



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Escuela Politécnica Superior de Linares

Trabajo Fin de Grado

**PURIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN
FISICOQUÍMICA DE
PROTEÍNAS PROCEDENTES
DE MICROALGAS MARINAS.
APLICACIÓN COMO
COLORANTE.**

Alumno: Lilian García Vizcaíno

Tutor: Prof. D. Ruperto Bermejo Román

Depto.: Química Física y Analítica

Julio, 2018



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Escuela Politécnica Superior de Linares

Trabajo Fin de Grado

**PURIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN
FISICOQUÍMICA DE
PROTEÍNAS PROCEDENTES
DE MICROALGAS MARINAS.
APLICACIÓN COMO
COLORANTE.**

Firma de alumno
Lilian García Vizcaino

BERMEJO
ROMAN
RUPERTO -
26475906
P

Firmado digitalmente por
BERMEJO ROMAN RUPERTO
- 26475906P
Nombre de reconocimiento
(DN): c=ES,
serialNumber=IDCES-26475
- 906P,
givenName=RUPERTO,
sn=BERMEJO ROMAN,
cn=BERMEJO ROMAN
RUPERTO - 26475906P
Fecha: 2018.08.29 22:01:45
+02'00'

Firma del tutor
Prof. D. Ruperto Bermejo

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Interés práctico de las microalgas	2
2.2 Aplicaciones industriales	2
2.2.1 <i>Alimentación</i>	2
2.2.2 <i>Medicina e industria farmacéutica</i>	4
2.2.3 <i>Uso cosmético</i>	4
2.2.4 <i>Fuente de productos químicos naturales</i>	4
2.2.5 <i>Producción de biocombustibles</i>	5
2.3 Biliproteínas	5
2.3.1 <i>Generalidades</i>	5
2.3.1.1 <i>Estructura</i>	5
2.3.1.2 <i>Adaptación a la luz filogenética</i>	7
2.3.1.3 <i>Composición de polipéptidos y cromóforos de las ficobiliproteínas</i>	8
2.3.1.4 <i>Ficobilisomas</i>	9
2.3.2 <i>Propiedades relevantes para sus distintas aplicaciones</i>	11
2.3.2.1 <i>Propiedades espectroscópicas</i>	13
2.3.2.1.1 <i>Propiedades absorciométricas</i>	13
2.3.2.1.2 <i>Propiedades espectrofluorimétricas</i>	14
2.3.2.2.1 <i>Regla o Ley de Stokes</i>	15
2.3.2.2 <i>Punto isoeléctrico y estabilidad de los oligómeros</i>	16
2.4 Aplicaciones	16
2.4.1 <i>Colorantes naturales</i>	16
2.4.2 <i>Marcadores fluorescentes</i>	17
2.4.2.1 <i>Fluoróforos</i>	17
2.4.3 <i>Otras aplicaciones</i>	18
2.4.3.1 <i>Industria farmacéutica</i>	18
2.5 Ficocianina	19
2.5.1 <i>Métodos de extracción y purificación</i>	20
2.5.2 <i>Propiedades espectroscópicas</i>	21
2.5.3 <i>Estructura y composición de aminoácidos</i>	22
2.5.5 <i>Estabilidad de C-PC</i>	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1 Materiales	24

3.1.1	<i>Microalgas</i>	24
3.2	Métodos	26
3.2.1	<i>Obtención del extracto de biliproteínas</i>	26
3.2.1.1	<i>Extracción mediante choque osmótico</i>	26
3.2.1.2	<i>Purificación y precipitación con sulfato amónico</i>	27
3.2.1.3	<i>Diálisis del extracto</i>	28
3.2.2	<i>Preparación de las disoluciones tampón</i>	29
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1	Caracterización del extracto	38
4.2	Obtención del extracto de colorante azul	39
4.2.1	<i>Optimización de la obtención del extracto</i>	39
4.2.1.1	<i>Optimización del número de etapas de extracción</i>	39
4.2.1.2	<i>Influencia del pH</i>	42
4.2.1.3	<i>Influencia de la fuerza iónica</i>	43
4.3	Caracterización físico-química de la proteína	45
4.3.1	<i>Influencia del pH en la absorbancia de la proteína en el extracto</i>	45
4.3.2	<i>Influencia del pH en la fluorescencia de la proteína en el extracto</i>	47
4.3.3	<i>Determinación del coeficiente de extinción molar de ficocianina pura</i>	50
4.3.4	<i>Aplicación del extracto de ficocianina a la bebida isotónica upGrade</i>	51
4.3.4.1	<i>Determinación del factor de tinción</i>	52
5.	CONCLUSIONES	55
6.	BIBLIOGRAFÍA	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1.....	9
Tabla 2.2.....	14
Tabla 3.1.....	32
Tabla 4.1.....	39
Tabla 4.5.....	46
Tabla 4.6.....	49
Tabla 4.7.....	50
Tabla 4.8.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.....	6
Figura 2.2.....	7
Figura 2.3.....	8
Figura 2.4.....	20
Figura 3.5.....	34
Figura 3.6.....	36
Figura 4.7.....	45
Figura 4.8.....	47
Figura 4.9.....	48
Figura 4.10.....	49
Figura 4.11.....	51
Figura 4.12.....	52
Figura 4.13.....	52

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 3.1	29
Ecuación 3.2	30
Ecuación 3.3	30
Ecuación 3.4	30
Ecuación 3.5	30
Ecuación 3.6	30
Ecuación 3.7	30
Ecuación 3.8	30
Ecuación 3.9	30
Ecuación 3.10	31
Ecuación 3.11	31
Ecuación 3.12	31
Ecuación 3.13	31
Ecuación 3.14	34
Ecuación 3.15	34
Ecuación 3.16	35
Ecuación 3.17	36

ABREVIATURAS

ADN ácido desoxirribonucleico

ALA alanina

APC aloficocianinas

Ar argón

B-PE B-ficoeritrina

CCl₄ tetracloruro de carbono

CIELAB espacio de color

C-PC C-ficocianina

CO monóxido de carbono

CO₂ dióxido de carbono

CoX-2 agente de células tumorales

CTAB bromuro de cetiltrimetilamonio

CVB ficoviolobilina

DHA ácido docosahexaenoico

EPA ácido eicosapentaenoico

FRET transferencia de energía por resonancia de fluorescencia

GFP proteínas fluorescentes verdes

HA hidroxiapatita

HDL colesterol de lipoproteína de alta densidad

HSV virus de herpes simple

KCl cloruro de potasio

L_C polipéptidos

L_{CM} polipéptidos de anclaje

LDL colesterol de lipoproteínas de baja densidad

L_R polipéptidos enlazadores

ME metabolitos extracelulares

N nitrógeno

O₂ oxígeno

P fósforo

PBP ficobiliproteínas

PBS ficobilisomas

PCB ficocianobilina

PE ficoeritrinas

PEB ficoeritrobilina

PUB ficourobilina

PUFA ácidos grasos poli-insaturados

PXB ficobiliviolina

R-PE R-ficoeritrina

SIDA síndrome de inmunodeficiencia humana

1. RESUMEN

Las ficobiliproteínas son componentes de colores brillantes y altamente fluorescentes. Se obtienen de microalgas que han evolucionado biológicamente generando productos del metabolismo celular de gran interés por sus aplicaciones. Debido a sus propiedades colorantes, naturaleza no tóxica y fácil disponibilidad, el pigmento de biliproteínas además de ser útil en la industria farmacéutica, de cosméticos y en investigaciones biomédicas, se ha comenzado a utilizar en la industria alimentaria en sustitución de los colorantes de origen químico, teniendo como limitantes, la gama de colores que es posible obtener y la inversión de recursos que son necesarios en la investigación y producción para su obtención, de ahí la necesidad de encontrar vías de bajo coste y que sean eficientes para su extracción y purificación.

Este trabajo se propuso encontrar las mejores condiciones de operación para la obtención de la biliproteína ficocianina C-PC, proveniente del alga *Spirulina Platensis* para su uso como colorante alimentario. El proceso consistió en una etapa de extracción mediante choque osmótico, en la cual se evaluaron las variables de proceso: número de extracciones necesarias, influencia del pH del medio de extracción e influencia de la fuerza iónica con el objetivo de encontrar los parámetros operacionales que condujeran a la mayor obtención de ficocianina. El extracto fue sometido a procesos de purificación parcial como precipitación con sulfato de amonio y diálisis. Seguidamente se procedió a la caracterización físico-química de la proteína; determinando parámetros espectroscópicos de absorción y fluorescencia. Finalmente se comprobó la capacidad colorante de la proteína empleando un espectrocólorímetro que trabaja en el espacio CIELAB, cuyos resultados permitieron comparar en cuánto se asemejaba el color después de añadir cantidades conocidas de ficocianina a una matriz de bebida isotónica, con el de una de la misma marca que posee un colorante sintético azul.

2. ANTECEDENTES

2.1 Interés práctico de las microalgas

Los organismos marinos representan una valiosa fuente de nuevos compuestos. La biodiversidad del ecosistema marino y la diversidad química asociada, constituyen un recurso prácticamente ilimitado de nuevas sustancias activas en el campo del desarrollo de productos bioactivos (1). Entre estos organismos se encuentran las microalgas que son microorganismos procariotas (cianobacterias) o eucariotas fotosintéticos que crecen rápidamente y tienen la capacidad de vivir en diferentes ambientes debido a su estructura unicelular o multicelular simple. Existen en diversos ecosistemas acuáticos y terrestres (2).

La ventaja principal que tienen las microalgas con respecto a otros organismos es que son fotoautótrofos por lo que no necesitan de sustancias orgánicas para adquirir energía permitiendo que su cultivo a gran escala sea teóricamente más simple y barato. Estos microorganismos también son una fuente de moléculas muy valiosas como proteínas, PUFA (ácidos grasos poli-insaturados), pigmentos fotosintéticos y polisacáridos (3, 4). Esos compuestos tienen gran variedad de usos en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética, debido a sus numerosas propiedades antioxidantes, siendo además algunas de ellas anticancerígenas, antihipertensivas e inmunomoduladoras, jugando también un papel en la prevención de enfermedades cardiovasculares (5).

2.2 Aplicaciones industriales

2.2.1 Alimentación

El alto contenido en proteínas de varias especies de microalgas y su patrón de aminoácidos, que se compara favorablemente con el de otras proteínas alimentarias, es un buen respaldo de las microalgas como fuente alternativa de proteínas (6, 7). La microalga *Spirulina*, por ejemplo, es rica en proteínas (60-70% dependiendo de la cepa) y no solo posee todos los aminoácidos esenciales, sino que estos aminoácidos tienen una excelente biodisponibilidad (8). Por otra parte, la microalga *Dunaliella* tiene un crecimiento a escala industrial que puede generar un extracto de proteína a una productividad 100 veces mayor que la reportada en la agricultura y 50 veces mayor que en la acuicultura (9).

El contenido lipídico promedio de las células de algas varía entre 1 y un 70%, pero puede alcanzar el 90% del peso seco en ciertas condiciones (10). Los lípidos algales están compuestos de glicerol, azúcares o bases esterificados a ácidos grasos saturados o insaturados (11). De acuerdo con Mendes y col. (12), los principales constituyentes de

las fracciones lipídicas de *Chlorella vulgaris* son los ácidos oleicos, palmíticos y linolénicos, que representan el 41%, 22% y 9% de la cantidad total, respectivamente. Además, los ácidos palmíticos, linolénicos y oleicos representan más del 85% del contenido total de ácidos grasos de *Dunaliella salina* (13), por otra parte la microalga verde, *Haematococcus*, ha demostrado contener ácidos grasos de cadena corta con actividad antimicrobiana (14).

Los complejos de polisacáridos de *Chlorella pyrenoidosa*, y *Chlorella ellipsoidea*, contienen glucosa y cualquier combinación de galactosa, ramnosa, manosa, arabinosa, N-acetilglucosamida y N-acetilgalactosamina. Se piensa que estos complejos tienen propiedades inmunoestimulantes, y pueden inhibir la proliferación de *Listeria monocytogenes* y *Candida albicans* (15). El elemento más importante en *Chlorella* es el β -1,3-glucano, que es un inmunoestimulador activo, un eliminador de radicales libres y un reductor de los lípidos en la sangre. Nuevos polisacáridos, aislados de *Porphyridium* han exhibido una potente actividad antiviral contra el virus del herpes simple (HSV-1 y 2) tanto *in vitro* como *in vivo* (16, 17).

Los colorantes orgánicos carotenoides juegan un papel protector en la prevención de la formación de especies reactivas del oxígeno. El β -caroteno es uno de los principales colorantes alimentarios del mundo y se ha aplicado a una amplia gama de productos y bebidas para mejorar su apariencia ante los consumidores (18).

Las microalgas son los productores iniciales de EPA y DHA en la cadena alimentaria marina y pueden crecer rápidamente bajo una variedad de condiciones de cultivo autotróficas, mixotróficas y heterotróficas con alto potencial de producción de ácidos grasos omega-3 de cadena larga (19). Se conoce que la ingestión de omega-3 es muy beneficiosa para la salud pues ayuda a prevenir patologías cardíacas, regulan la presión arterial, reducen el colesterol alto y alivian el dolor en las articulaciones, la migraña y la depresión. Las microalgas como alimentos también representan una valiosa fuente de casi todas las vitaminas (A, B1, B2, B6, B12, C, E, nicotinato, biotina, ácido fólico y ácido pantoténico)(3).

Alimentación animal

Microalgas como *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis*, *Chaetoceros muelleri*, *Chaetoceros gracilis* y *P. tricornutum* han sido utilizadas durante mucho tiempo en la acuicultura como fuente de alimento directo o indirecto en criaderos para proporcionar excelentes condiciones nutricionales para peces, mariscos y camarones cultivados en edades tempranas (20, 21).

2.2.2 Medicina e industria farmacéutica

En las industrias nutraceuticas, *Arthrospira (Spirulina)* y *Chlorella* son las especies más importantes en comercialización como alimentos saludables y suplementos nutricionales con diversos beneficios para la salud que incluyen mejorar la actividad del sistema inmunitario, efectos antitumorales y promoción del crecimiento animal, debido a sus abundantes proteínas, vitaminas, polisacáridos activos y otros compuestos importantes (22, 23). Por ejemplo, la adenosina de *Phaeodactylum tricornutum*, puede actuar como un agente antiarrítmico para el tratamiento de la taquicardia y el metabolito del alga verde caulerpa ha sido presentado en estudios de actividades antituberculosas (24, 25).

Wijesekara y col. (26) informaron que los polisacáridos sulfatados de algas tienen potentes capacidades para el desarrollo de nuevos productos contra el cáncer en la industria farmacéutica y alimentaria. De hecho, varios estudios de ratones *in vivo* han demostrado la actividad antitumoral de los polisacáridos de base marina (27-32).

El colesterol de lipoproteínas de baja densidad por sus siglas en inglés (LDL) fue significativamente menor en ratas alimentadas con una dieta que contenía *Ulva* rígida (33), mientras que Oben y col. (34) encontraron que las personas a las que se les administró una infusión de algas mostraron niveles más bajos de colesterol total, colesterol LDL y triglicéridos, y valores más altos de colesterol de lipoproteína de alta densidad por sus siglas en inglés (HDL) que los que recibieron un placebo de agua.

2.2.3 Uso cosmético

Los ejemplos incluyen a los polisacáridos de cianobacterias utilizados en productos para el cuidado personal de la piel y extractos de *Chlorella sp.* que contienen oligopéptidos que pueden promover la firmeza de la piel (35). Las biliproteínas se usan como se ha mencionado anteriormente como colorantes naturales en cosmética (delineador de ojos y lápiz labial) (3, 36).

2.2.4 Fuente de productos químicos naturales

Los metabolitos extracelulares (ME) de las microalgas tienen importantes significados ecológicos. Las excreciones en el espacio pericelular determinan, en gran medida, el curso de las interacciones alelopáticas entre microalgas y otros microorganismos (37). Algunos compuestos alelopáticos de microalgas se utilizan como herbicidas respetuosos del medio ambiente o agentes de control biológico con perspectivas directas para su uso biotecnológico (38). Algunos polisacáridos extracelulares de microalgas tienen diversas bioactividades que implican actividad

antitumoral, antiinflamatoria y antiviral, proporcionando perspectivas prometedoras para aplicaciones farmacéuticas (39).

Los pigmentos fotosintéticos se clasifican en 3 grupos: carotenoides, ficobiliproteínas y clorofilas. El carotenoide más común es el β -caroteno extraído de *Dunaliella salina*. Se utiliza principalmente en la industria alimentaria como colorante alimentario natural y como provitamina A (9). El segundo carotenoide más importante de las microalgas es la astaxantina, que se encuentra en la microalga verde *Haematococcus pluvialis*. Se usa en acuicultura como un colorante rojo natural para la carne de salmón cultivado (40). Las ficobiliproteínas son complejos de proteínas y pigmentos. Esos pigmentos pueden ser ficocianobilina (pigmento azul) o ficoeritrobilina (pigmento rojo) (5). Las clorofilas son pigmentos verdes que se encuentran en organismos fotoautótrofos (plantas, algas y cianobacterias). La clorofila se usa principalmente en la industria alimentaria como colorante natural en alimentos y bebidas (41).

2.2.5 Producción de biocombustibles

Las algas son un material rentable y proporcionan un rendimiento relativamente alto de biocombustible. Su ventaja indudable es el hecho de que no son una carga para el medio ambiente y que son biodegradables. El cultivo de algas para la energía reduce la amenaza del calentamiento global, ya que contribuye a la limitación del consumo de combustibles fósiles y utiliza grandes cantidades de CO_2 para su producción (42). El biodiesel producido a partir de algas no contiene azufre, por lo que desempeña un papel en la reducción de emisiones de CO, hidrocarburos y SO_x , aunque puede aumentar el nivel de emisión de NO_x (43). El uso de microalgas para la producción de biocombustibles también puede tener otros aspectos, por ejemplo, la eliminación de CO_2 producido por la industria a través de bioaglutinantes por microalgas, lo que reduciría la emisión de gases de efecto invernadero por las fábricas y las usaría para la producción de biodiesel (44); purificación de aguas residuales a través de la eliminación de NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} y la utilización de las aguas contaminadas para algas en crecimiento (44); transformación de la biomasa de algas remanente después de la extracción de petróleo, en etanol, metano, forraje animal, fertilizante orgánico con una alta relación N:P.

2.3 Biliproteínas

2.3.1 Generalidades

2.3.1.1 Estructura

Las ficobiliproteínas o biliproteínas (PBP) son un grupo de proteínas con grupos cromóforos lineales unidos covalentemente a la cadena de la apoproteína (45, 46). En las

cianobacterias y las algas rojas, las ficobiliproteínas están organizadas en complejos supramoleculares, llamados ficobilisomas (PBS) (47-50). Los ficobilisomas, que representan casi el 80% de la masa de biliproteínas (51), son proteínas pigmentarias que consisten en una estructura de proteínas con un cromóforo unido covalentemente (una cadena lineal de tetrapirrol) (52). Estudios demostraron que los ficobilisomas tienen un papel en la optimización de las características de absorbancia y la transferencia de energía de las PBP para favorecer un flujo de energía unidireccional desde las PBP periféricos hacia los centros de reacción a través del núcleo de los PBS (53). Además de la acción de recolección de luz, los PBS son importantes en los mecanismos de protección bajo altas irradiaciones (54). Las ficobiliproteínas son solubles en agua, muy estables a pH fisiológicos y proteínas altamente fluorescentes. Por lo general, se dividen en tres grupos separados en función de su color y propiedades de absorción, ficoeritrinas (PE), ficocianinas (PC) y aloficocianinas (APC). Las PE poseen color rosa brillante, las PC son de color azul cobalto oscuro y las APC son de color azul turquesa más brillante. Los máximos de absorción son 540-570 nm, 610-620 nm y 650-655 nm para PE, C-PC y APC, respectivamente (45, 48, 55-60) ver Figuras 2.1 y 2.2.

