

For the scale-up of expanded bed adsorption columns it is mandatory to maintain constant the form of the breakthrough curve. This is a function of the length of the column and the feedstock flow rate, and so both parameters must remain constant on the larger scale. Consequently, the column diameter is the only variable that is modified. Thus, the volumetric feedstock flow rate must increase in proportion to the cross section of the column. According to this principle the expanded bed adsorption process optimized in the 15 mm i.d. column was scale up to columns of 25 mm, 40 mm and finally 60 mm i.d. column. Analysis of the breakthrough curve obtained for each column showed the same form, experimental data being fitted to a two-parameter model as,

$$C = \frac{C_0}{2} \left[1 + \operatorname{erf} \left(\frac{t - t_0}{\sqrt{2}\sigma t_0} \right) \right] \quad (3)$$

where t_0 is the time at which $C = 0.5C_0$, σt_0 is the standard deviation of the curve, thus indicating the width of the breakthrough curve, and $\operatorname{erf}(x)$ is the error function. The value of t_0 is directly obtained from the breakthrough curve, whereas the value of σ is calculated considering time $t = t_b$ at which the rupture takes place, so $C = C_b = 0.1C_0$. The obtained values are shown in Table 2. The half-saturation time and the breakthrough time were similar for all the internal diameters used because the flow pattern and velocity were constant. In addition, the standard

Table 3
Summary of data from small to large scale recovery of B-PE from *Porphyridium cruentum* by expanded bed adsorption chromatography using 15 cm (settled bed height) Streamline DEAE at 198 cm h⁻¹ in Streamline columns (15–60 mm i.d.)

Column i.d. (mm)	Load B-PE (mg)	Sample volume (mL)	Elution peak (SBV)	Elution peak (mL)	Settled volume (mL)	Total time operation (min)	B-PE recovery%
15	24	710	41.2	1112	27	149	71.0
25	63	1963	41.4	3064	74	213	78.0
40	165	5020	40.2	7588	189	225	71.5
60	373	11306	41.3	17521	424	239	74.4

SBV, settled bed volume. $H/H_0 = 2$ and sample viscosity = 1.068 mP.

deviation of the breakthrough curve was high, although it was lower the higher the internal diameter of the column used. This variation is due to the lower contribution of eddies near the wall to the axial mixing of the liquid, thus enhancing the performance of the column. Finally, to verify that the scale-up procedure was adequate the performance of the columns was evaluated by operating them according to the optimal conditions fixed. Data (protein load, volumes, yields, etc.) from the runs in the different columns are shown in Table 3. The yield of B-PE on all scales was in the range of 71–78%. Moreover, chromatographic profiles of the eluates from the different expanded bed runs in Streamline DEAE columns were identical, with absorbance ratio $A_{545}/A_{280} > 3$, which indicates consistency of the scale-up process and the adequate performance of large scale production Streamline columns.

Results show that expanded bed chromatography is a scaleable technology that allows large quantities of B-PE to be obtained without product loss. It maintains a high protein recovery while reducing both processing costs and times, when compared with previous methodologies. Thus, the cost analysis of a classical multistage method for the recovery of B-PE from *P. cruentum* was performed [16]. From this analysis it was concluded that 72% of the unit production cost corresponded to cost of fixed capital per year, whereas 14% corresponded to cost of manpower. On the other hand, a comparative analysis of multistage versus expanded bed methodology demonstrated that the use of expanded bed methodology greatly reduces the major equipment list as well as the manpower, also doubling the recovery yield [14]. Thus, the join of both factors allows concluding that expanded bed methodology will greatly contribute to reduce the unit cost of producing B-PE, if adequate optimization and scale-up of the processes are achieved.

4. Conclusions

Expanded bed adsorption is a scaleable technique well suited for large scale B-PE recovery from unclarified crude extract. The work presented here shows that the expanded bed step for B-PE purification can be adequately scaled up. The use of a small diameter column for expanded bed adsorption of B-PE can therefore be successfully used for replicating the behavior in larger columns. Flow hydrodynamics and binding capacity are not affected, as is demonstrated by the comparison of bed expansion characteristics and breakthrough curves. The results obtained in a small-scale lab column (e.g. Streamline 15 mm i.d. column) during process optimization predict the results that

will be obtained in a large scale production size column (e.g. Streamline 60 mm i.d. column), thus indicating the potential of small scale expanded beds for use in method development studies.