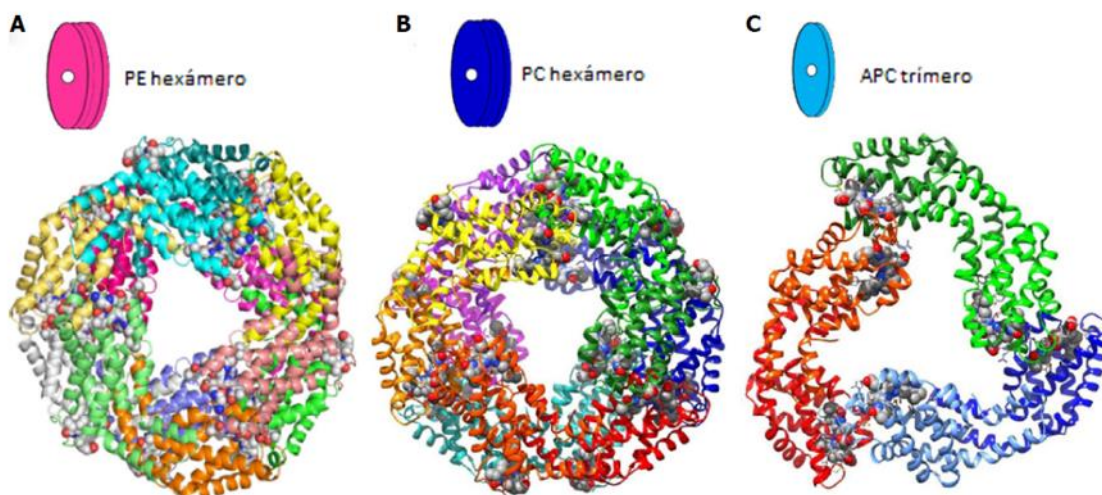


Figura 2.1

La ficobiliproteína se compone principalmente de discos hexaméricos y triméricos de ficobiliproteínas. Diagrama esquemático y modelo de cinta de la estructura de A (izquierda): Ficoeritrina-hexámero; B (centro): Ficocianina hexámero; C (derecha): Aloficocianina-trímero (61).

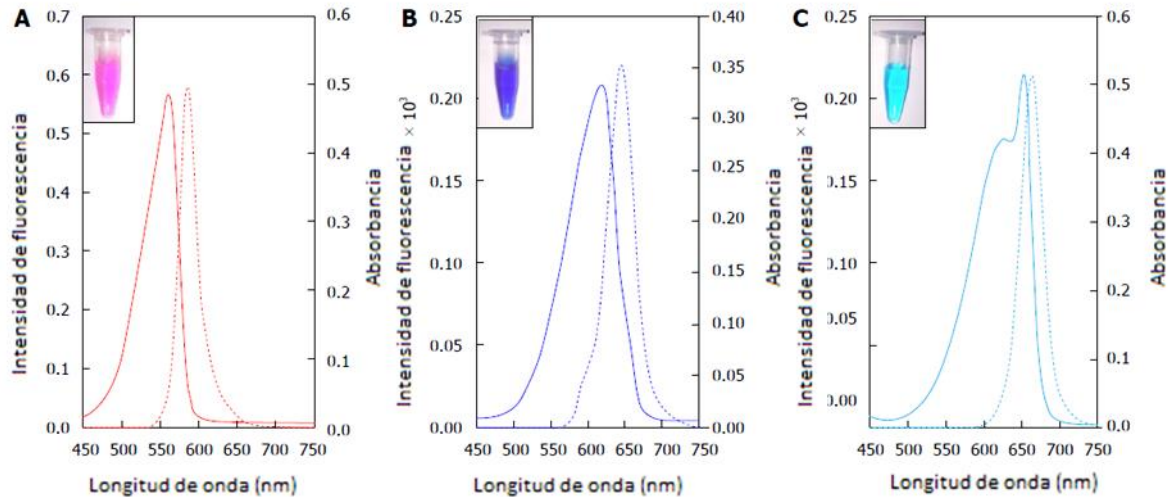


Figura 2.2

Espectros de absorbancia UV-visible (línea continua) y emisión de fluorescencia (línea de puntos) y apariencia (recuadro) de A-izquierda: ficoeritrina, B-centro: ficocianina y C-derecha: aloficocianina (61).

2.3.1.2 Adaptación a la luz filogenética

La diferencia en la distribución de grupos de algas de acuerdo con la profundidad del mar se llama adaptación filogenética a la luz. Este es uno de los conceptos básicos de algología marina. Se formó durante el estudio de las profundidades marinas donde se localizan las algas rojas bentónicas, que tienen un alto contenido de R-ficoeritrina (tipo de ficobiliproteínas). Las ficoeritrinas se adaptan idealmente a los cambios en la intensidad de la luz y la composición espectral de la luz, cambiando a una región verde de espectro con profundidad creciente. Debido a los amplios espectros de absorción (Figura 2.3), las PBP tienen algunas ventajas sobre otros pigmentos fotosintéticos adicionales a diferentes profundidades (62). Junto con la profundidad, la estratificación de la especie depende de la turbidez, la turbulencia, la salinidad del agua, las capacidades del talo para adherirse al sustrato y la resistencia a la sequedad y la fotoinhibición. Esta es la razón por la cual los mares se caracterizan por tener comunidades florales y estrategias livianas que permitieron a diferentes grupos de micro y macroalgas competir con las algas rojas y las cianobacterias (63).

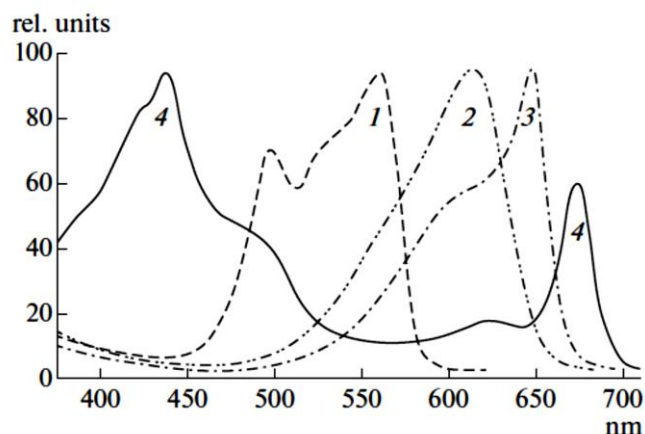


Figura 2.3

Espectros de absorbancia (unidad relativa) R-ficoeritrina (1), C-ficocianina (2) y aloficocianina (3) en comparación con los espectros de clorofila (4) en la membrana del tilacoide, que explican la dirección de la migración de energía a los PBS.

2.3.1.3 Composición de polipéptidos y cromóforos de las ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas se asignan a las proteínas ácidas (el punto isoelectrico está a $\text{pH} \approx 4.5$). Las moléculas de las PBP consisten en subunidades de polipéptidos α y β (proporción 1:1) con pesos moleculares de 16-17 kDa y 18-19 kDa, respectivamente. No hay puentes disulfuro entre dos subunidades. De acuerdo con los datos sobre la estructura primaria, las subunidades α y β son homólogas. El grado de homología de los polipéptidos α y β pertenecientes a una PBP supera el 25-30%. Las más conservadas son las áreas de aminoácidos ubicadas alrededor de residuos de cisteína que están unidos a los cromóforos de ficobilina. Todos los datos sobre la estructura primaria indican la aparición de todos los grupos de PBP debido a la duplicación de un gen ancestral, seguido de la divergencia de la subunidad (64). El signo más importante que permite la consideración de una proteína de pigmento particular como las PBP individuales es la composición del cromóforo. Diferentes ficobilinas se incorporan en el núcleo de la apoproteína de uno a tres cromóforos para un polipéptido α o β (65, 66). Los residuos de cisteína, que forman un enlace con los cromóforos, se fijan fuertemente en la estructura primaria. Los aminoácidos $\text{Cys}\alpha\text{-84}$ y $\text{Cys}\beta\text{-84}$, a los que se pueden agregar otras cisteínas, son obligatorios para unir cualquier PBP con cromóforos. El número de cromóforos en ($\alpha\beta$) 1-monómero se corresponde con la división de ficobiliproteínas en tres clases: aloficocianina que tiene dos cromóforos; las ficocianinas y ficoeritrinocianinas que portan tres cromóforos, y las ficoeritrinas que tienen cinco o seis grupos cromóforos de ficoeritribilina y/o ficourobilina (Tabla 2.1) (65, 66).

Tabla 2.1

Residuos de cisteína y cromóforos asociados a ellos

Ficobiliproteína	Residuos de cisteína y cromóforos asociados a ellos					
	Cys α -75*	Cys α -84	Cys α -143	Cys β -50,61	Cys β -84	Cys β -155
Aloficocianina		PCB**			PCB	
C-ficocianina		PCB			PCB	PCB
Ficoeritrocianina		CVB			PCB	PCB
R-I-ficocianina		PCB			PCB	PEB
R-II-ficocianina		PEB			PCB	PEB
R-III-ficocianina		PUB			PCB	PCB
Ficoeritricinas clase I***		PEB/ PUB	PEB/ PUB	PEB/ PUB	PEB	PEB/ PUB
Ficoeritricinas clase II	PEB/PUB	PEB/ PUB	PEB/ PUB	PEB/ PUB	PEB	PEB

*Residuos de cisteína asociados a cromóforos en PBP α - y β -polipéptidos son mostrados como Cys α - y Cys β - con la numeración del residuo en la cadena polipeptídica.

**Abreviación del cromóforo: PCB- ficocianobilina, PEB-ficoeritrobilina, PUB-ficourobilina, CVB-ficoviolobilina (cripto-viobilina)

***Ficoeritricinas de clase I son C- y CU-ficoeritricinas que contienen cinco cromóforos en ($\alpha\beta$)₁-monómero, Ficoeritricinas de clase II, ficoeritricinas con seis cromóforos

2.3.1.4 Ficobilisomas

Las PBP se encuentran en células en forma de complejos gigantes de PBS de proteína-pigmento que se unen al lado externo de la membrana tilacoidal interna en forma de gránulos con una masa molecular de 3000-7000 kDa (67). Los PBS se extraen de las células dañadas por ultracentrifugación mediante un gradiente de densidad de sacarosa (68). Al ser microcomplejos, los PBS se construyen a partir de cilindros ensamblados, que a su vez consisten en trímeros apilados y discos PBP hexámeros. La mayoría de las cianobacterias tienen los PBS de forma hemidiscoidal. En el centro de un PBS, hay tres cilindros paralelos de 12-15 nm de longitud, que tienen en su sección transversal un núcleo triangular compartido que contiene cuatro trímeros de aloficocianina (APC) en cada cilindro. Seis cilindros perpendiculares y más largos formados por otros PBP están dispuestos en un semicírculo y un extremo contra ellos. La parte trihedral central de un PBS se llama núcleo, y el periférico se llama, de acuerdo con su apariencia, cilindros

laterales (69). El orden de ensamblaje de los discos de PBP en cilindros está determinado por varios polipéptidos enlazadores, que comprenden 12-15% de la cantidad total de proteína de PBS (51). Los enlazadores L_R con una masa molecular de 35 kDa son los responsables del orden de apilamiento de hexámeros en los cilindros laterales. Los polipéptidos L_{RT} con una masa molecular de 10 kDa terminan la extensión de los cilindros. Los enlazadores L_{RC} con una masa molecular de aproximadamente 27 kDa median la asociación entre los extremos de los cilindros laterales y el núcleo de los PBS. Los polipéptidos L_C con una masa molecular de 7-9 kDa están en los extremos de los cilindros del núcleo. Dos polipéptidos de anclaje de L_{CM} con una masa molecular de 77-130 kDa están implicados en el ensamblaje del núcleo y las interacciones entre el núcleo y la membrana del tilacoide (70). Las proteínas ligadoras son en su mayoría polipéptidos incoloros, pero el polipéptido L_{CM} tiene un cromóforo de ficobilina. Los genes de los polipéptidos enlazadores tienen un marco de lectura con genes que codifican polipéptidos α y β (51, 70). La longitud de los seis cilindros laterales de un PBS de forma hemicordeidal varía de uno a cuatro o cinco o incluso siete discos hexámicos, según la especie de cianobacteria y sus condiciones de crecimiento. El núcleo de los PBS tiene un tamaño constante. Se conocen tres tipos morfológicos de núcleo de PBS (71, 72). El núcleo de los PBS de las cianobacterias *Anacystis nidulans* se reduce a dos cilindros de aloficocianinas. El núcleo de *Anabaena variabilis* se incrementa hasta cinco elementos cilíndricos dispuestos en tres capas (2 + 2 + 1). El núcleo de *Gloeobacter violaceus* tiene cinco elementos cilíndricos truncados, en forma de pirámide (3 + 2) ajustados a la membrana del tilacoide. Los PBS de *G. violaceus* se llaman fardos, porque los cilindros laterales se agrupan como dos haces de tres varillas paralelas. El número de cilindros centrales se correlaciona con el peso molecular del polipéptido ancla de LCM de los PBS (70-72).

Los PBS de *Glaucophyta* y una gama de algas rojas unicelulares tienen una forma clásica de medio disco. Los tamaños de los PBS de las algas macrófitas rojas son 2.0-2.5 veces más grandes que las de los hemidiscoidales. Aunque su estructura aún no ha sido totalmente estudiada, se puede suponer que los PBS de algas rojas se forman en la célula como dobles hemidiscoidales (71).

Los PBS y PBP de una célula tienen la misma composición de pigmento. El núcleo de los PBS contiene solo aloficocianina (APC). La variación de la composición del pigmento dentro de las especies ocurre debido a los cilindros laterales. Las PBS de aproximadamente 2/3 de cianobacterias están formadas por C-ficocianina en sí misma, y las PBS están compuestas por dos proteínas de pigmento. Se forman PBS de tres pigmentos debido a la unión de ficoeritrinocianina y/o ficoeritrina a C-ficocianina o C-ficocianina o CU ficoeritrina. Como regla general, el porcentaje de C- y CU-ficoeritrinas

localizadas en las PBS, que imparten un color rojo a las células, es muy alto. En algunas especies de cianobacterias, la C-ficocianina se sustituye por la ficocianina R-II o R-III. Solo hay una variante de cuatro pigmentos de las PBS; aparece cuando C-ficocianina se une con C- y CU-ficoeritrinas en cilindros. Sin considerar cada CU-ficoeritrina conocida, el número total de variaciones de pigmento es igual a cuatro (71).

2.3.2 Propiedades relevantes para sus distintas aplicaciones

Los PBS contienen, en promedio, varios cientos de cromóforos, que absorben la luz y transmiten la energía absorbida a la clorofila. Existe una jerarquía de factores que promueve la absorción de la luz y minimiza la pérdida de energía transferida (73, 74). Entre los factores se incluyen el número de enlaces conjugados en las moléculas de ficobilinas; la forma geométrica de las moléculas de ficobilina en el microambiente proteico; influencia de proteínas ligadoras sobre las propiedades del cromóforo espectral; proximidad de cromóforo y orientación mutua en PBS; presencia de aceptores terminales de energía en el núcleo de los PBS. La localización espectral de las bandas de absorción de los cromóforos de las ficobilinas se define por el número de dobles enlaces conjugados de sus moléculas: cuanto menos sean los enlaces, menor será la longitud de onda de absorción. La banda ficourobilina en la región visible de los espectros de absorción de PBP está a 498 nm, la banda de ficoeritrina está a 560 nm, la banda de ficoviolobilina está a 570 nm, y la banda de ficocianibina está a 620-665 nm. Las bilinas, en comparación con las clorofilas, cambian fácilmente de geometría molecular, obteniendo una forma alargada soportada por fuerzas hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno y puentes de sal entre cromóforos y apoproteínas. Los coeficientes de extinción de ficocobilinas nativas en la región espectral visible son comparables con el coeficiente de extinción de la clorofila en la región de absorción roja o la superan. Las proteínas enlazadoras que entran en contacto con los cromóforos promueven un desplazamiento correctivo (de varios nanómetros) de la onda larga de absorción desde los cilindros laterales hacia el núcleo de PBS (70), que es suficiente para el flujo de energía dirigida. La distancia entre las moléculas de cromóforo en la composición de los PBS varía de 2 a 4-5 nm, lo que proporciona el mecanismo de migración de Förster (74, 75). El flujo de energía absorbida debido a factores de los cambios espectrales y el funcionamiento simultáneo de varios canales de migración entre diferentes parejas de cromóforos en las PBP y en todo los PBS está bien equilibrado. El tiempo de transferencia de energía de cromóforo a cromóforo disminuye de 500 ps en los monómeros a 0.5-1.0 ps en los trímeros y hexámeros, lo que minimiza las pérdidas estimadas para PBS por diferentes métodos espectrales que no son más del 5% (65, 74). En un gran conjunto de

cromóforos, la energía fluye en la dirección del núcleo de los PBS desde los cilindros laterales y luego al centro de reacción fotosintética de acuerdo con el siguiente esquema:

Ficoeritrina → ficocianina → alofococianina → emisores terminales → clorofila.

La presencia de las bandas de los PBS en los espectros de acción de la actividad fotosintética, que se registran de acuerdo con la emisión de O₂, contribuyó al acuerdo general sobre la interacción de los PBS, principalmente con el fotosistema II. La ausencia de proteínas específicas que conectan los PBS y el fotosistema II, los espectros de acción del fotosistema I, que indican la participación de los PBS en su funcionamiento, y una gama de otros datos mostraron que el PBS como antena transmite energía absorbida a ambos fotosistemas (76). La fluorescencia de los PBS nativos, en comparación con su fluorescencia en solución, es mínima, lo que indica la ausencia de PBS en los tilacoides que no están conectados con complejos de fotosistemas. En climas tropicales y subtropicales, la *Spirulina* crece en estanques y depósitos de agua que fluye, lo que hace que la producción sea menos costosa (77).

Las cianobacterias crecen bien en medio alcalino hasta pH 10.5 sin contaminación por otros microorganismos; además, con el uso de estanques poco profundos de 30 cm, las capas superiores de cultivo no sombrean las más bajas (77). La productividad de tales sistemas de aguas alcanza de 3-24 mg C-PC/L por día. En los fotobiorreactores comprende 1.3 g/L por día, que es diez veces mayor que en estanques al aire libre, pero es relativamente más costoso. En todo el mundo, la productividad supera las 5000 toneladas de materia seca por año. C-PC no es el único producto obtenido de la masa celular; carotenoides, biopolímeros y productos de células de bajo peso molecular también son ampliamente utilizados. Cuando se seca la biomasa, el C-PC se desnaturaliza parcialmente, pero el color azul-verde y la actividad biológica de las preparaciones obtenidas se mantienen durante años (78).

Los métodos de extracción de proteínas pigmentarias están bien desarrollados y están estandarizados para todas las proteínas bioquímicas (79, 80). Para estimar el grado de pureza C-PC, se usa el índice A₆₂₀/A₂₈₀. Este caracteriza la relación de la absorbancia del cromóforo a 620 nm a la absorbancia total de la proteína en la preparación a 280 nm. El valor de la pureza C-PC más alta es 6.69 (81); 4.0 corresponde al grado "químicamente puro", 3.9 es grado analítico y 0.7 C-PC es adecuado para uso en la producción de alimentos. Se detectó que C-PC obtenida de especies termófilas es más resistente que la obtenida de especies mesófilas. Para guardar las propiedades químicas de C-PC, se sugirió el uso de microencapsulación (82). Para fines médicos y alimentarios, el uso de azida sódica y ditiotreitól para estabilizar C-PC es inaceptable; el

aditivo de cloruro de sodio y el almacenamiento de la preparación a baja temperatura se utilizan con fines de conservación (83, 84).

El mecanismo establecido por las microalgas para adaptarse al ecosistema les ha conferido propiedades excepcionales, sirven como etiquetas fluorescentes valiosas con numerosas aplicaciones en citometría de flujo, clasificación de células activadas por fluorescencia, histoquímica y, en un grado limitado, en inmunoensayo y detección de especies reactivas del oxígeno. (85)

Las biliproteínas pertenecientes a la familia de los fitocromos que comprenden fotoconmutadores reguladores en las plantas, hongos y muchas bacterias poseen espectros que cubren un rango más amplio que se extiende hasta el infrarrojo cercano y casi ultravioleta. En ambos tipos, los cromóforos se pueden sintonizar modulando las interacciones cromóforo-proteína, incluida la transición entre la fluorescencia y el fotoconmutado. Estas propiedades hacen que las biliproteínas sean útiles para la bioimagen (86).

2.3.2.1 Propiedades espectroscópicas

2.3.2.1.1 Propiedades absorciométricas

Las ficobiliproteínas son los principales pigmentos accesorios fotosintéticos de las cianobacterias y las algas rojas. (87, 88). Dentro de la célula, la energía de la luz atrapada por las ficobiliproteínas se transfiere a la clorofila con una eficacia cercana al 100% (88). La ficocianina y la aloficocianina están presentes universalmente en las cianobacterias, la aloficocianina B aunque aparentemente aparece en la mayoría de las cianobacterias (89, 90) no se detectó en la cianobacteria unicelular *Gloeobacter violaceus* (91). Las ficoeritrinas se distribuyen ampliamente entre todas las agrupaciones taxonómicas y forman la clase más variable espectroscópicamente de ficobiliproteínas (92), ver Tabla 2.2. Muchas, pero no todas, de las cianobacterias que contienen ficoeritrina experimentan un fenómeno adaptativo conocido como adaptación cromática complementaria (93).

Tabla 2.2

Propiedades espectroscópicas de las biliproteínas (94)

Biliproteína	Absorción máxima visible (nm)	Emisión fluorescencia máxima (nm)	Estructura subunidades de formas en ensamble estable	Contenido de cromóforo del promotor ($\alpha\beta$)
Aloficocianina B	671>618	675	$(\alpha\beta)_3$	2 PCB
Alofiacocianina	650	660	$(\alpha\beta)_3$	2 PCB
C-ficocianina	620	640	$(\alpha\beta)_3; (\alpha\beta)_6$	3 PCB
R-ficocianina	617>555	636	$(\alpha\beta)_3; (\alpha\beta)_6$	2 PCB; 1 PEB
Ficoeritrocianina	570>595	625	$(\alpha\beta)_3; (\alpha\beta)_6$	2 PCB; 1 P XB
C-ficoeritrina	560	577	$(\alpha\beta)_3; (\alpha\beta)_6$	5-6 PEB
b-ficoeritrina	545>563	570	$(\alpha\beta)_n$	6 PEB
B-Ficoeritrina	545>563>498	575	$(\alpha\beta)_6\gamma$	6 PEB
R-ficoeritrina	565>540>498	578	$(\alpha\beta)_6\gamma$	ND

2.3.2.1.2 Propiedades espectrofluorimétricas

Debido a su papel en la colección de luz, las ficobiliproteínas han evolucionado para maximizar la absorción y la fluorescencia y minimizar el enfriamiento causado por la transferencia de energía interna o por factores externos como cambios en el pH o la composición iónica (65, 95).

Las ficobiliproteínas tienen varias ventajas cuando se usan como sondas fluorescentes, que incluyen:

- Excitación y emisión intensas de longitud de onda larga para proporcionar fluorescencia que está relativamente libre de interferencia de otros materiales biológicos
- Desplazamientos de Stokes relativamente grandes con rendimientos cuánticos de emisión extremadamente altos
- Fluorescencia que no se apaga con agentes externos porque los fluoróforos están protegidos por la unión covalente a la cadena principal de proteínas
- Muy alta solubilidad en agua

- Estructura homogénea con pesos moleculares definidos
- Múltiples sitios para la conjugación estable a muchos materiales biológicos y sintéticos

Las ficobiliproteínas B-ficoeritrina (B-PE), R-ficoeritrina (R-PE) y alofococianina (APC) se encuentran entre los colorantes preferidos para aplicaciones que requieren alta sensibilidad o detección multicolor simultánea (96-98). Se han informado rendimientos cuánticos de hasta 0.98 y coeficientes de extinción de hasta 2.4 millones de $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para estas proteínas fluorescentes. Sobre una base molar, el rendimiento de fluorescencia es equivalente a al menos 30 moléculas de fluoresceína o 100 rodamina sin extinguir a longitudes de onda comparables. Se ha detectado la fluorescencia de una sola molécula de B-PE (99, 100). Se informa que B-PE es más fotoestable que R-PE, pero la fotoestabilidad de los conjugados de R-PE se puede mejorar agregando 1-galato de propilo (101).

En aplicaciones prácticas tales como citometría de flujo e inmunoensayos, (102, 103) la sensibilidad de los anticuerpos conjugados con B-PE y R-PE suele ser de 5 a 10 veces mayor que la del correspondiente conjugado de fluoresceína (104, 105). Utilizando estreptavidina conjugada con R-PE, los investigadores han detectado menos de 100 anticuerpos biotinilados unidos al receptor por célula mediante citometría de flujo (106).

2.3.2.2.1 Regla o Ley de Stokes

Un cambio en el espectro de absorción de un fluoróforo con respecto al espectro de fluorescencia a longitudes de onda más largas, que se debe a que la energía del fotón emitido es menor que la absorbida, se denomina desplazamiento de Stokes. La razón del cambio es que parte de la energía absorbida por el fluoróforo se pierde en forma de calor antes de la emisión. La descripción del efecto pertenece a G. Stokes (107), que estudió soluciones de las PBP junto con otros compuestos. El desplazamiento de Stokes se tiene en cuenta en muchos dispositivos ópticos en todos los métodos de medición relacionados con la fluorescencia. Las PBP tienen un rendimiento cuántico muy alto. Además, debido a la gran cantidad de cromóforos absorbidos de forma diferente, los espectros de absorción de las PBP son muy amplios, y los espectros de fluorescencia, debido a la emisión de las longitudes de onda más largas de los cromóforos, son estrechos. La fluorescencia de longitud de onda más intensa y más larga en comparación con la absorción se puede observar sin el uso de dispositivos ópticos mediante el examen visual de un tubo de ensayo con las PBP bajo diferentes ángulos. En los informes contemporáneos sobre la migración de energía entre cromóforos de las PBP, la superposición espectral integral entre el espectro de fluorescencia donante y el espectro de absorción del aceptor se

considera de acuerdo con la teoría de Förster, que está directamente relacionada con el concepto del desplazamiento de Stokes (108).

2.3.2.2 Punto isoeléctrico y estabilidad de los oligómeros

Las biliproteínas poseen puntos eléctricos en el rango entre 4.75 y 5.9 para las diferentes subunidades (109, 110) por lo que tienen carga negativa a pH fisiológico.

La estabilidad de los oligómeros, hexámeros de ficoeritrina con una composición en subunidades $(\alpha\beta)_6\gamma$ son muy estables, incluso a concentraciones de proteínas muy bajas, así como los trímeros $(\alpha\beta)_3$ químicamente modificados de aloficocianina, que no se disocian hasta diluciones menores a 10^{-9} M (111).

2.4 Aplicaciones

2.4.1 Colorantes naturales

Las demandas de colorantes naturales en la industria alimentaria, cosmética, farmacia y plásticos para juguetes infantiles aumentan constantemente, lo que puede explicarse por la toxicidad de las sustancias de color sintéticas que se usan en la actualidad. C-PC, al ser un pigmento soluble en agua natural, es preferible a otros tintes naturales del mismo color (gardenia azul e índigo), ya que da un color azul más brillante a los productos (112). El uso de C-PC en la producción de alimentos está limitado solo por la baja popularidad de los productos alimentarios que tienen un color azul. Sin embargo, los resultados positivos observados anteriormente con respecto a la acción inmunoprotectora de C-PC explican el uso de preparaciones de *Spirulina* y una variedad de cianobacterias como suplementos biológicamente activos. Los productores agregan C-PC a productos lácteos fermentados, helados, papas fritas, galletas saladas, bebidas no alcohólicas, cerveza, goma de mascar, postres, incluyendo glaseado de azúcar, mermeladas y barras de frutas y nueces (113). Dichos productos son los más populares en los países de las zonas tropicales y subtropicales: Birmania, Indonesia, Hong Kong, Corea, Malasia, los países del Golfo Pérsico, Japón. Se entregan en cantidades menores desde estos países a los EE. UU., Europa y otros países. En Rusia, los preparativos de *Spirulina* seca son los más populares; se pueden usar en píldoras y cápsulas (114). Por lo tanto, C-PC tiene una función doble en alimentos y suplementos biológicamente activos, como colorante e inmunoestimulador. En cosméticos, C-PC sirve como colorante. Debido a su baja lipofilia, no se usa en cremas y emulsiones basadas en grasa. Además, las restricciones sobre los pigmentos naturales no tóxicos en perfumería y cosmética producen un efecto de color menos pronunciado y tienen menos estabilidad en la piel. Se conocen pastas de dientes, talco de color, polvo de caolín coloreado, lociones corporales y diferentes tipos de jabón y esterilizadores. Estos son cosméticos naturales caros que

tienen una aplicación limitada (115). Se debe notar un hecho curioso: algunas algas rojas se distinguen por un suave y tierno talo. Sus paredes celulares se rompen fácilmente debido al simple prensado, y el protoplasma con un alto contenido de ficoeritrina entra en la solución, que se convierte en un color naranja-rojo que fue utilizado anteriormente por las residentes de las islas Hébridas para crear rubores (116).

2.4.2 Marcadores fluorescentes

2.4.2.1 Fluoróforos

Al lado de las proteínas fluorescentes verdes (GFP), las PBP son fluoróforos naturales de origen proteico. La fluorescencia de C-PC, que se observa directamente en las células, se puede utilizar para controlar el crecimiento de cianobacterias (117), detectar el índice de pureza del agua (118) y analizar estanques de gran altitud (119). Los PBP purificados poseen cualidades que son adecuadas para el análisis fluorescente de alta resolución. Los amplios espectros de absorbancia de las PBP permitieron elegir fácilmente la longitud de onda de excitación y la fotoestabilidad, para utilizar una luz de excitación intensa. La estabilidad adicional de las PBP y PBS se puede lograr mediante reticulación química de cadenas polipeptídicas. En particular, la reticulación de ficoeritrina y aloficocianina permite una extensión máxima de la región de absorción de las preparaciones de proteínas pigmentarias (120). El alto rendimiento cuántico (0.65-0.85) y los altos coeficientes de extinción ($700000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para la ficocianina y aloficocianina), que se deben a la presencia de una gran cantidad de cromóforos en los trímeros y hexámeros de PBP, aumentan la sensibilidad de la medición. La fluorescencia de PBP está en la región del espectro entre 585 nm (ficoeritrina) y 665 nm (aloficocianina), donde la fluorescencia de fondo de los sustratos se reduce o está ausente. Los grandes espectros de fluorescencia de los desplazamientos de Stokes típicos para las PBP disminuyen la entrada de luz dispersa de la luz de excitación. El uso de ficoeritrina y aloficocianina conjugada con fluoróforos de bajo peso molecular, como indo-3-carbocianina (Cy7), permitió un mayor aumento del desplazamiento de Stokes, desplazando la emisión máxima de hasta 780 nm a la región infrarroja (121). Debido a las propiedades de las PBP (incluyendo las PBP de algas criptocéticas de bajo peso molecular) mencionadas anteriormente, encontraron aplicación en histoquímica, citometría de flujo, clasificación celular activada por fluorescencia (clasificación de diferentes células), inmunodiagnóstico fluorescente y detección de macromoléculas. Por lo tanto, PBP conjugado como marcadores fluorescentes con anticuerpos monoclonales, biotina y avidina se presentaron bien en el análisis fluorescente en base a los clasificadores de células (120).

La ficoeritrina, junto con la fluoresceína, se utiliza para el doble etiquetado de anticuerpos. Mientras que la excitación por láser Ar (488 nm) del primer pigmento fluoresce a 580 nm, el segundo es a 525 nm, lo que crea una detección confiable de señal de dos ondas. Tal etiquetado doble se considera prometedor en el diagnóstico de enfermedades oncológicas y SIDA. Además, la ficoeritrina se utiliza como un agente fluorescente en el análisis proteómico y genómico en el diseño de *microarrays* de ADN. La estreptavidina marcada por ficoeritrina proporciona una señal intensa cuando se une a elementos de *microarrays* que contienen regiones de ADN conectadas con biotina (122). Las capacidades analíticas de PBP aumentan cuando se utilizan varios láseres al mismo tiempo y con detección de fluorescencia a 4-6 e incluso a 11 longitudes de onda (123, 124). En tal caso, los fluoróforos con efectos de transferencia de energía resonante en parejas especialmente elegidas tienen mucha perspectiva (pares Förster). La transmisión de energía entre cromóforos PBP se implementa de acuerdo con el mecanismo de Förster, y se realiza el mismo mecanismo de migración de energía, por ejemplo, en conjugados de PBP y la indo-3-carbocianina mencionada anteriormente. Las PBP conjugadas o PBS con puntos cuánticos Cd/ZnS son muy interesantes para la construcción de FRET-par. En comparación con los colorantes químicos, los puntos cuánticos tienen coeficientes de extinción 10-50 veces mayores y una fotoestabilidad 100-200 veces mayor. Esto, en conjunción con PBP abre nuevas posibilidades para el análisis fluorescente (125).

2.4.3 Otras aplicaciones

2.4.3.1 Industria farmacéutica

La búsqueda activa de compuestos biológicamente activos en células de cianobacterias y microalgas condujo al descubrimiento de diferentes propiedades protectoras de las PBP. La mayoría de los datos se refieren a C-PC, que poseen propiedades antioxidantes, neuro y hepatoprotectoras y una gama de otras cualidades, suponiendo su actividad en la prevención de muchas condiciones patológicas causadas por el estrés oxidativo. Las propiedades protectoras de C-PC enumeradas anteriormente se demostraron *in vitro* en cultivos de células y tejidos y también en experimentos con animales, incluido un gusano modelo, *Caenorhabditis elegans* (126). Debido a la alta actividad antioxidante, C-PC a una concentración de 10 μ M puede servir como una trampa para radicales de peróxido, disminuyendo su concentración *in vitro* a la mitad (127, 128). En estudios de ratas, C-PC a una concentración de 500 μ M inhibe la peroxidación lipídica, disminuye la producción de malondialdehído y promueve un efecto hepatoprotector sobre la exposición a CCl_4 . C-PC disminuye la actividad de un agente de células tumorales, conocido como CoX-2, promueve la actividad inflamatoria y antiartrítica

en la artritis inducida por *zymosan* en ratones, e inhibe la agregación plaquetaria, probablemente actuando como inhibidor de la tromboxano sintetasa (129). Las C-PC también influyen en el contenido de citoquinas, estimulando un sistema inmunitario debilitado, por ejemplo, mediante la administración de antibióticos (130). Se han encontrado los efectos de las acciones de PBP que son prometedores para la farmacología clínica (131, 132). Entre ellos se encuentra la inhibición de la nefrotoxicidad, que se produce durante el tratamiento de pacientes oncológicos con cisplatino. La proteína C-PC también inhibe el crecimiento de células de leucemia, disminuye la apoptosis causada por enterovirus, disminuye el nivel de factores de necrosis tumoral en el plasma sanguíneo de ratones y promueve la acción neuroprotectora en el cultivo de células cerebrales de rata. C-PC aumenta la síntesis de enzimas por los riñones y las células del hígado (citocromo P-450, superóxido dismutasa, catalasa, ALA sintasa, aspartato transaminasa), que estimula la función de desintoxicación de estos órganos. Cuando se aplica a la piel, C-PC encerrado en liposomas posee un efecto antiinflamatorio. Muestra también acción neuroprotectora contra la isquemia cerebral. Además, junto con las porfirinas, C-PC puede usarse como fotosensibilizador en la terapia con láser para un cáncer de piel. Se ofreció el mecanismo de la acción protectora de C-PC y otros PBP. Se basa en la similitud de la estructura química de sus cromóforos y bilirrubina, que es el producto de la degradación natural del hemo durante el catabolismo de la hemoglobina (132). La bilirrubina es un antioxidante fisiológico que inhibe la oxidación de proteínas y aminoácidos aromáticos en el plasma sanguíneo y regula el contenido del colesterol. La eliminación mediante formas de oxígeno activo de bilirrubina debido a la formación reversible de un enlace carbono-carbono adicional en la molécula protege la albúmina y otras proteínas plasmáticas. Lo más probable es que esta reacción de restauración de enlace covalente en cromóforos sea la base de la acción protectora de C-PC. Junto con esto, las apoproteínas PBP, que se expresan en células de *Escherichia coli*, también tienen propiedades antioxidantes (127). Por lo tanto, se puede suponer que las C-PC tienen acciones protectoras específicas, así como no específicas. Sus bases moleculares concretas necesitan más aclaraciones (116).

2.5 Ficocianina

La ficocianina de *Spirulina platensis*, es una proteína compuesta por dos tipos de subunidades, α y β , para formar $\alpha_3\beta_3$ y nueve restos de ficocianina como cromóforo (133). La molécula de ficocianina tiene un color azul brillante con el máximo de absorción a 614 nm, o 620 nm aproximadamente (95, 134) ver Figura 2.4.

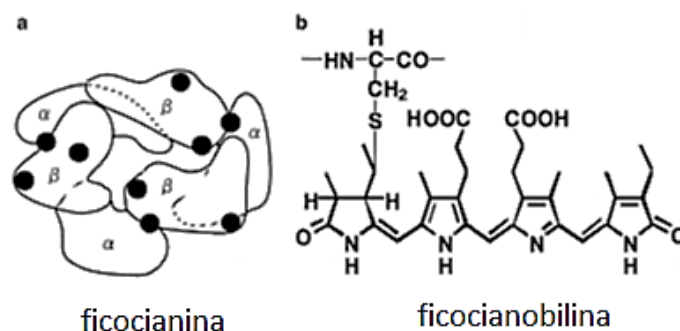


Figura 2.4

Las estructuras de ficocianina (a-izquierda) y ficocianibina (b-derecha). (a) Molécula de ficocianina compuesta por dos tipos de proteínas (subunidades α y β) para formar $\alpha_3\beta_3$ y cromóforo de ficocianina (C). (b) Estructura química de la ficocianobilina, una en la cadena a y dos en la cadena b. (134)

2.5.1 Métodos de extracción y purificación

C-PC es soluble en agua e insoluble en alcoholes y ésteres. Por lo tanto, el método de extracción de agua fue adoptado. Los enfoques más empleados son: método repetido de congelación y descongelación (135), polvo de *Spirulina platensis* se disuelve en agua en una cierta proporción, se congela rápidamente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, y luego se descongela a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ tres veces; la tasa de ruptura celular puede alcanzar hasta más del 90%. Este método es simple, pero consume mucho tiempo y es inútil en polvo cuando se procesa una gran cantidad de muestras; a través de ósmosis directa (136), el polvo de *Spirulina platensis* se sumerge en agua destilada, solución de concentración de bajo contenido o solución tampón durante una noche, provocando que la pared celular de *Spirulina platensis* se rompa automáticamente, este método es simple pero requiere mucho tiempo. El método ultrasónico (137, 138); la solución de *Spirulina platensis* se trata con ultrasonidos para acelerar la rotura de la pared celular a través de la ósmosis directa. Este método efectivamente acorta el tiempo de tratamiento; método del reactivo químico (139), algunos reactivos químicos, como el agente activo de superficie aniónico, se utilizan para destruir la membrana celular, y la proteína se disuelve en condiciones suaves. En este método, la pared celular permanece intacta y se mejora la pureza de C-PC. En la digestión enzimática (140), la lisozima de cloruro de potasio se usa para romper la pared celular de *Spirulina platensis*, mejorando el rendimiento de extracción. Este método necesita poco tiempo y es adecuado para procesar una gran cantidad de muestras, pero tiene requisitos estrictos de temperatura, pH y otras condiciones experimentales. La extracción acuosa en dos fases se ha desarrollado recientemente, y

su aplicación en la separación de proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, ADN y otras moléculas se ha vuelto cada vez más común (141-143). Chethana y col. (144) lograron una tasa de extracción del 79% y una pureza de 4.32 mediante el uso de extracción acuosa en dos fases en un solo paso. Este enfoque acorta el tiempo de procesamiento, reduce el costo de procesamiento, logra una actividad biológica estable y puede extenderse directamente hasta la escala industrial; por lo tanto, este método ofrece excelentes perspectivas de aplicación. Además, la extracción por micela inversa ofrece las ventajas de alta selectividad, alta actividad de materiales y separación y concentración co-instantánea de la materia prima (145). Liu y col. (146) procesaron el extracto acuoso de *Spirulina platensis* (pH 7.0 con 0.1 mol/L de KCl) utilizando bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) / 1-alcohol amílico-1-octano (en una relación de volumen de 4: 1) y encontraron que la micela inversa muestra una tasa de extracción de C-PC del 96.3%.

El extracto acuoso bruto C-PC mencionado anteriormente contiene muchos otros componentes solubles en agua, tales como polisacárido de *Spirulina platensis*, vitaminas solubles en agua y proteínas; la pureza de proteínas determinada a una relación de absorbancia de 620 y 280 nm (A_{620}/A_{280}) es superior a 2.0 y 4.0, respectivamente, lo que indica que C-PC puede aplicarse en la industria alimentaria y en el campo médico (147). No obstante, la purificación adicional del extracto de C-PC acuoso bruto es necesario. Los métodos generales siguientes han sido los más utilizados en la purificación. En el método de *salting out*, las diferentes proteínas se separan paso a paso de acuerdo con el principio de separación de diferentes sustancias de concentraciones variables de solución salina (148). Patel y col. (149) emplearon un método de precipitación en dos etapas usando 25-50% de sulfato de amonio saturado para obtener C-PC del extracto de agua de *Spirulina platensis*. La precipitación en el punto isoeléctrico se usa para separar las proteínas diana y otras proteínas ajustando el pH de una solución al punto isoeléctrico de una proteína sobre la base de los diferentes puntos isoeléctricos de varias proteínas. Los métodos cromatográficos, como la cromatografía de hidroxapatita (HA) (150, 151), la cromatografía de adsorción en lecho empacado, (152) la cromatografía de exclusión molecular con matrices Sephadex (153) y la cromatografía de intercambio iónico (154), se prefieren actualmente para la purificación. Wang y col. (155) lograron una pureza de C-PC de 14.47 mediante el uso de Sephadex G-200, DEAE-Sephadex A-25 y HA.