References

- [1] Glazer AN. Phycobiliproteins. *Meth Enzymol* 1988;167:291–303.
- [2] Wedemayer GJ, Kidd DG, Wemmer DE, Glazer AN. Phycobilins of cryptophyte algae. Occurrence of dyhydroliverdin and mesobiliverdin in cryptomonad biliproteins. *J Biol Chem* 1992;267:7315–31.
- [3] Glazer AN. Phycobiliproteins. In: Cohen Z, editor. *Chemicals from microalgae*. UK: Taylor and Francis Ltd; 1999. p. 262–80.
- [4] Kronick MN, Grossman AR. Immunoassay techniques with fluorescent phycobiliprotein conjugates. *Clin Chem* 1983;29:1582–6.
- [5] Glazer AN, Stryer L. Phycofluor probes. *Trends Biochem Sci* 1984;9:423–7.
- [6] Glazer AN. Phycobiliproteins: a family of valuable, widely used fluorophores. *J Appl Phycol* 1994;6:105–12.
- [7] González R, Rodríguez S, Romay C, Ancheta O, González A, Armesto J, et al. Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats. *Pharmacol Res* 1999;39:55–9.
- [8] Rimbau V, Camins A, Romay C, González R, Pallán M. Protective effects of C-phycocyanin against Kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 1999;276:75–8.
- [9] Huang B, Wang GC, Zeng CK, Li ZG. The experimental research of R-phycoerythrin subunits on cancer treatment: a new photosensitizer in PDT. *Cancer Biother Radiopharm* 2002;17(1):35–42.
- [10] Dainippon Ink and Chemicals Inc. Japanese Patent 95 770 (1979).
- [11] Dainippon Ink and Chemicals Inc., Japanese Patent 06: 691 (1987).
- [12] Arad S, Yaron A. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends Food Sci Technol* 1992;3:92–7.
- [13] Akhilender K, Sarada R, Manoj G, Khan MY, Mahadeva M, Viswanatha S, et al. Toxicity assessment of phycocyanin. A blue colorant from blue green alga *Spirulina platensis*. *Food Biotechnol* 1999;13:51–6.
- [14] Bermejo R, Tobaruela D, Talavera EM, Orte A, Alvarez-Pez JM. Fluorescent behaviour of B-phycoerythrin in microemulsiones of aerosol OT/water/isooctane. *J Colloid Interface Sci* 2003;263:616–24.
- [15] Ayyagari M, Pande R, Kamtekar S, Gao H, Marx K, Kumar J, et al. Molecular assembly of proteins and conjugated polymers: toward development of biosensors. *Biotechnol Bioeng* 1995;45:116–21.
- [16] Bermejo R, Fernández E, Alvarez-Pez JM, Talavera EM. Labeling of cytosine residues with biliproteins for use as fluorescent DNA probes. *J Luminesc* 2002;99:113–24.
- [17] Ficner R, Lobeck K, Schmidt G, Huber R. Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of B-phycoerythrin from the red alga *Porphyridium sordidum* at 2.2 Å resolution. *Mol Biol* 1992;228:935–50.
- [18] Bermejo R, Talavera EM, Alvarez-Pez JM, Orte JC. Chromatographic purification of phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. High-performance liquid chromatographic separation of their alpha and beta subunits. *J Chromatogr A* 1997;778:441–50.
- [19] Bermejo R, Talavera EM, Alvarez-Pez JM. Chromatographic purification and characterization of B-Phycocyanin from *Porphyridium cruentum*.