2.5.2 Propiedades espectroscópicas

La propiedad espectral es una característica significativa de que la ficocianina C-PC es una proteína de pigmento que captura la luz y se usa como base para su

identificación y control de calidad (156). Yu y col. (157) determinaron el pico máximo de absorción y el pico de emisión de fluorescencia a 625 y 648 nm, respectivamente. Yin y col. (158, 159) obtuvieron los espectros infrarrojos de C-PC y detectaron los picos de absorción a 1650, 1550, 1100, 1050, 3200 y 650 cm^{-1} , que proporcionan una base adicional para la identificación de C-PC.

2.5.3 Estructura y composición de aminoácidos

El estudio de la composición de aminoácidos de C-PC puede allanar el camino para seguir explorando la estructura interna y los grupos activos, y también proporciona una base teórica para otras propiedades. Yin y col. (158, 159), Liu y col. (160), y Li y col. (161) determinaron la composición de aminoácidos de C-PC obtenida de *Spirulina platensis*, y sus resultados revelaron que la composición de aminoácidos de diferentes cepas en C-PC es básicamente la misma. C-PC incluye subunidades α y β que se componen de 162 y 172 aminoácidos, respectivamente (162). A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de las subunidades α y β : cadena α de C-PC aislada de *Spirulina platensis*:

Cadena α C-PC aislada de *Spirulina platensis*:

mktplteavsiadsqgrflssteiqvafgrfrqakagleaakaltska
dslisgaaqvynkfpyttqmpGpnyaadqrgkdkcardigyy
lrmvtycliaggtgpmdeyliagideinrtfelspswyiealkyika
nhGlsgdaateansydyainals

Cadena β de C-PC aislada de *Spirulina platensis*:

mfdafkvvvsqadtrgemlstaqidalsqmvaesnkrdavnrits
nastivснаarslfaeqpqliapgGnaytsrrmaaclrdmeilvyv
tyavfagdasvledrclnglretylalgtpgssvavgvgkmkeaalai
vndpagitpgdcsalaseiasydracaavs

2.5.4 Subunidades α y β de C-PC

La estructura de la ficocianina C-PC consiste principalmente en las subunidades α y β que forman el polímero $(\alpha\beta)_n$ ($n= 1-6$) (163), que luego se combina con el pigmento azul derivado de algas. El peso molecular de estas subunidades varía. El C-PC purificado se ha analizado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio al 12%, y los resultados han revelado que la C-PC derivada de *Spirulina platensis* está compuesta de subunidades α y β con pesos moleculares medios de 14500 y 15000 kD respectivamente (164). Sin embargo, Yu y col. (157) informaron diferentes resultados, en los que los pesos moleculares medios de las subunidades α y β son 14900 y 17200 kD

respectivamente. Peng y col. (165) determinaron la tasa de migración relativa (x) de la proteína estándar y el peso molecular correspondiente de log (y) para el análisis de regresión, y la ecuación de regresión fue $y = 1.0228x + 5.1255$ ($R^2 = 0.9889$). Los pesos moleculares de las subunidades α y β fueron de aproximadamente 16.3 y 18.9 kDa, respectivamente, en consonancia con los resultados previos (166, 167).

2.5.5 Estabilidad de C-PC

Li y col. (168) informaron que C-PC es estable por debajo de 40°C; a temperaturas superiores a 40°C, el pigmento comienza a descomponerse y la densidad óptica disminuye gradualmente, mientras que la densidad óptica cae bruscamente a temperaturas superiores a 50°C y la densidad óptica se reduce en un 75% a temperaturas superiores a 70°C. Además, descubrieron que la solución de azúcar puede mejorar la estabilidad de C-PC en condiciones de calor y la luz solo afecta a la proteína levemente. El estudio también reveló que el color y la densidad óptica son constantes entre pH 4.0 y pH 8.5, mientras que el color de la solución C-PC comienza a desvanecerse cuando el pH es superior a 8.5 o inferior a 4. Todos los resultados anteriores indican que C-PC es sensible a la temperatura y al pH pero no a la luz. Este hallazgo es esencial para controlar las condiciones de C-PC extracción y purificación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 *Microalgas*

La biomasa de *Spirulina platensis* fue cultivada en la costa suroeste de España. El alga fue suministrada en forma de biomasa liofilizada por la empresa IMADE S.L (Granada, España).

Para los estudios de colorimetría se emplearon muestras de bebidas isotónicas upGrade neutral y upGrade blue con colorante sintético azul E-133 (San Benedetto, España).

3.1.2 *Reactivos*

- Agua destilada (destilación física)
- Azida sódica (Sigma)
- Fosfato monopotásico (Panreac)
- Fosfato disódico (Panreac)
- Persulfato amónico (Panreac)
- Ácido clorhídrico (Panreac)
- Hidróxido de sodio (Panreac)
- Membrana de diálisis de celulosa de 32 mm de ancho (Sigma), 6.3 mm (Eurolab) y de 21.5 mm (Medicell internacional). El cierre hermético se consiguió mediante pinzas de 8 cm suministradas por *Spectrum Medical Industries* y de 5 cm suministradas por Mediclip.

3.1.3 *Instrumentación*

- Balanza.

Se utilizó la balanza analítica electrónica Cobos A-100-CS, provista de un sistema de calibración interno y externo, con una desviación estándar de ± 0.1 mg y tiempo de respuesta de 3 segundos.

- Conductímetro

Se empleó el conductímetro modelo Crison 522, que posee una sonda de compensación de temperatura. Para su calibración se usaron disoluciones de referencia de KCl suministradas por el fabricante (1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y 12.88 mS/cm).

- pH metro

Se utilizó el potenciómetro Crison digilab 517, con un electrodo combinado Crison y un Crison GLP 21+ con electrodo fino para medir microvolúmenes de muestras. Para su calibración se emplearon tampones de referencia suministrados por el fabricante (pH 9, pH 7 y pH 4.01).

- Agitadores

Se utilizó un motor agitador-homogenizador *Heidolph RZR1* con velocidad variable entre 35-250 min⁻¹ y 280-2200 min⁻¹, en dependencia de la posición operativa seleccionada. También se empleó un agitador de movimiento horizontal OS10E de Ovan de velocidad variable y 10 kg de capacidad.

- Centrífuga

Para realizar la operación de centrifugación se empleó la centrífuga MEDITRONIC BL-S de SELECTA cuyo rango de velocidad está comprendido entre 300 y 18000 rpm. La misma posee un panel de control compuesto por un regulador de velocidad y controlador de tiempo. Se utilizó el rotor 7001449 de Selecta fabricado en acero inoxidable y diseñado para alcanzar velocidades máximas de 12000 rpm, con capacidad para seis tubos de 60 ml.

- Espectrofotómetro

En la obtención de los espectros UV-visible y absorbancias de las diferentes muestras se utilizó el espectrómetro Perkin-Elmer modelo *Lambda 20*. Las características del equipo 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 0.3 nm; rendijas desde 0.25 a 4 nm y tiempos de respuesta desde 0.2 segundos hasta 10 segundos. El equipo es controlado por vía externa a través de un ordenador personal que opera con el software *UV Data Manager* que tiene la 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 la medición de absorción UV-visible se emplearon células de cuarzo con tapón de teflón de 1x1 cm (célula normal) y de 0.2x1cm (microcélula), suministradas por el fabricante Hellma.

- Espectrocolorímetro

En la medición del color se utilizó 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 luz es proporcionada por 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 e inferior al 85% de humedad. El software empleado fue *SpectraMagic 3.6.1*.

- Espectrofluorímetro

Para la obtención de los espectros de fluorescencia en estado estacionario se utilizó un espectrofluorímetro Jasco FP-6500. Las principales características del equipo son: lámpara de xenón (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 0.07 y 8 segundos; ganancia en el fototubo multiplicador variable (alta, media, baja o manual). Para medidas de polarización de fluorescencia se utilizaron los polarizadores de excitación y emisión. El compartimento de las muestras posee un sistema termostatzable lo que posibilitó el control de la temperatura con baño externo de recirculación. Para las medidas de fluorescencia se emplearon células de cuarzo con tapón de teflón de 1x1cm (célula normal) y de 0.2x1 cm (microcélula), suministradas por el fabricante Hellma. El equipo cuenta con un sistema de control por vía externa a través de un ordenador personal que opera con el software Jasco Manager con conexión a impresora

3.2 Métodos

3.2.1 Obtención del extracto de biliproteínas

3.2.1.1 Extracción mediante choque osmótico

Para cada extracción de ficocianinas realizada, 2 g de biomasa de microalga fueron mezclados con 40 ml de una solución tampón fosfato cuya preparación será descrita en el epígrafe 3.2.2. Azida sódica al 0.01% fue añadida para preservar la integridad de las soluciones. La mezcla resultante fue agitada durante 3h a velocidad constante empleando el agitador *Heidolph RZR1*. Una vez finalizado el tiempo de agitación la preparación fue centrifugada a 12 000 rpm durante 15 minutos en la centrífuga *Meditronic BL-S Selecta*. El sobrenadante azul fue colectado y almacenado a 4°C hasta su análisis posterior, ver Figura 3.1.



Figura 3.1

Biomasa de microalga *Spirulina platensis* (izquierda), extracción de proteínas por choque osmótico (centro) y colección del sobrenadante azul (derecha).

3.2.1.2 Purificación y precipitación con sulfato amónico

Teniendo en cuenta experiencias anteriores (169) con el propósito de lograr la precipitación y purificación parcial de la ficocianina, para 150 ml de solución de extracto se añadieron 78.5 g de sulfato de amonio. La preparación fue agitada para lograr homogenizar la mezcla y se almacenó a 4°C durante 24 h. Posteriormente se centrifugó a una velocidad de 12000 rpm durante 15 minutos desechando el sobrenadante cuidadosamente y colectando el residuo el cual fue resuspendido en una solución tampón fosfato pH7, fuerza iónica 5 mM para su posterior diálisis, ver Figura 3.2.

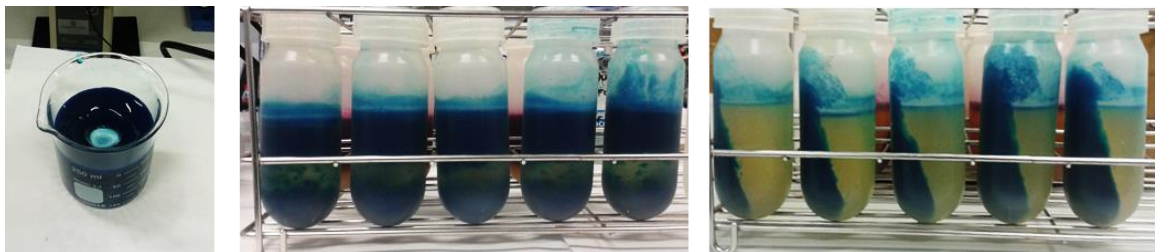


Figura 3.2

Precipitación con sulfato de amonio, agitación (izquierda), preparación en tubos de centrífuga (centro) y centrifugación (derecha)

3.2.1.3 Diálisis del extracto

El extracto fue dializado (ver Figura 3.3) frente a una solución tampón fosfato pH 7 y fuerza iónica 5 mM. El final del proceso de diálisis fue determinado usando medidas de conductividad y pH del tampón externo hasta alcanzar valores constantes e iguales al tampón referencia.



Figura 3.3

Diálisis en solución tampón fosfato pH 7, FI 5 mM

En la Figura 3.4 se muestra el diagrama de flujo del proceso de obtención de la C-ficocianina.

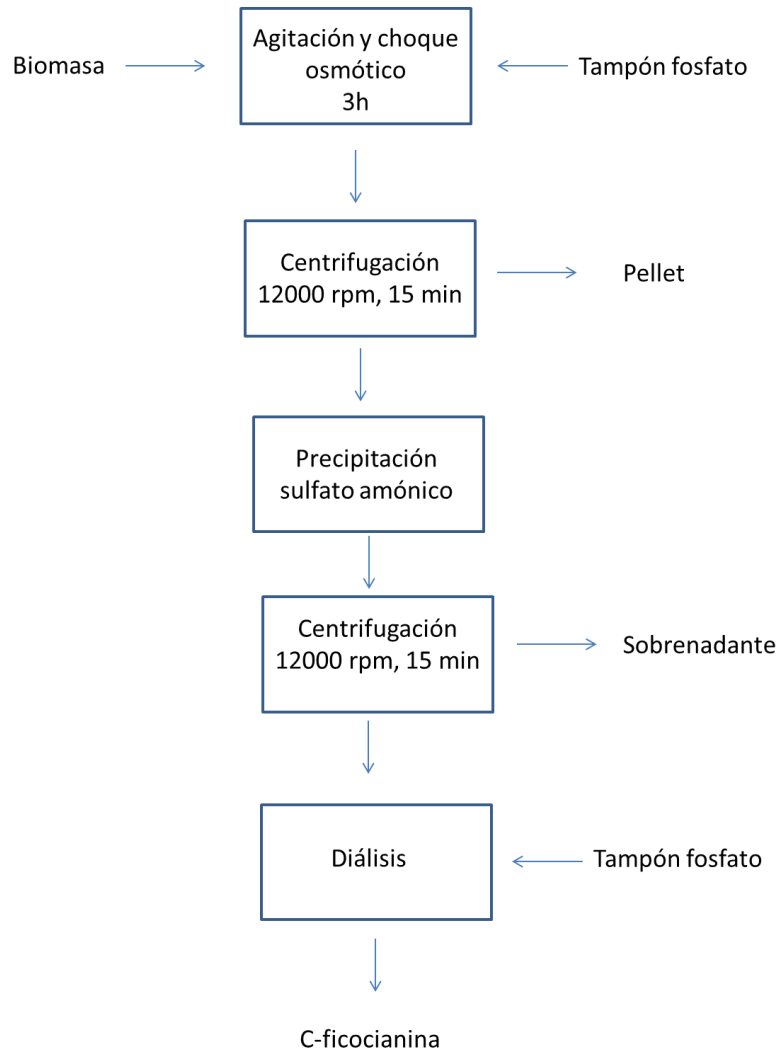


Figura 3.4

Diagrama de flujo del proceso de obtención de la ficocianina

3.2.2 Preparación de las disoluciones tampón

Las disoluciones de tampón fosfato a determinada fuerza iónica y diferentes pH se prepararon añadiendo las cantidades necesarias de reactivo calculadas utilizando las ecuaciones de Henderson Haselbach, la de Davies (determinación de los coeficientes de actividad de soluciones electrolíticas) y la ecuación para el cálculo de la fuerza iónica, ecuaciones 3.1, 3.2 y 3.3.

Solo se describirá la preparación de la disolución tampón fosfato a pH 7. Para el resto de las soluciones preparadas se siguió el mismo procedimiento

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

$$\log \gamma = -0.51|Z| \left(\frac{\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} \right) - 0.3I \quad \text{Ecuación 3.2}$$

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

Disoluciones tampón fosfato a pH 7

El segundo pKa del ácido fosfórico es el más cercano a pH 7, pKa= 7.097.



$$K_a = \frac{a_{\text{HPO}_4^{2-}} a_{\text{H}^+}}{a_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}} \quad \text{Ecuación 3.4}$$

$$\log K_a = \log a_{\text{H}^+} + \log \frac{[a_{\text{HPO}_4^{2-}}]}{[a_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}]} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

$$-\log K_a = -\log a_{\text{H}^+} - \log \frac{[a_{\text{HPO}_4^{2-}}]}{[a_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}]} \quad \text{Ecuación 3.6}$$

Sustituyendo el valor de pKa= 7.097 y las actividades por su expresión $a = c \cdot \gamma$ (c: concentración y γ : coeficiente de actividad).

$$7.097 = \text{pH} - \log \frac{m_{\text{HPO}_4^{2-}}}{m_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}} - \log \frac{\gamma_{\text{HPO}_4^{2-}}}{\gamma_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}} \quad \text{Ecuación 3.7}$$

$$7.097 = \text{pH} - \log \frac{m_{\text{HPO}_4^{2-}}}{m_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}} - (\log \gamma_{\text{HPO}_4^{2-}} - \log \gamma_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}) \quad \text{Ecuación 3.8}$$

Sustituyendo los logaritmos de los coeficientes de actividad por su expresión en la ecuación de Davies:

$$7.097 = \text{pH} - \log \frac{m_{\text{HPO}_4^{2-}}}{m_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}} - \left[\left(-0.51|Z_{\text{HPO}_4^{2-}}| \left(\frac{\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} \right) - 0.3I \right) - \left(-0.51|Z_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}| \left(\frac{\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} \right) - 0.3I \right) \right] \quad \text{Ecuación 3.9}$$

Sustituyendo los correspondientes valores de carga queda:

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

Ecuación 3.10

Fijando el valor de pH de 7 en la expresión anterior y utilizando el valor de fuerza iónica deseado en cada caso, se obtuvo una igualdad que relaciona las concentraciones necesarias de KH_2PO_4 (Panreac) y de Na_2HPO_4 (Panreac) a través de las ecuaciones de $m_{HPO_4^{2-}}$ y $m_{H_2PO_4^-}$:

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

Ecuación 3.11

Utilizando la expresión de la fuerza iónica se obtuvo otra relación entre las cantidades necesarias de Na_2HPO_4 y KH_2PO_4 :

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

Ecuación 3.12

$$I = m_{KH_2PO_4} + 3 * m_{Na_2HPO_4}$$

Ecuación 3.13

La combinación de ambas ecuaciones permitió calcular las cantidades necesarias de fosfato monopotásico y de fosfato disódico para preparar un determinado volumen de tampón de pH 7 a una fuerza iónica determinada. Con respecto a este último parámetro se prepararon soluciones a 500 mM a partir de las cuales se realizaron las diluciones necesarias para obtener las diferentes fuerzas iónicas evaluadas en la investigación mediante la ley de la volumetría. En la Tabla 3.1 se muestran las cantidades de reactivo empleadas de fosfato monopotásico y de fosfato disódico para obtener los pH de trabajo deseados.

Tabla 3.1

Cantidades de fosfato monopotásico y de fosfato disódico para obtener disoluciones a diferentes pH

pH*	K (g/L)	Na (g/L)
6	51.3	14.7
6.5	33.32	30.33
7	15.4	45.7
7.5	6.0	54.4
8	2.01	58

*soluciones fosfato con fuerza iónica 500 mM

Las fuerzas iónicas de las soluciones tampón empleadas en este estudio fueron 500 mM, 250 mM, 100 mM, 50 mM y 5 mM.

3.2.3 Optimización de la obtención del extracto

La optimización de la obtención del extracto consistió en estudiar las principales variables que influyen en la extracción, para ello se evaluaron rangos de valores de las mismas seleccionando aquellos que garantizaran la mayor recuperación de proteínas.

3.2.3.1 Determinación del número de extracciones

Primeramente se llevó a cabo la determinación de la cantidad de etapas de extracción necesarias para la obtención de la mayor cantidad de proteínas operando a pH 7 y fuerza iónica 100 mM. Se decidió trabajar bajo estas condiciones iniciales teniendo en cuenta que se han empleado en otros estudios para la obtención de la ficocianina (152) en las cuales la proteína permanece estable. Para la obtención del extracto se siguió el procedimiento descrito en el epígrafe 3.2.1 Al finalizar cada etapa de extracción se midió la absorbancia para determinar las concentraciones de biliproteínas (C-PC y APC). A cada extracto se aplicó un factor de dilución de 180 veces, se tomaron 20 ul de muestra y 3600 ul de la solución tampón correspondiente.

3.2.3.2 Influencia del pH y la fuerza iónica

Una vez seleccionada la etapa donde mayor extracción se obtenía se procedió a determinar las mejores condiciones de pH y fuerza iónica para que el proceso de choque osmótico garantizara el mayor grado de recuperación de proteínas. Fijando un valor de fuerza iónica de 100 mM se evaluó el rango de pH mostrado en la Tabla 3.1. Las

concentraciones de C-PC y APC se determinaron por el método mencionado en el epígrafe anterior. Para el valor de pH donde más extracción se obtuvo se estudió la influencia de la fuerza iónica de la solución tampón evaluando los valores 5 mM, 50 mM, 100 mM, 250 mM y 500 mM. Las concentraciones de C-PC y APC de las diferentes extracciones se calcularon análogamente y los datos obtenidos fueron relacionados en un gráfico con el propósito de seleccionar el medio más favorable para la extracción.

3.2.4 Caracterización físico química de la proteína

3.2.4.1 Influencia del pH en la absorbancia y fluorescencia de la proteína en el extracto

Se prepararon soluciones de tampón fosfato y fuerza iónica 50 mM ajustando las concentraciones de fosfato monopotásico y de fosfato disódico para obtener valores de pH entre 1 a 12.5 con soluciones de HCl 1 M y NaOH 2M. Por cada muestra 1452 ul de solución tampón se le añadieron a 48 ul de extracto cuya concentración de C-PC era de 4.38 mg/ml de esta forma se aplicó un factor de dilución de alrededor 30 veces. Los valores de absorbancia obtenidos a 620 nm para los diferentes pH fueron relacionados en una curva para estudiar el comportamiento.

En el estudio de la influencia de la variación del pH en la fluorescencia las muestras bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, se analizaron en el fluorímetro tomando los valores de intensidad correspondientes a 638 nm donde se alcanza el valor máximo para la ficocianina (170). Los datos fueron relacionados en una curva y se estudió su comportamiento.

3.2.4.2 Determinación del coeficiente de extinción de la ficocianina pura

Para determinar el coeficiente de extinción molar de la ficocianina 3.2 mg de proteína pura liofilizada fueron disueltos en 1.5 ml de una solución tampón de pH 7 y fuerza iónica 50 mM, ver Figura 3.5. La solución de proteína resultante permitió la preparación de muestras de concentraciones inferiores mediante dilución. Se evaluó un rango de concentraciones entre $1 \cdot 10^{-7}$ M y $16 \cdot 10^{-7}$ M con el objetivo de encontrar la zona que describe un comportamiento lineal entre la concentración y la absorbancia a 620 nm. Así fue posible determinar el coeficiente de extinción molar a través de la ley de Lambert Beer ($A = \epsilon \cdot b \cdot c$) donde ϵ es el coeficiente de extinción, b el camino óptico y c la concentración de la disolución pertinente.

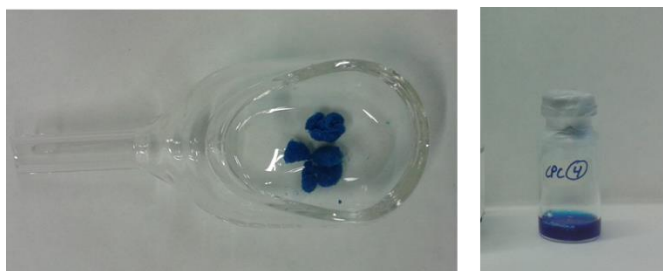


Figura 3.5

Ficocianina pura liofilizada (izquierda) y en disolución, tampón fosfato pH 6.98, FI 50mM (derecha)

Durante las mediciones entre una muestra y otra se lavó y secó cuidadosamente la cubeta de cuarzo teniendo en cuenta que se trabajó con volúmenes pequeños donde cualquier error de limpieza o contaminación interferiría con el resultado final de absorbancia.

3.2.5 Técnicas espectroscópicas de caracterización fisicoquímica

3.2.5.1 Espectroscopia de absorción UV-visible

Los valores de absorbancia de todos los experimentos fueron medidos en un rango de 250 a 750 nm y el espectro de absorción grabado en el espectrofotómetro. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 10 mm y microcubetas de 2 mm cuando el volumen de muestra fue pequeño. A cada extracto se le aplicó un factor de dilución de 180 veces. Para calcular la concentración de biliproteínas en todos los casos se utilizaron las ecuaciones 3.14 y 3.15:

$$C - PC (mgmL^{-1}) = \frac{A_{615nm} - A_{730nm} - 0,47(A_{652nm} - A_{730nm})}{5,34} \quad \text{Ecuación 3.14}$$

$$APC (mgmL^{-1}) = \frac{A_{652nm} - A_{730nm} - 0,2087(A_{615nm} - A_{730nm})}{5,09} \quad \text{Ecuación 3.15}$$

Las longitudes de onda 615 nm, 652 nm y 730 nm representan los valores de densidad óptica a los que absorben las proteínas presentes en el extracto.

Como se ha mencionado anteriormente fue necesario diluir las muestras para medir la absorbancia en un rango adecuado y después multiplicar ese valor de factor de dilución por la concentración calculada. Al conocer el volumen de extracto de cada operación fue posible determinar la masa total de biliproteínas mediante la expresión 3.16:

$$m_{C-PC \text{ o } APC} = \text{Concentración másica} \left(\frac{mg}{mL} \right) * V(mL) \quad \text{Ecuación 3.16}$$

3.2.5.2 Espectrofluorimetría

En la medición de la intensidad de fluorescencia de las muestras a diferentes pH manteniendo constante la fuerza iónica de 50 mM se utilizó el espectrofluorímetro. Los espectros se registraron a temperatura ambiente. Teniendo en cuenta según bibliografía que en solución tampón a pH 7 la proteína se encuentra en condiciones óptimas, se utilizó esta disolución para ajustar los parámetros del equipo que permitieran obtener una buena señal de fluorescencia en este medio, sirviendo de referencia para evaluar la influencia de los diferentes valores de pH ensayados. Los parámetros se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2

Parámetros para la determinación del espectro de fluorescencia del extracto de ficocianina

Rango de longitud de onda	580-700 nm
Modo de medida	Modo emisión
λ de excitación	570 nm
Anchura rendija excitación	5 nm
Anchura rendija Emisión	3 nm
Sensibilidad	Alta
Velocidad de escaneo	100 nm/min

Para el desarrollo de este experimento se tuvieron en cuenta los cuidados de limpieza y secado de la cubeta de cuarzo entre muestras descrita en el epígrafe 3.2.4.2.

3.2.5.3 Espectrocolimetría

Con el objetivo de ensayar la utilidad práctica de la ficocianina como colorante natural como alternativa de uso a colorantes químicos se utilizaron las isotónicas upGrade neutral y upGrade blue. Se empleó el espectrofotómetro conectado a un ordenador dotado del software SpectraMagic 3.6.1. El equipo proporciona medidas en el

espacio de color CIELAB. Tras la correspondiente calibración del instrumento el estudio consistió en ir añadiendo en una cubeta transparente de cuarzo cantidades conocidas de ficocianina, de concentración 3.8 mg/ml previamente precipitada con sulfato amónico y dializada con tampón fosfato pH 7 y fuerza iónica 5 mM a la bebida upGrade neutral, e ir comparando según el parámetro ΔE^*ab en cuánto se asemejaba el color resultante al de la bebida upGrade blue que posee el colorante químico azul E-133, ver Figura 3.6.



Figura 3.6

Colorante sintético azul E-133 (izquierda), bebidas isotónicas (centro) y extracto de concentración de C-PC 3.8 mg/ml usado en el ensayo de espectrocolorimetría (derecha).

3.2.5.3.1 Cálculo de los factores de tinción

El factor de tinción es la cantidad de extracto de biliproteínas necesario añadir a una muestra para que alcance un color determinado, la ecuación empleada es la siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Factor de tinción} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) &= \frac{\text{Cantidad de extracto añadido (mg)}}{\text{Volumen total (ml)}} \\ &= \frac{\text{Volumen de extracto (ml)} * \text{Concentración del extracto} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}{\text{Volumen de producto (ml)} + \text{Volumen de extracto (ml)}} \end{aligned}$$

Ecuación 3.17

Donde la concentración del extracto fue determinada como se describe en el epígrafe 3.2.5.1. El volumen de producto fue de 14 ml que es la capacidad admisible de las cubetas de plástico utilizadas.

Existen dos tipos de factores de tinción, el real y el aceptable. La diferencia radica en el volumen de extracto añadido a considerar. En el primer caso, el volumen es equivalente al necesario para lograr una diferencia de color de 5, valor alcanzado cuando las muestras comparadas tienen colores muy parecidos. De no obtenerse dicho valor se considera la cantidad mínima alcanzada. El factor de tinción aceptable se considera cuando el volumen añadido permite obtener un valor para ΔE^*_{ab} de 10 o el más próximo al mismo, para que en caso de no lograrse el color exacto deseado se consiga otro que podría ser igualmente atractivo ahorrando de esta forma extracto de biliproteínas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización del extracto

La ficocianina tiene un solo pico de absorción a 620 nm aproximadamente (ver Figura 4.1), valor que puede variar ligeramente en dependencia de las condiciones de temperatura, pH y la concentración proteica *in vitro*. El pico correspondiente a la zona entre 250 y 300 nm está asociado a las proteínas intracelulares que son consideradas contaminantes, que al igual que la ficocianina, son liberadas al medio debido a la ruptura celular por choque osmótico.

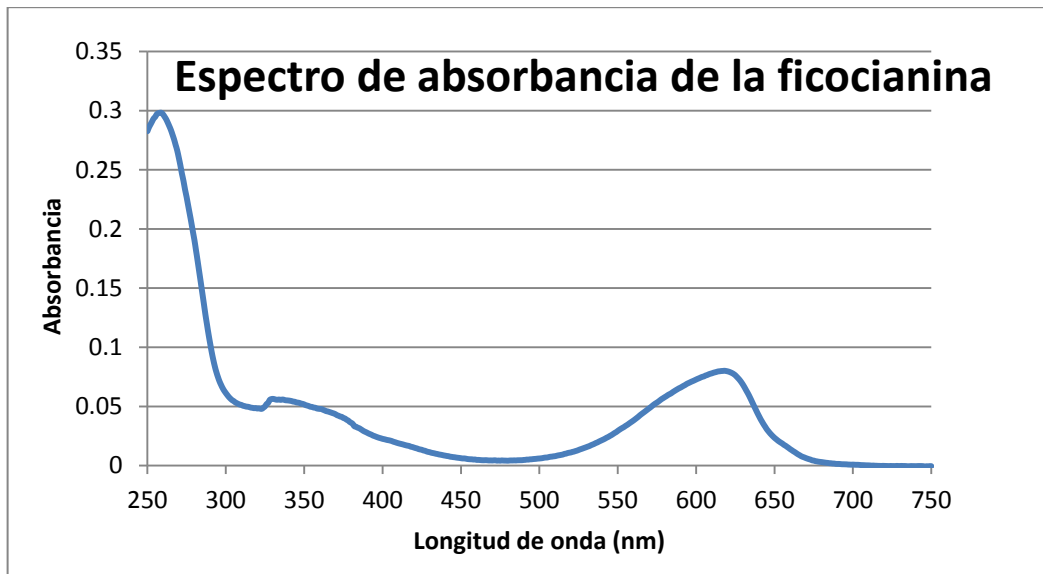


Figura 4.1

Espectro de absorción de la ficocianina

Los datos obtenidos en el espectro permiten conocer la concentración de biliproteínas (ver Tabla 4.1) siendo siempre mayoritaria la C-PC frente a la APC, en este caso el 93.5% del total, lo cual permite definir a la C-PC como la proteína representativa del extracto. Para la determinación de las concentraciones se siguió el procedimiento descrito en el epígrafe 3.2.5.1.

Tabla 4.1
Relación de proteínas C-PC y APC en el extracto*

$A_{615\text{nm}}$	0.07971
$A_{652\text{nm}}$	0.02125
$A_{730\text{nm}}$	0
Factor dilución	180
[C-PC] _{dilución} (mg/ml)	0.013057
[APC] _{dilución} (mg/ml)	0.000907
[C-PC] _{extracto} (mg/ml)	2.35
[APC] _{extracto} (mg/ml)	$7.2 \cdot 10^{-5}$
%[C-PC] _{extracto}	93.5
%[APC] _{extracto}	6.4

*Datos representativos de una de las corridas experimentales realizadas en este estudio

4.2 Obtención del extracto de colorante azul

4.2.1 Optimización de la obtención del extracto

4.2.1.1 Optimización del número de etapas de extracción

El alga *Spirulina platensis* ha sido ampliamente utilizada principalmente para la extracción de la ficocianina, entre otras, por sus propiedades colorantes con potencial aplicación en la industria (153). Para determinar la cantidad de etapas que son necesarias para extraer la mayor cantidad de proteínas se llevó a cabo la optimización de las mismas. Trabajando con 2 g de *Spirulina platensis* liofilizada, 40 ml de solución fosfato pH 7, fuerza iónica 100 mM y tiempo de agitación 3 h se obtuvieron los siguientes resultados que se muestran en las Figuras 4.2-4.4 y Tabla 4.2. Se decidió inicialmente hacer cuatro etapas de extracciones utilizando la misma biomasa en cada una. En la Figura 4.2 se muestran los espectros de absorción correspondientes a cada una de las extracciones.

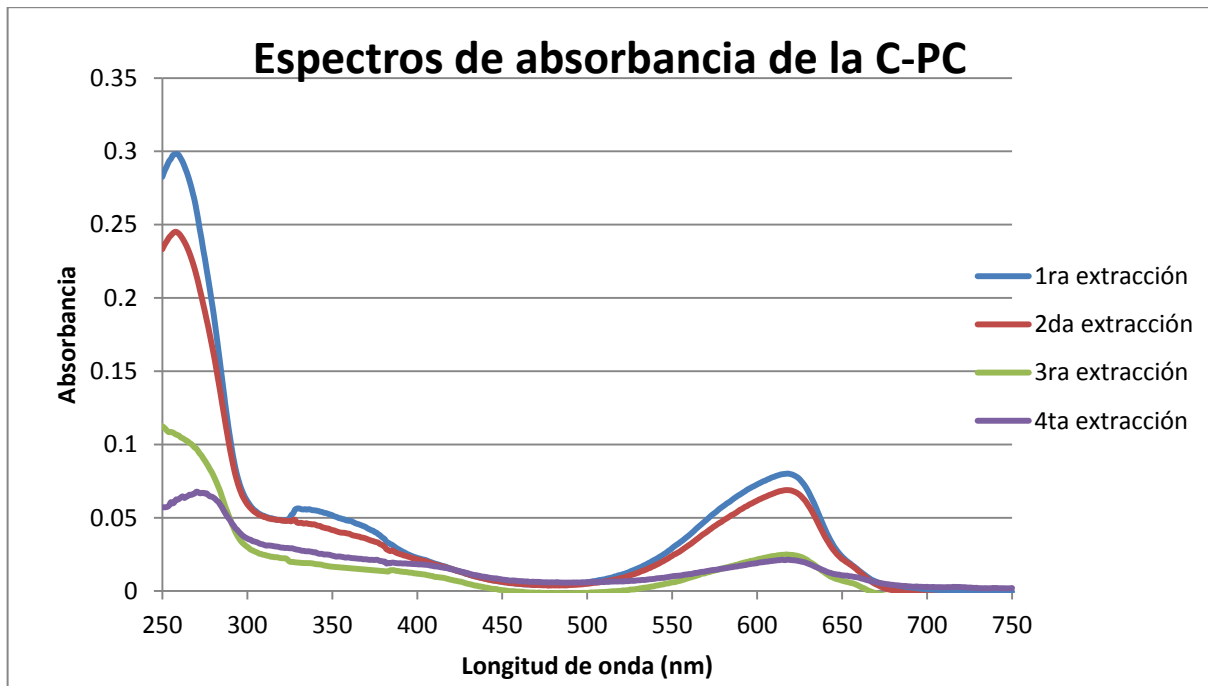


Figura 4.2

Espectros de absorbancia del extracto proteico en cada etapa de extracción

Al realizar un análisis en la zona del espectro entre 550 nm y 650 nm, principalmente en 620 nm donde la absorbancia de la ficocianina es la máxima (153), se puede apreciar que en la primera extracción se obtuvo el mayor valor, ya para las siguientes (partiendo de la misma biomasa usada en la primera extracción) los valores de absorbancia obtenidos fueron disminuyendo hasta obtener el mínimo en la cuarta extracción. Esto mismo se observó en la intensidad del color azul de las soluciones de ficocianinas mostradas en la Figura 4.3.

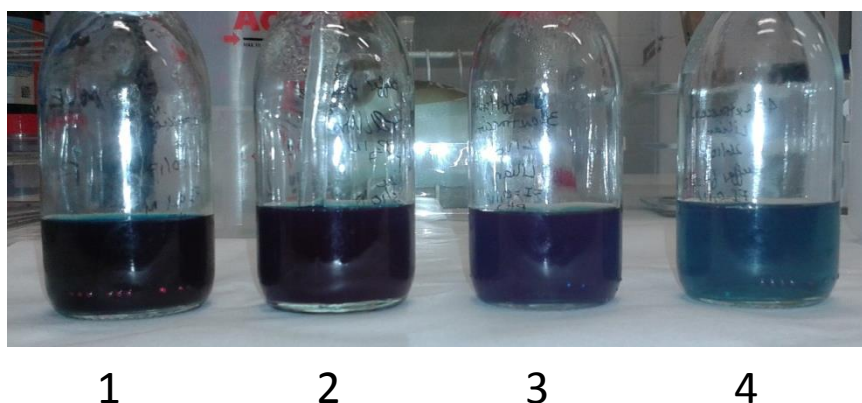


Figura 4.3

Extracto obtenido en cada una de las etapas

La Figura 4.4 y Tabla 4.2 representan el contenido total de biliproteínas en cada una de las etapas de extracción.

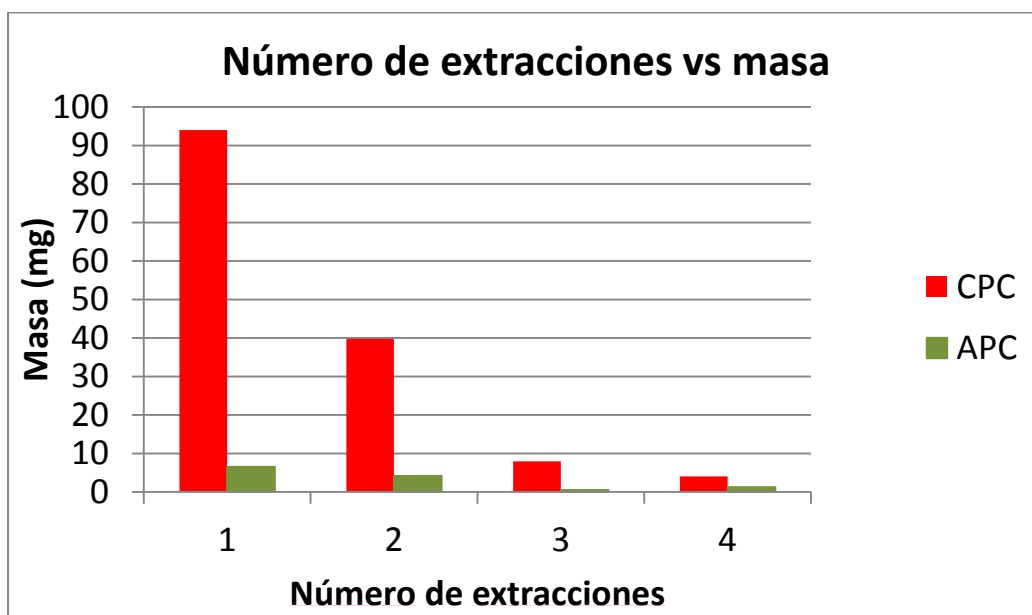


Figura 4.4

Relación entre la masa de biliproteínas y el número de extracciones

Tabla 4.2

Cantidades de CPC y APC para las diferentes extracciones

No extracciones	CPC (mg)	APC (mg)	% másico/total
1	94	6.52	64%
2	39.8	4.14	28%
3	7.94	0.49	5%
4	4.033	1.22	3%
Total	158.143		100%

Se puede apreciar que en la primera extracción se obtuvo la mayor cantidad de masa de CPC y APC disminuyendo así a medida que aumentaba el número de extracciones para la misma biomasa inicial.

Teniendo en cuenta los factores que influyen en el coste del proceso como tiempo de agitación, uso de equipos y preparación de soluciones, se decidió que con solo la primera etapa de extracción con un 64% de proteína del total, se obtenía la cantidad suficiente para llevar a cabo los estudios planteados en el presente trabajo.

4.2.1.2 Influencia del pH

Conociendo el número de etapas que genera una recuperación mayor de ficocianina, se procedió a estudiar la influencia que tenía el pH del medio en el proceso de choque osmótico bajo las mismas condiciones de tiempo de agitación y fuerza iónica descritas en el epígrafe anterior. Según trabajos precedentes se conoce que en el rango de pH de 6-8 la molécula conserva sus mejores propiedades (169) por lo tanto se decidió evaluar este intervalo.

Sabiendo que la ficocianina posee la máxima absorción a 620 nm, se relacionaron los datos de absorbancia a esta longitud de onda con respecto al pH, ver Figura 4.5.