- Semipreparative HPLC separation and characterization of its subunits. *J Chromatogr A* 2001;917:135–45.
- [20] Bermejo R, Alvarez-Pez JM, Ación FG, Molina E. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *J Biotechnol* 2002;93:73–85.
- [21] Boussiba S, Richmond AE. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Arch Microbiol* 1979;120:155–9.
- [22] Jung TM, Dailey MO. A novel and inexpensive source of allophycocyanin for multicolor flow cytometry. *J Immunol Meth* 1989;121:9–18.
- [23] 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;90:153–61.
- [24] Duerring M, Schmidt GB, 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* 1991;217:577–92.
- [25] Tchernov AA, Minkova KM, Houbavenska NB, Kovacheva NG. Purification of phycobilioproteins from *Nostoc* sp. by aminoethyl-Sepharose chromatography. *J Biotechnol* 1999;69:69–73.
- [26] Saxena AM. Phycocyanin aggregation. A small angle neutron scattering and size exclusion chromatographic study. *J Mol Biol* 1988;200:579–91.
- [27] Gombos Z, Csizmadia V, Csatorday K. Two simple procedures for isolation of Allophycocyanin II from *Anacystis nidulans*. *Anal Biochem* 1984;136:491–2.
- [28] Schoeember RW, Leung S, Lundell D, Glazer AN, Rapoport H. Chromopeptides from phycoerythrins. Structure and linkage of a phycoerythro-bilin tryptic tripeptide derived from a B-phycoerythrin. *J Am Chem Soc* 1983;105:4072–6.
- [29] D'Agno E, Rizzo R, Paoletti S, Murano E. R-phycoerythrin from the red alga *Gracilaria longa*. *Phytochemistry* 1994;35:693–6.
- [30] Rosano R, Húngaro N, D'Ambrosio A, Liuzzi GM, Riccio P. Extracting and purifying R-phycocyanin from Mediterranean red algae *Corallina elongata*. *J Biotechnol* 2003;101:289–93.
- [31] Chase HA. Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. *Trends Biotechnol* 1994;12:296–303.
- [32] Willoughby NA, Hjorth R, Titchener-Hooker NJ. Experimental measurement of particle size distribution and voidage in an expanded bed adsorption system. *Biotechnol Bioeng* 2000;69:648–53.
- [33] Karau A, Benken C, Thommes J, Kula MR. The influence of particle size distribution and operating conditions on the adsorption performance in fluidized beds. *Biotechnol Bioeng* 1997;55:54–64.
- [34] Chang YK, Chase HA. Development of operating-conditions or protein-purification using expanded-bed techniques: the effect of the degree of bed expansion on adsorption performance. Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. *Biotechnol Bioeng* 1996;49:512–26.
- [35] Chang YK, Chen YH, Chien CH. Simple two-step procedure for purification of cloned small sialidase from unclarified *E. coli* feedstocks. *Enzyme Microbiol Technol* 1998;23:204–10.
- [36] 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;67:206–16.
- [37] Wang G. Isolation and purification of phycoerythrin from red alga *Gracilaria verrucosa* by expanded-bed-adsorption and ion-exchange chromatography. *Chromatographia* 2002;56:509–13.
- [38] 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.
- [39] Bermejo R, Ación 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. *J Chromatogr B* 2003;790:317–25.
- [40] Ghose S, Chase HA. Expanded bed chromatography of proteins in small diameter columns. I. Scale down and validation. *Bioseparation* 2000;9:21–8.
- [41] Ghose S, Chase HA. Expanded bed chromatography of proteins in small diameter columns. II. Method developments and scale-up. *Bioseparation* 2000;9:29–36.
- [42] Willoughby N, Martin P, Titchener-Hooker N. Extreme scale-down of expanded bed adsorption: purification of an antibody fragment directly from recombinant *E. coli* culture. *Biotechnol Bioeng* 2004;87(5):641–7.
- [43] Wheelwright SM. Protein purification. Design and scale up of downstream processing. John Wiley & Sons, Inc.; 1994, ISBN 0-471-03723-0.
- [44] Fernandez-Lahore HM, Kleef R, Kula MR, Thommes J. The influence of complex biological feedstock on the fluidisation and bed stability in expanded bed adsorption. *Biotechnol Bioeng* 1999;64:484–96.
- [45] Fernandez-Lahore HM, Geilenkirchen S, Boldt K, Nagel A, Kula MR, Thommes J. The influence of cell adsorbent interactions on protein adsorption in expanded beds. *J Chromatogr A* 2000;873:195–208.
- [46] Fernandez-Lahore HM, Lin DQ, Hubbuch JJ, Kula MR, Thommes J. The use of ionselective electrodes for evaluating residence time distributions in expanded bed adsorption systems. *Biotechnol Prog* 2001;17:1128–36.
- [47] Lin DQ, Fernandez-Lahore HM, Kula MR, Thommes J. Minimising biomass/adsorbent interactions in expanded bed adsorption processes—a methodological design approach. *Bioseparation* 2001;10:7–19.
- [48] Camacho F, Ación FG, Sánchez JA, García F, Molina E. Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. *Biotechnol Bioeng* 1999;62:71–86.
- [49] Bennet A, Bogorad L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green algae. *J Cell Biol* 1973;58:419–22.
- [50] Bryant DA, Guglielmi G, Tandeu de Marsac N, Castets AM, Cohen-Bazire G. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Arch Microbiol* 1979;123:113–27.
- [51] Güzeltunc E, Ülgen KÖ. Recovery of actinorhodin from fermentation broth. *J Chromatogr A* 2001;914:67–76.
- [52] Barnfield Frej AK, Hjorth R, Hammerström A. Pilot scale recovery of recombinant annexin V from unclarified *Escherichia coli* homogenate using expanded beds. *Biotechnol Bioeng* 1994;44:922–9.