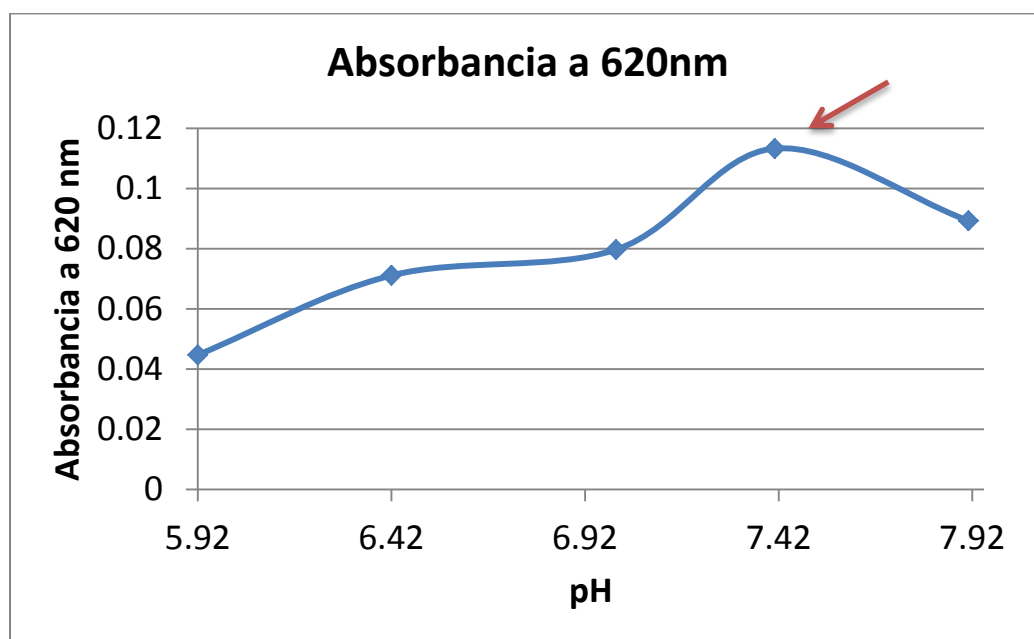


Figura 4.5

Influencia del pH en la absorbancia a 620 nm

La Tabla 4.3 muestra los valores de pH teóricos y experimentales que fueron los que realmente se alcanzaron al preparar las soluciones.

Tabla 4.3

Relación entre el pH del medio y la cantidad de biliproteínas extraída

pH teórico	pH experimental	CPC (mg)	APC (mg)
6	5.92	42.58	0.085
6.5	6.42	70.27	4.73
7	7	94.26	6.93
7.5	7.41	119.17	11.04
8	7.91	92.10	8.36

Como se aprecia en ambas formas de representar los datos obtenidos la condición del medio que favoreció la mayor ruptura de la pared celular, permitiendo liberar su contenido interior fue a pH 7.41. Este valor está en concordancia con estudios anteriores donde las mejores condiciones de lisis ocurrieron a pH 7 (147, 171, 172).

4.2.1.3 Influencia de la fuerza iónica

Conocida la mejor condición de pH, 7.41 y fijando ese valor, se procedió a estudiar la influencia de la fuerza iónica en la extracción de ficocianina. Bajo los mismos parámetros de tiempo de agitación, cantidad de biomasa inicial y volumen de solución fosfato. Se evaluaron los valores de fuerza iónica 5 mM, 50 mM, 100 mM, 250 mM y 500 mM preparados a partir de diluir la solución más concentrada (500 mM).

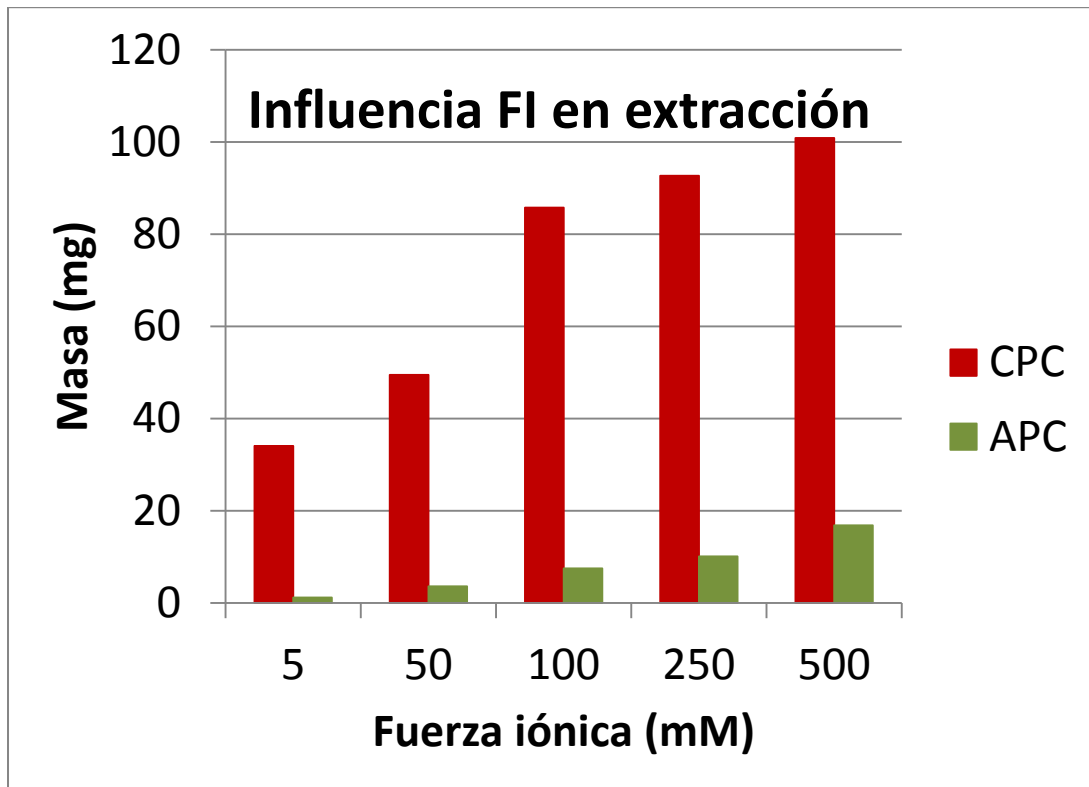


Figura 4.6

Relación de masa de extracto con respecto a la fuerza iónica de la solución tampón

Tabla 4.4

Relación de la fuerza iónica con la masa de extracto de biliproteínas

FI (mM)	CPC (mg)	APC (mg)
5	34.06	1.19
50	49.47	3.60
100	85.78	7.48
250	92.69	10.09
500	100.89	16.83

En los resultados mostrados en la Figura 4.6 y la Tabla 4.4 se observó que a medida que aumentó la fuerza iónica la masa extraída fue mayor, siendo el valor óptimo 500 mM. Concluyendo que la mayor recuperación se alcanzó trabajando a pH 7.41 y fuerza iónica 500 mM.

4.3 Caracterización físico-química de la proteína

4.3.1 Influencia del pH en la absorbancia de la proteína en el extracto

Muchos estudios se han realizado sobre la influencia que tiene el pH en la estructura de las proteínas (173, 174), su estabilidad y actividad biológica. Teniendo en cuenta esto, con el propósito de establecer el rango en el que la proteína podría permanecer sin perder sus propiedades como pigmento natural se desarrolló el siguiente experimento.

Se evaluaron los valores de pH 1 a pH 12.80. La Figura 4.7 y Tabla 4.5 muestran los datos experimentales de absorbancia medidos para cada uno. Es posible apreciar que a medida que se aleja el pH de los valores conocidos para los cuales la proteína es estable disminuye la absorbancia.

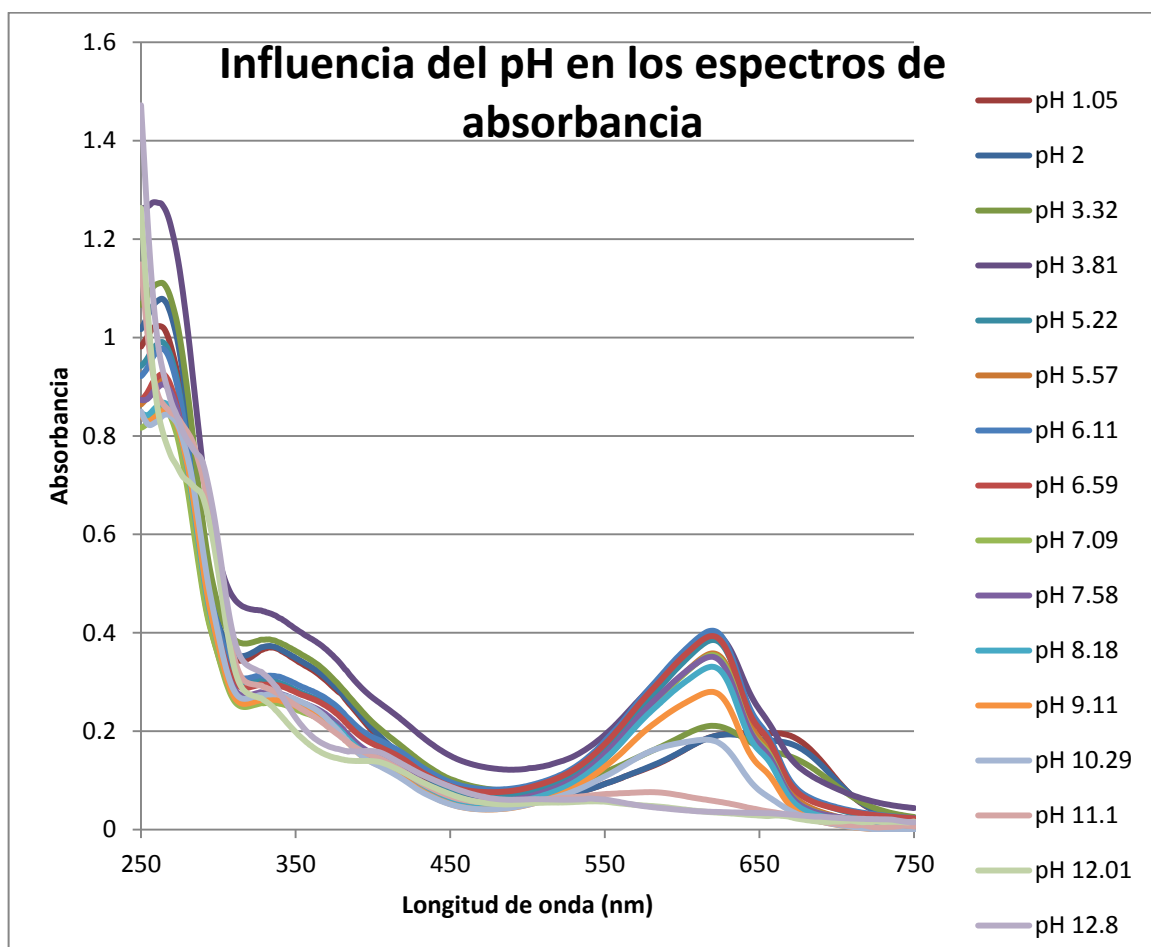


Figura 4.7

Espectros de absorbancia de ficocianina a diferentes pH

Tabla 4.5

Relación de valores de pH, absorbancia a 620 nm y concentración de C-PC

pH	Absorbancia 620 nm	C-PC (mg/ml)
1.05	0.18929	0.42673
2	0.18911	0.45797
3.32	0.21085	0.62889
3.81	0.39617	1.43145
5.22	0.38536	1.55470
5.57	0.35806	1.49925
6.11	0.40414	1.62846
6.59	0.39321	1.59499
7.09	0.3546	1.49284
7.58	0.35102	1.48423
8.18	0.33075	1.41126
9.11	0.27978	1.24373
10.29	0.18083	0.83638
11.1	0.05849	0.22751
12.01	0.03523	0.08467
12.8	0.03604	0.05553

Aunque se añadieron cantidades similares de ficocianina y solución tampón en cada una de las muestras, la variación de los valores de concentración puede deberse en algunos casos a la desnaturalización de proteínas por pH muy básicos o ácidos, o a la poca absorbancia al cambiar la estructura tridimensional de la molécula.

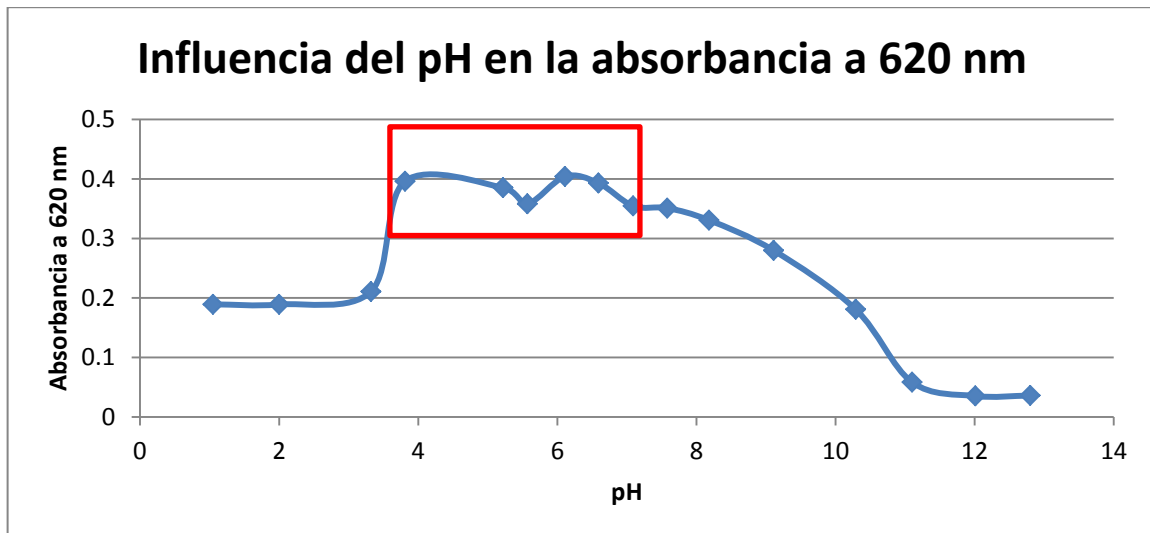


Figura 4.8

Influencia del pH en la absorbancia a 620 nm

La figura 4.8 muestra que el rango de pH donde se alcanzaron los mayores valores de absorbancia se encuentra entre pH 4 y pH 6.5 aproximadamente. Investigaciones han mostrado que la máxima estabilidad de la ficocianina se alcanza entre 5.5–6.0 (175).

4.3.2 Influencia del pH en la fluorescencia de la proteína en el extracto

Del mismo modo se estudió la capacidad de la ficocianina de fluorescer a diferentes valores de pH obteniéndose los resultados mostrados en las Figuras 4.9, 4.10 y Tabla 4.6:

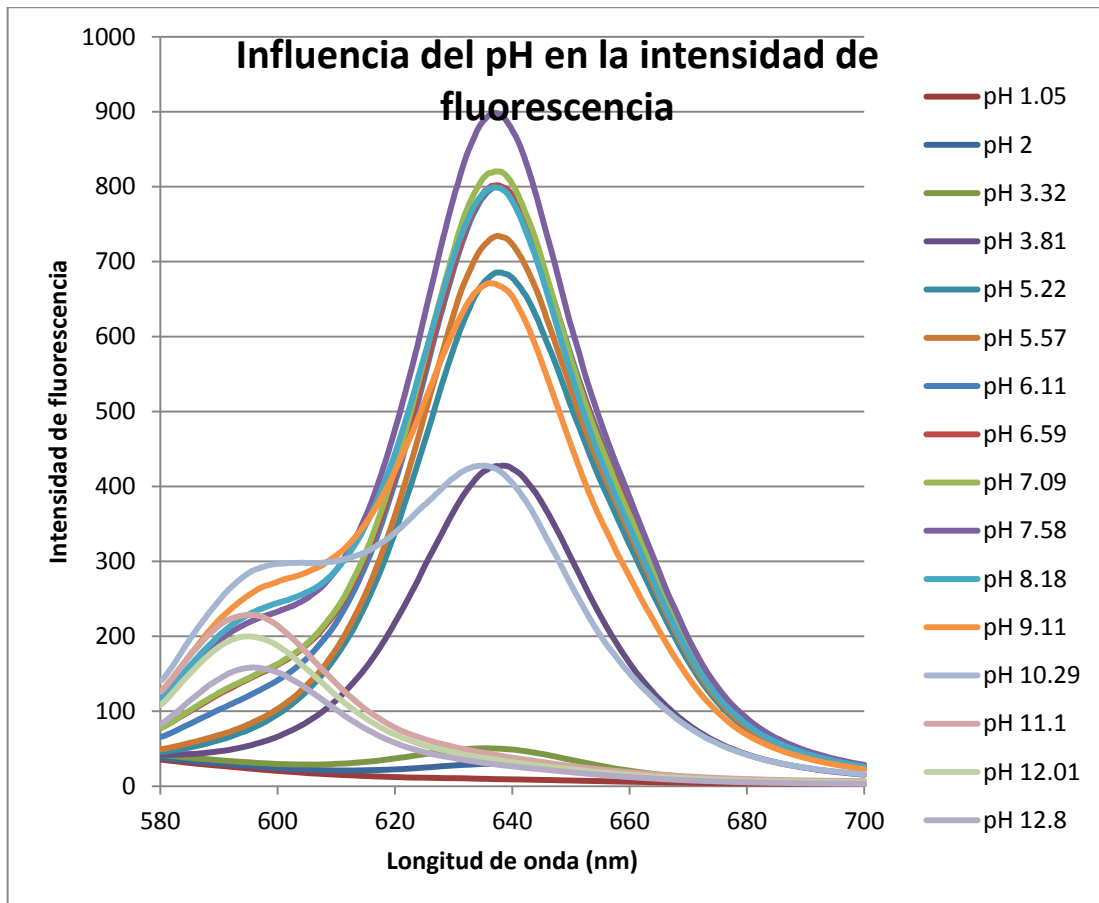


Figura 4.9

Intensidad de fluorescencia de ficocianina a diferentes pH

Igualmente se aprecia que al alcanzarse valores muy básicos o ácidos la capacidad de fluorescer disminuye desplazándose en algunos casos los picos hacia la zona de longitud de onda entre 580-620 nm, alejándose así de la región de mayor capacidad de fluorescencia que es a 638 nm.

Tabla 4.6

Relación de valores de pH e intensidad de fluorescencia de la ficocianina a 620 nm.

pH	Intensidad de fluorescencia 638 nm
1.05	9.32073
2	30.2222
3.32	50.0325
3.81	427.228
5.22	685.572
5.57	733.514
6.11	799.35
6.59	800.471
7.09	819.81
7.58	896.087
8.18	797.817
9.11	667.174
10.29	419.671
11.1	40.6675
12.01	34.5107
12.8	28.2252

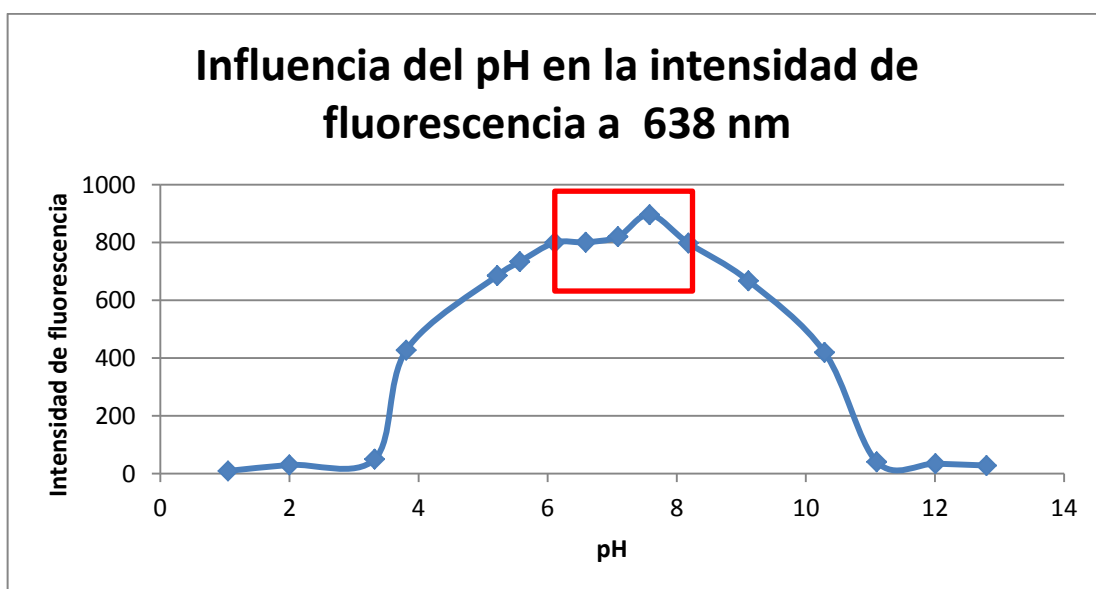


Figura 4.10

Influencia del pH en la intensidad de fluorescencia a 638 nm

La mayor capacidad de fluorescencia se obtuvo en el rango de pH 6-8 siendo el valor máximo a pH 7.58, lo que se corresponde con que la ficocianina exhibe sus mejores propiedades a pH fisiológico.

4.3.3 Determinación del coeficiente de extinción molar de ficocianina pura

Las disoluciones preparadas a partir de la ficocianina pura y el tampón fosfato pH 7 y fuerza iónica 50 mM se relacionan en la Tabla 4.7:

Tabla 4.7

Concentración molar de ficocianina pura y absorbancia a 620 nm

Concentración (M)	Absorbancia 620 nm
1.00E-07	0.05288
3.00E-07	0.15232
4.00E-07	0.19916
5.00E-07	0.22978
6.00E-07	0.25452
8.00E-07	0.29942
1.00E-06	0.31188
1.60E-06	0.30437

Los datos representados en la Figura 4.11 describen una línea recta entre las concentraciones molares $1 \cdot 10^{-7}$ M a $6 \cdot 10^{-7}$ M que se corresponden con valores de absorbancia de 0.05288 y 0.25452 respectivamente. Mediante regresión lineal y teniendo en cuenta la ley de Lambert-Beer, se calculó el coeficiente de extinción molar de la C-PC pura, siendo los parámetros 0.0222 la coordenada en el origen, la pendiente $4.09 \cdot 10^5$ y $r^2 = 0.9795$. De esta forma el coeficiente de extinción determinado fue $\epsilon_{620} = 4.09 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

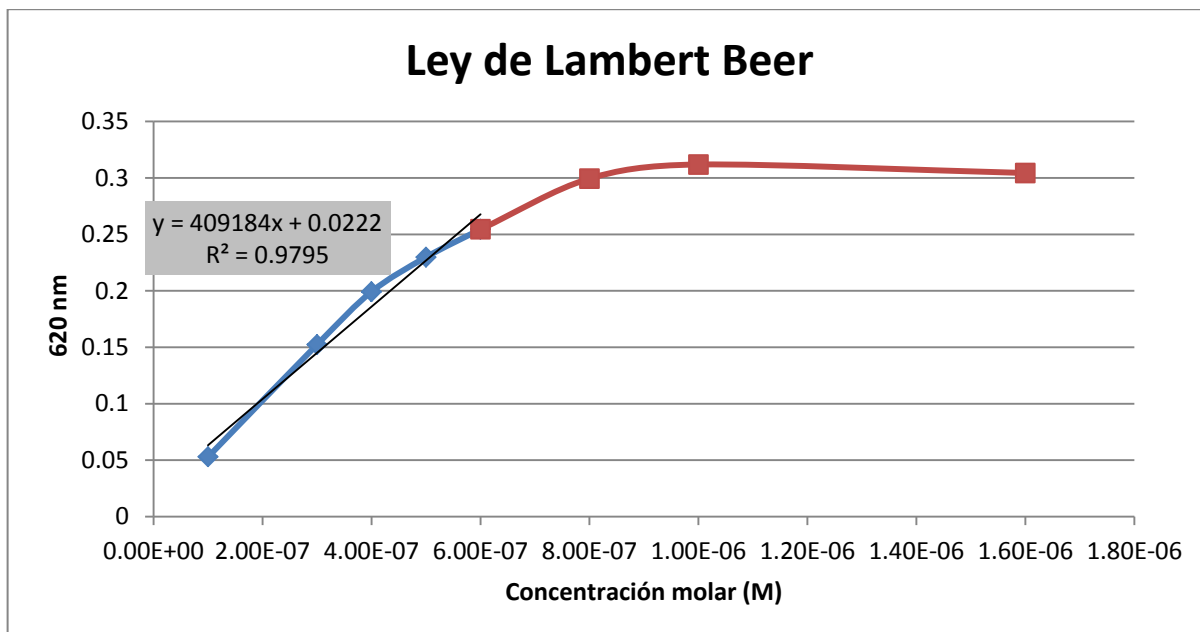


Figura 4.11

Comportamiento de la absorbancia a 620 nm en función de la concentración molar

4.3.4 Aplicación del extracto de ficocianina a la bebida isotónica upGrade

En la Figura 4.12 se representan los valores de ΔE^*_{ab} en función del volumen de extracto de ficocianina añadido (ver también Tabla 4.8). Existe un criterio muy utilizado en colorimetría que permite comprobar que se ha reproducido el color que se quiere alcanzar, esto ocurre cuando la diferencia representada por el parámetro ΔE^*_{ab} es menor o igual al 5%. Aunque en el caso del experimento, el mínimo valor al que se pudo llegar fue aproximadamente 7.94%, la diferencia no es tan marcada con respecto al criterio antes mencionado y el color obtenido es atractivo desde el punto de vista visual (Figura 4.13) por lo que a criterio del autor podría utilizarse como alternativa para sustituir el colorante químico.

Para alcanzar el valor de ΔE^*_{ab} de 7.94% fue necesario añadir 405 μ l de extracto de concentración 3.8 mg/ml que se correspondió con 1.53 mg de ficocianina.

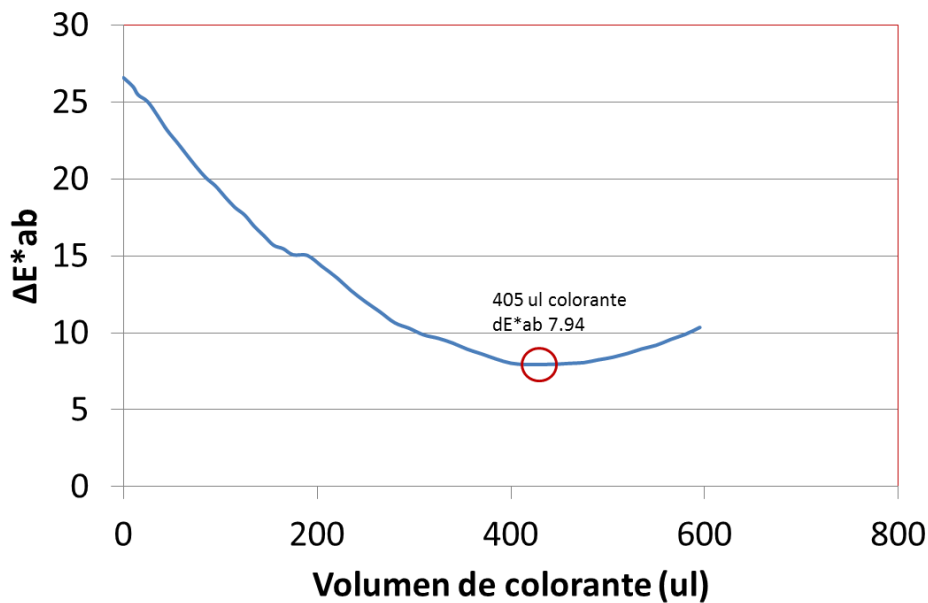


Figura 4.12

Representación de los valores obtenidos de ΔE^*ab en función del volumen de colorante añadido

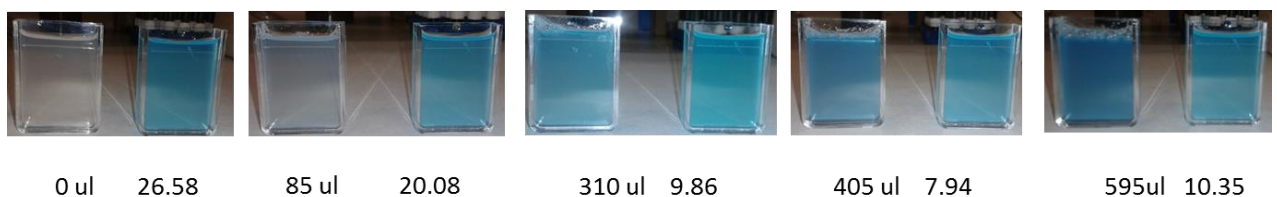


Figura 4.13

Evolución del color de la matriz empleada (cubeta derecha) al añadirle cantidades conocidas de colorante con respecto al patrón (cubeta izquierda)

4.3.4.1 Determinación del factor de tinción

Empleando la ecuación 3.17, se calculó el factor de tinción empleado para colorear la bebida upGrade.

$$\text{Factor de tinción} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Volumen de extracto (ml)} * \text{Concentración del extracto} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}{\text{Volumen de producto (ml)} + \text{Volumen de extracto (ml)}}$$

$$= \frac{405 * 10^{-3} \text{ml} * 3.8 \text{mg/ml}}{14 \text{ml} + 405 * 10^{-3} \text{ml}} = 0.107 \text{mg/ml}$$

El factor de tinción fue de 0.107 mg/ml, por lo que se necesitó añadir 0.107 mg de ficocianina por cada ml de muestra a colorear para alcanzar un ΔE^*ab de 7.94%

Tabla 4.8

Lectura del espectrocolorímetro para las bebidas Upgrade y Upgrade Blue

	Nombre datos	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)	dL*(D65)	da*(D65)	db*(D65)	dE*ab(D65)
Patrón	UPGRADE + DIALIZADO	89.33	-21.89	-10.42	-----	-----	-----	-----
1	UPGRADE BLANCO + 0 extracto dializado	97.21	0.27	1.95	7.88	22.17	12.37	26.58
2	UPGRADE dializado 5ul extracto	96.92	-0.16	1.64	7.59	21.73	12.06	25.99
3	UPGRADE blanco 10ul extracto	96.66	-0.54	1.37	7.33	21.36	11.78	25.47
4	UPGRADE blanco 15ul extracto	96.43	-0.86	1.13	7.10	21.03	11.54	25.02
5	UPGRADE blanco 25ul extracto	96.00	-1.53	0.66	6.67	20.37	11.08	24.13
6	UPGRADE blanco 35ul extracto	95.51	-2.23	0.17	6.18	19.66	10.58	23.17
7	UPGRADE blanco 45ul extracto	95.10	-2.82	-0.20	5.77	19.08	10.21	22.40
8	UPGRADE blanco 55ul extracto	94.66	-3.41	-0.60	5.33	18.48	9.82	21.59
9	UPGRADE blanco 65ul extracto	94.25	-4.02	-0.99	4.92	17.88	9.43	20.80
10	UPGRADE blanco 75ul extracto	93.84	-4.57	-1.31	4.51	17.32	9.10	20.08
11	UPGRADE blanco 85ul extracto	93.51	-5.02	-1.50	4.19	16.87	8.91	19.54
12	UPGRADE blanco 95ul extracto	93.10	-5.57	-1.84	3.77	16.33	8.57	18.82
13	UPGRADE blanco 105ul extracto	92.72	-6.10	-2.15	3.39	15.80	8.27	18.15
14	UPGRADE blanco 115ul extracto	92.44	-6.51	-2.33	3.12	15.39	8.09	17.66
15	UPGRADE blanco 125ul extracto	92.00	-7.09	-2.66	2.67	14.81	7.75	16.92
16	UPGRADE blanco 135ul extracto	91.63	-7.58	-2.94	2.30	14.31	7.48	16.31
17	UPGRADE blanco 145ul extracto	91.24	-8.09	-3.21	1.91	13.81	7.21	15.69
18	UPGRADE blanco 155ul extracto	91.08	-8.32	-3.22	1.75	13.57	7.19	15.46
19	UPGRADE blanco 165ul extracto	90.78	-8.67	-3.35	1.45	13.23	7.07	15.07
20	UPGRADE blanco 175ul extracto	90.65	-8.79	-3.20	1.32	13.10	7.21	15.02
21	UPGRADE blanco 180ul extracto	90.17	-9.41	-3.49	0.84	12.49	6.93	14.31
22	UPGRADE blanco 195ul extracto	89.74	-10.01	-3.84	0.41	11.89	6.57	13.59

23	UPGRADE blanco 210ul extracto	89.19	-10.73	-4.27	-0.14	11.16	6.15	12.74
24	UPGRADE blanco 225ul extracto	88.68	-11.38	-4.65	-0.65	10.51	5.77	12.01
25	UPGRADE blanco 240ul extracto	88.23	-12.00	-4.97	-1.10	9.89	5.45	11.35
26	UPGRADE blanco 255ul extracto	87.70	-12.67	-5.34	-1.63	9.22	5.08	10.65
27	UPGRADE blanco 270ul extracto	87.32	-13.11	-5.46	-2.01	8.79	4.95	10.29
28	UPGRADE blanco 285ul extracto	86.94	-13.59	-5.65	-2.39	8.30	4.76	9.86
29	UPGRADE blanco 300ul extracto	86.52	-13.98	-5.68	-2.81	7.91	4.74	9.64
30	UPGRADE blanco 315ul extracto	86.17	-14.42	-5.79	-3.15	7.47	4.62	9.33
31	UPGRADE blanco 330ul extracto	85.69	-14.99	-6.08	-3.64	6.91	4.34	8.93
32	UPGRADE blanco 345ul extracto	85.26	-15.51	-6.30	-4.07	6.39	4.12	8.62
33	UPGRADE blanco 360ul extracto	84.79	-16.10	-6.59	-4.53	5.79	3.82	8.29
34	UPGRADE blanco 375ul extracto	84.29	-16.72	-6.92	-5.04	5.18	3.49	8.02
35	UPGRADE blanco 390ul extracto	83.89	-17.17	-7.08	-5.44	4.72	3.34	7.94
36	UPGRADE blanco 405ul extracto	83.59	-17.52	-7.12	-5.74	4.38	3.30	7.94
37	UPGRADE blanco 420ul extracto	83.13	-18.00	-7.30	-6.19	3.89	3.12	7.95
38	UPGRADE blanco 435ul extracto	82.80	-18.37	-7.38	-6.52	3.52	3.03	8.01
39	UPGRADE blanco 450ul extracto	82.38	-18.92	-7.63	-6.95	2.98	2.79	8.06
40	UPGRADE blanco 465ul extracto	81.98	-19.31	-7.72	-7.35	2.58	2.69	8.24
41	UPGRADE blanco 480ul extracto	81.52	-19.89	-8.02	-7.81	2.00	2.40	8.41
42	UPGRADE blanco 495ul extracto	81.06	-20.44	-8.30	-8.26	1.46	2.11	8.65
43	UPGRADE blanco 510ul extracto	80.62	-20.95	-8.56	-8.71	0.94	1.85	8.95
44	UPGRADE blanco 525ul extracto	80.34	-21.25	-8.61	-8.99	0.64	1.81	9.19
45	UPGRADE blanco 540ul extracto	79.88	-21.79	-8.87	-9.44	0.11	1.54	9.57
46	UPGRADE blanco 555ul extracto	79.54	-22.14	-8.96	-9.79	-0.24	1.45	9.90
47	UPGRADE blanco 570ul extracto	79.07	-22.70	-9.23	-10.25	-0.80	1.18	10.35

5. CONCLUSIONES

1. La mayor recuperación de proteínas por choque osmótico se alcanzó trabajando con una sola etapa de extracción, solución tampón fosfato a pH 7.41 y fuerza iónica 500 mM.
2. La máxima absorbancia y fluorescencia de la C-ficocianina se alcanzó en los rangos de pH 4-6.5 y 6-8 respectivamente.
3. El coeficiente de extinción de la C-ficocianina pura a pH 7 y fuerza iónica 50 mM fue de $\epsilon_{620} = 4.09 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.
4. Se demostró mediante su aplicación en la bebida upGrade Blue que la ficocianina puede considerarse una alternativa atractiva para la sustitución del colorante sintético E-133.
5. El factor de tinción fue de 0.107 mg/ml, por lo que se necesitó añadir 0.107 mg de ficocianina por cada ml de muestra a colorear para alcanzar un ΔE^*_{ab} de 7.94%.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Aneiros A, Garateix A. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *Journal of Chromatography B*. 2004;803(1):41-53.
2. Sharma SRaM. Micro Algae: A Potential Source of Biodiesel. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*. 2012;Vol. 2(No.3):49-59.
3. Lordan S, Ross RP, Stanton C. Marine Bioactives as Functional Food Ingredients: Potential to Reduce the Incidence of Chronic Diseases. *Marine Drugs*. 2011;9(6):1056-100.
4. Ibañez E, Herrero M, Mendiola JA, Castro-Puyana M. Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. In: Hayes M, editor. *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications*. Boston, MA: Springer US; 2012. p. 55-98.
5. Hamed I. *The Evolution and Versatility of Microalgal Biotechnology: A Review* 2016.
6. Guil-Guerrero JL, Navarro-Juárez R, López-Martínez JC, Campra-Madrid P, Reboloso-Fuentes MM. Functional properties of the biomass of three microalgal species. *Journal of Food Engineering*. 2004;65(4):511-7.
7. Rath B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review 2012. 89-100 p.
8. Plaza M, Herrero M, Cifuentes A, Ibanez E. Innovative natural functional ingredients from microalgae. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(16):7159-70.
9. Rasmussen RS, Morrissey MT. *Marine Biotechnology for Production of Food Ingredients*. *Advances in Food and Nutrition Research*. 52: Academic Press; 2007. p. 237-92.
10. Metting FB. Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology*. 1996;17(5):477-89.
11. Brown MR, Jeffrey SW, Volkman JK, Dunstan GA. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*. 1997;151(1):315-31.
12. Mendes RL, Fernandes HL, Coelho J, Reis EC, Cabral JMS, Novais JM, et al. Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chemistry*. 1995;53(1):99-103.

13. Herrero M, Ibanez E, Cifuentes A, Reglero G, Santoyo S. Dunaliella salina microalga pressurized liquid extracts as potential antimicrobials. *Journal of food protection*. 2006;69(10):2471-7.
14. Rodriguez-Meizoso I, Jaime L, Santoyo S, Senorans FJ, Cifuentes A, Ibanez E. Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2010;51(2):456-63.
15. Mata TM, Martins AA, Caetano NS. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2010;14(1):217-32.
16. Huheihel M, Ishanu V, Tal J, Arad SM. Activity of Porphyridium sp. polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. *Journal of biochemical and biophysical methods*. 2002;50(2-3):189-200.
17. Kanekiyo K, Lee JB, Hayashi K, Takenaka H, Hayakawa Y, Endo S, et al. Isolation of an antiviral polysaccharide, nostoflan, from a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme*. *Journal of natural products*. 2005;68(7):1037-41.
18. Dufossé LG, P.; Yaron, A.; Arad, S.M.; Blanc, P.; Chidambara Murthy, K.N.; Ravishankar, G.A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity or an industrial reality? *Trends Food Sci Technol*. 2005;16:389-406.
19. Li Y, Qin J, Ball A, Moore RB. Perspectives on marine phytoplankton as sources of nutrition and bioenergy2011. 187-204 p.
20. Krienitz L, Wirth M. The high content of polyunsaturated fatty acids in *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) and its implication for food web interactions, freshwater aquaculture and biotechnology. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*. 2006;36(3):204-10.
21. Marchetti J, Bougaran G, Le Dean L, Mégrier C, Lukomska E, Kaas R, et al. Optimizing conditions for the continuous culture of *Isochrysis affinis galbana* relevant to commercial hatcheries. *Aquaculture*. 2012;326-329:106-15.
22. Kang HK, Salim H, Akter N, Kim D-S, Kim JH, Bang HT, et al. Effect of various forms of dietary *Chlorella* supplementation on growth performance, immune characteristics, and intestinal microflora population of broiler chickens2013. 100-8 p.
23. Choi WY, Kang DH, Lee HY. Enhancement of immune activation activities of *Spirulina maxima* grown in deep-sea water. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(6):12205-21.

24. Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MH, Prinsep MR. Marine natural products. *Natural product reports*. 2016;33(3):382-431.
25. Lauritano C, Andersen JH, Hansen E, Albrigtsen M, Escalera L, Esposito F, et al. Bioactivity Screening of Microalgae for Antioxidant, Anti-Inflammatory, Anticancer, Anti-Diabetes, and Antibacterial Activities. *Frontiers in Marine Science*. 2016;3(68).
26. Wijesekara I, Pangestuti R, Kim S-K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers*. 2011;84(1):14-21.
27. Jeon YJ, Kim SK. Antitumor activity of chitosan oligosaccharides produced in ultrafiltration membrane reactor system 2002. 503-7 p.
28. Haijin M, Xiaolu J, Huashi G. A κ -carrageenan derived oligosaccharide prepared by enzymatic degradation containing anti-tumor activity. *Journal of Applied Phycology*. 2003;15(4):297-303.
29. Yuan H, Song J, Li X, Li N, Dai J. Immunomodulation and antitumor activity of κ -carrageenan oligosaccharides 2006. 228-34 p.
30. Hiroishi S, Sugie K, Yoshida T, Morimoto J, Taniguchi Y, Imai S, et al. Antitumor effects of *Marginisporum crassissimum* (Rhodophyceae), a marine red alga. *Cancer Letters*. 2001;167(2):145-50.
31. Zhou G, Sun Y, Xin H, Zhang Y, Li Z, Xu Z. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. *Pharmacological research*. 2004;50(1):47-53.
32. de Sousa APA, Torres MR, Pessoa C, Moraes M Od, Filho FDR, Alves APNN, et al. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 tumor by alginates from brown seaweed *Sargassum vulgare*. *Carbohydrate Polymers*. 2007;69(1):7-13.
33. Taboada C, Millan R, Miguez I. Composition, nutritional aspects and effect on serum parameters of marine algae *Ulva rigida*. *Journal of the science of food and agriculture*. 2010;90(3):445-9.
34. Oben J, Enonchong E, Kuate D, Mbanya D, Thomas TC, Hildreth DJ, et al. The effects of ProAlgaZyme novel algae infusion on metabolic syndrome and markers of cardiovascular health. *Lipids in health and disease*. 2007;6:20.
35. Jaspars M, De Pascale D, Andersen JH, Reyes F, Crawford AD, Ianora A. The marine biodiscovery pipeline and ocean medicines of tomorrow. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 2016;96(1):151-8.
36. Elias RJ, Kellerby SS, Decker EA. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2008;48(5):430-41.

37. Vidoudez C, Casotti R, Bastianini M, Pohnert G. Quantification of Dissolved and Particulate Polyunsaturated Aldehydes in the Adriatic Sea. *Marine Drugs*. 2011;9(4):500-13.
38. Gantar M, Berry JP, Thomas S, Wang M, Perez R, Rein KS. Allelopathic activity among Cyanobacteria and microalgae isolated from Florida freshwater habitats. *FEMS microbiology ecology*. 2008;64(1):55-64.
39. De Philippis R, Colica G, Micheletti E. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;92(4):697-708.
40. RR S. Products from microalgae: An overview. *Microalgal biotechnology: integration and economy*. 2012:13–44.
41. Hosikian A, Lim S, Halim R, Danquah MK. Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects. *International Journal of Chemical Engineering*. 2010;2010:11.
42. Gavrilescu M, Chisti Y. Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology advances*. 2005;23(7):471-99.
43. Johnson MB, Wen Z. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;85(3):525-34.
44. Wang B, Li Y, Wu N, Lan CQ. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008;79(5):707-18.
45. Básaca-Loya G, Valdez M, Enríquez-Guevara E, Gutiérrez-Millán L, Burboa M. Extraction and purification of B-phycoerythrin from the red microalga *Rhodospira rubra*. *Ciencias marinas*. 2009;35:359-68.
46. Viskari PJ, Colyer CL. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. *Analytical biochemistry*. 2003;319(2):263-71.
47. MacColl R, Eisele LE, Malak H, Endres RL, Williams EC, Bowser SS. Studies on R-phycoerythrins from two Antarctic marine red algae and a mesophilic red alga. *Polar Biology*. 1999;22(6):384-8.
48. Mishra SK, Shrivastav A, Pancha I, Jain D, Mishra S. Effect of preservatives for food grade C-Phycoerythrin, isolated from marine cyanobacteria *Pseudanabaena* sp. *International journal of biological macromolecules*. 2010;47(5):597-602.
49. Sekar S, Chandramohan M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology*. 2008;20(2):113-36.

50. Zhao F, Qin S. Evolutionary analysis of phycobiliproteins: implications for their structural and functional relationships. *Journal of molecular evolution*. 2006;63(3):330-40.
51. de Marsac NT, Cohen-bazire G. Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(4):1635-9.
52. Marx A, Adir N. Allophycocyanin and phycocyanin crystal structures reveal facets of phycobilisome assembly. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1827(3):311-8.
53. Apt KE, Collier JL, Grossman AR. Evolution of the Phycobiliproteins. *Journal of Molecular Biology*. 1995;248(1):79-96.
54. Kirilovsky D, Kerfeld CA. The Orange Carotenoid Protein: a blue-green light photoactive protein. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. 2013;12(7):1135-43.
55. Isailovic D, Sultana I, Phillips GJ, Yeung ES. Formation of fluorescent proteins by the attachment of phycoerythrobilin to R-phycoerythrin alpha and beta apo-subunits. *Analytical biochemistry*. 2006;358(1):38-50.
56. Lawrenz E, Fedewa EJ, Richardson TL. Extraction protocols for the quantification of phycobilins in aqueous phytoplankton extracts. *Journal of Applied Phycology*. 2011;23(5):865-71.
57. Liu L-N, Chen X-L, Zhang X-Y, Zhang Y-Z, Zhou B-C. One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. *Journal of Biotechnology*. 2005;116(1):91-100.
58. Liu LN, Su HN, Yan SG, Shao SM, Xie BB, Chen XL, et al. Probing the pH sensitivity of R-phycoerythrin: investigations of active conformational and functional variation. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1787(7):939-46.
59. Niu JF, Wang GC, Tseng CK. Method for large-scale isolation and purification of R-phycoerythrin from red alga *Polysiphonia urceolata* Grev. *Protein expression and purification*. 2006;49(1):23-31.
60. Li S, Shumei W, Lixue C, Xueqin G. Promising fluorescent probes from phycobiliproteins. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. 2003;9(2):177-88.
61. Sonani RR, Rastogi RP, Patel R, Madamwar D. Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins. *World Journal of Biological Chemistry*. 2016;7(1):100-9.

62. Peckol P, Ramus J. Abundances and physiological properties of deep-water seaweeds from Carolina outer continental shelf. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 1988;115(1):25-39.
63. Raven J. Astrobiology: photosynthesis in watercolours. *Nature*. 2007;448(7152):418.
64. Zhao Z, Liu H, Luo Y, Zhou S, An L, Wang C, et al. Molecular evolution and functional divergence of tubulin superfamily in the fungal tree of life. *Sci Rep* [Internet]. 2014 2014/10//; 4:[6746 p.]. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/25339375>
<http://europepmc.org/articles/PMC5381371?pdf=render>
<http://europepmc.org/articles/PMC5381371>
<https://doi.org/10.1038/srep06746>.
65. Glazer AN. Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264(1):1-4.
66. Zhao HSKH. Biliprotein maturation: the chromophore attachment. *Molecular Microbiology*. 2008;68(2):263-76.
67. Gantt E, Conti SF. Granules associated with the chloroplast lamellae of *Porphyridium cruentum*. *The Journal of cell biology*. 1966;29(3):423-34.
68. Glazer AN. [31] Phycobiliproteins. *Methods in enzymology*. 167: Academic Press; 1988. p. 291-303.
69. Watanabe M, Semchonok DA, Webber-Birungi MT, Ehira S, Kondo K, Narikawa R, et al. Attachment of phycobilisomes in an antenna–photosystem I supercomplex of cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(7):2512-7.
70. Liu L-N, Chen, X.-L., Zhang, Y.-Z., and Zhou, B.-C. *Biochim Biophys*. 2005;1708(2):133-42.
71. Stadnichuk IN. Phycobilisomes. *Advances in Science and Technology*. 1991;46.
72. Adir N. Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: reconstructing a giant. *Photosynthesis Research*. 2005;85(1):15-32.
73. Stadnichuk IN. Phycobiliproteins. *Advances in Science and Technology*. 1990;40.
74. Sauer SAPK. Spectroscopic Study of the Light-harvesting Protein C-Phycocyanin Associated with Colorless Linker Peptides. *Photochemistry and Photobiology*. 2007;73(5):556-63.
75. MacColl R. Allophycocyanin and energy transfer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2004;1657(2):73-81.

76. Rakhimberdieva MG, Boichenko, V.A., Karapetyan,, N.V. aS, I.N. *Biochemistry*. 2001;40(51):15780-8.
77. Richmond A, Lichtenberger, E., Stahl, B., and Vonshak,, A. *J. Appl Phycol*. 1990;2(3):195-206.
78. Morais MGd, Vaz BdS, Morais EGd, Costa JAV. Biological Effects of Spirulina (Arthrospira) Biopolymers and Biomass in the Development of Nanostructured Scaffolds. *BioMed Research International*. 2014;2014:9.
79. Eriksen NT. Production of phycocyanin--a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;80(1):1-14.
80. Beregovaya NM, Ekol. *Morya*. 2010(10):12-7.
81. Soni B, Trivedi, U., and Madamwar, D.,. *Bioresour Technology*. 2008;99(1):188-94.
82. Yan MY, Liu, B., Jiao, X.D., and Qin, S.,. *Food Bioproducts Process*. 2014;92(1):89-97.
83. Sukhoverkhov SV, *Vestnik. TGEU*. 2005(4):66-76.
84. Wu H-L, Wang G-H, Xiang W-Z, Li T, He H. Stability and Antioxidant Activity of Food-Grade Phycocyanin Isolated from *Spirulina platensis*. *International Journal of Food Properties*. 2016;19(10):2349-62.
85. Glazer AN. Phycobiliproteins — a family of valuable, widely used fluorophores. *Journal of Applied Phycology*. 1994;6(2):105-12.
86. Scheer H, Yang X, Zhao K-H. Biliproteins and their Applications in Bioimaging. *Procedia Chemistry*. 2015;14:176-85.
87. Gantt E. Structure and Function of Phycobilisomes: Light Harvesting Pigment Complexes in Red and Blue-Green Algae. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. *International Review of Cytology*. 66: Academic Press; 1980. p. 45-80.
88. Porter G, Tredwell CJ, Searle GFW, Barber J. Picosecond time-resolved energy transfer in *Porphyridium cruentum*. Part I. In the intact alga. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1978;501(2):232-45.
89. Glazer AN, Hixson CS. Characterization of R-phycocyanin. Chromophore content of R-phycocyanin and C-phycoerythrin. *The Journal of biological chemistry*. 1975;250(14):5487-95.
90. Ley AC, Butler WL. Isolation and Function of Allophycocyanin B of *Porphyridium cruentum*. *Plant physiology*. 1977;59(5):974-80.
91. Bryant DA, Cohen-Bazire G, Glazer AN. Characterization of the biliproteins of *Gloeobacter violaceus* chromophore content of a cyanobacterial phycoerythrin carrying phycourobilin chromophore. *Archives of Microbiology*. 1981;129(3):190-8.

92. Stanier RY, Cohen-Bazire G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annual review of microbiology*. 1977;31:225-74.
93. Bogorad L. Phycobiliproteins and Complementary Chromatic Adaptation. *Annual Review of Plant Physiology*. 1975;26(1):369-401.
94. Bryant DA. Phycoerythrocyanin and Phycoerythrin: Properties and Occurrence in Cyanobacteria 1982. 835-44 p.
95. Glazer AN. Phycobiliproteins. *Methods in enzymology*. 1988;167:291-303.
96. Xiang CC, Brownstein MJ. Preparing fluorescent probes for microarray studies. *Methods in molecular biology*. 2003;224:55-60.
97. Stall AM, Farinas MC, Tarlinton DM, Lalor PA, Herzenberg LA, Strober S, et al. Ly-1 B-cell clones similar to human chronic lymphocytic leukemias routinely develop in older normal mice and young autoimmune (New Zealand Black-related) animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(19):7312-6.
98. Oi VT, Glazer AN, Stryer L. Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. *The Journal of cell biology*. 1982;93(3):981-6.
99. Peck K, Stryer L, Glazer AN, Mathies RA. Single-molecule fluorescence detection: autocorrelation criterion and experimental realization with phycoerythrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(11):4087-91.
100. Nguyen DC, Keller RA, Jett JH, Martin JC. Detection of single molecules of phycoerythrin in hydrodynamically focused flows by laser-induced fluorescence. *Analytical Chemistry*. 1987;59(17):2158-61.
101. White JCS, L. Photostability studies of phycobiliprotein fluorescent labels. *Analytical biochemistry*. 1987;161(2):442-52.
102. Sohn G, Sautter C. R-phycoerythrin as a fluorescent label for immunolocalization of bound atrazine residues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1991;39(7):921-6.
103. Nakamura N, Matsunaga T. Fiber-Optic Sensor with a Sandwich Binding Technique for Fluoroimmunoassay 1991. 1075-84 p.
104. Kronick MN, Grossman PD. Immunoassay techniques with fluorescent phycobiliprotein conjugates. *Clinical chemistry*. 1983;29(9):1582-6.
105. Magnusson KE, Johansson B, Sundqvist T. Rapid lateral diffusion of lectin-labelled glycoconjugates in the human colonic adenocarcinoma cell line HT29. Comparison with the synthetic lipid analogue diI-C14. *European biophysics journal : EBJ*. 1987;15(3):141-5.
106. Zola H, Neoh SH, Mantzioris BX, Webster J, Loughnan MS. Detection by immunofluorescence of surface molecules present in low copy numbers. High

- sensitivity staining and calibration of flow cytometer. *Journal of immunological methods*. 1990;135(1-2):247-55.
107. Stokes GG. *Ann Phys Chem*. 1854(4):300-13.
108. Padyana AKaR, S. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2006;1757(3):161-5.
109. Kao OH, Edwards MR, Berns DS. Physical-chemical properties of C-phycoerythrin isolated from an acido-thermophilic eukaryote, *Cyanidium caldarium*. *Biochemical Journal*. 1975;147(1):63-70.
110. Xuejun Fu¹ LS, Guanpin Yang², Wang Lu¹, Mingri Zhao¹ and Xueqin Gong¹. The subunits analysis of R-phycoerythrin from marine red algae by isoelectric focusing. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(39):7640-9.
111. Ong LJyGA. *Physiologie Végétale*. 1985;23:777-87.
112. Jespersen L, Stromdahl, L.D., Olsen, K., and Skibsted,, L.H. *Eur Food Res Technol*. 2005;220(3):261-6.
113. Chernova NI, Lyamin, M.Ya., and Kiseleva, S.V. *Pishchevaya Promyshlennost*. 2002(2):80-2.
114. Prasanna R, Sood, A., Suresh, A., and Kaushik, B.D. *Acta Bot Hung*. 2007;49(1-2):131-56.
115. Frankenberg NaL, J.C. *The Porphyrin Handbook*. Amsterdam: Academic Press. 2003:211-36.
116. Stadnichuk IN, Tropin IV. *Phycobiliproteins: Structure, functions and biotechnological applications*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2017;53(1):1-10.
117. Sode KJ, Horikoshi, K., Takeyama, J., Nakamura, N., and Matsunga, T.,. *J Biotechnol*. 1991;21(3):209-17.
118. Izydorczyk K, Tarczynska, M., Jurczak, T., Mrowczynski J., and Zalewski, M. *Toxicol*. 2005;20(4):425-30.
119. Simis SGH, Peters, S.W.M., and Gons, H.J. *Limnol Oceanogr*. 2005;50(1):237-45.
120. Yeh SW, Ong, L.J., Clark, J.H., and Glazer, A.N.,. *Cytometry*. 1987;8(1):91-5.
121. Aaron B, Kantor, D., Parks, R., and Henenb, L.A.,. *Cytometry*. 1996;24(3):191-7.
122. Moshnikov VA, Aleksandrova, O.A., Drobintseva, A.O., Kvetnoi, I.M., Krylova, Yu.S., Mazing, D.S., Matyushkin, L.B., Musikhin, S.F., Polyakova, V.O., and Ryzhkov, O.A.,. *Biotekhnosfera*. 2014(6):16-30.
123. De Rosa SC, Brenchley, J.M., and Roederer, M.,. *Nat Med*,. 2003;9(1):112-7.
124. Waggoner A. *Curr Opinion Chem Biol*,. 2006;10(1):62-6.
125. Brekhovskikh AAaB, O.D.,. *Neorg Mater*. 2005;41(4):400-6.

126. Sonani RR, Singh, N.K., Kumar, J., Thakar, D., and Madamwar, D.,. Process Biochemistry. 2014;49(10):1757-66.
127. Ge B, Qin, S., Han, L., Lin, F., and Ren, Y.,. Photochem Photobiol. 2006;84(3):175-80.
128. Bhata VBaM, K.M. Biochem Biophys Res Commun.,. 2000;275(1):20-5.
129. Chiu HF, Yang, S.P., Kuo, Y.L., Lai, Y.S., and Chou, T.C.,. Br J Nutr. 2006;95(2):435-40.
130. Hayashi O, Ono, S., Ishii, K., Shi, Y.H., Hirahashi, T., and Katoh, T.,. J Appl Phycol. 2006;18(1):47-56.
131. Sekar SaC, M.,. Appl Phycol. 2008;20(2):113-36.
132. Eriksen NT. Appl Microbiol Biotechnol. 2008;80(1):1-14.
133. Boussiba S, Richmond AE. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. Archives of Microbiology. 1979;120(2):155-9.
134. Fukui K, Saito T, Noguchi Y, Kodera Y, Matsushima A, Nishimura H, et al. Relationship between color development and protein conformation in the phycocyanin molecule. Dyes and Pigments. 2004;63(1):89-94.
135. XinLi ZHYLZHJTL. Study on extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis* and its molecular weight. Acta Agriculturae Jiangxi 2012;24(10):102-3, 26.
136. Herrera A, Boussiba S, Napoleone V, Hohlberg A. Recovery of c-phycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. Journal of Applied Phycology. 1989;1(4):325-31.
137. B. Li XCZ, M. H. Gao, and X.M. Chu. New research on extraction and purification of phycocyanin from *Spirulina platensis*. Marine Sciences. 2007(8):48-52.
138. Hu Y, Hu H, Li Y, Geng Y. Study on mass production of phycobilins from PC rich strain of *Spirulina platensis*. Wuhan Zhi Wu Xue Yan Jiu. 2002;20(4):299-302.
139. H. W. Lin ZQW, W. B. Huang, and H. Liang. A new process for extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis*. Guangxi Chemical Industry. 1997(4):7-9.
140. Walter A, Carvalho JCd, Soccol VT, Faria ABBd, Ghiggi V, Soccol CR. Study of phycocyanin production from *Spirulina platensis* under different light spectra. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2011;54:675-82.
141. Babu BR, Rastogi NK, Raghavarao KSMS. Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification. 2008;47(1):83-9.

142. Mayerhoff ZDVL, Roberto IC, Franco TT. Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. *Biochemical Engineering Journal*. 2004;18(3):217-23.
143. Porto TS, Medeiros e Silva GM, Porto CS, Cavalcanti MTH, Neto BB, Lima-Filho JL, et al. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2008;47(4):716-21.
144. Chethana S, Nayak CA, Madhusudhan MC, Raghavarao KSMS. Single step aqueous two-phase extraction for downstream processing of C-phycoyanin from *Spirulina platensis*. *Journal of Food Science and Technology*. 2015;52(4):2415-21.
145. He JCWaZM. Reversed micellar extraction technology. 1997(3):52-6.
146. Y. Liu XQW, and G. C. Pang,. LLiquid-Liquid Extraction of C-phycoyanin from *Spirulina* using reversed micelles. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*. 2008;23(2):30-3.
147. Bhaskar SU, Gopaldaswamy G, Raghu R. A simple method for efficient extraction and purification of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* Geitler. *Indian journal of experimental biology*. 2005;43(3):277-9.
148. Wang J, liu L, Zheng Y, He P. Technology for plant leaf protein extraction and utilization. *Canye Kexue*. 2003;20(1):7-11.
149. Patel A, Mishra S, Pawar R, Ghosh PK. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein expression and purification*. 2005;40(2):248-55.
150. Benedetti S, Rinalducci S, Benvenuti F, Francogli S, Pagliarani S, Giorgi L, et al. Purification and characterization of phycocyanin from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2006;833(1):12-8.
151. Rossano R, Ungaro N, D'Ambrosio A, Liuzzi GM, Riccio P. Extracting and purifying R-phycoerythrin from Mediterranean red algae *Corallina elongata* Ellis & Solander. *J Biotechnol*. 2003;101(3):289-93.
152. Bermejo R, Ramos A. Pilot Scale Recovery of Phycocyanin from *Spirulina platensis* Using Expanded Bed Adsorption Chromatography. *Chromatographia*. 2012;75(5):195-204.
153. Kumar D, Dhar DW, Pabbi S, Kumar N, Walia S. Extraction and purification of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* (CCC540). *Indian Journal of Plant Physiology*. 2014;19(2):184-8.
154. Ramos A, Ación FG, Fernández-Sevilla JM, González CV, Bermejo R. Development of a process for large-scale purification of C-phycoyanin from

Synechocystis aquatilis using expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2011;879(7):511-9.

155. Y. Wang K-XQ, and Q. Dong,. The study for isolation and purification of phycocyanin with high purity and its spectra characteristics. *Progress in Biochemistry and Biophysics*. 1999;26(5):457-60.

156. Liu Q, Huang Y, Zhang R, Cai T, Cai Y. Medical Application of *Spirulina platensis* Derived C-Phycocyanin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2016;2016:14.

157. L. J. Yu YML, Y. L. Chen, and E. X. Zhang. Studies on phycobiliprotein of *Spirulina platensis* for its purification and ability to scavenge active oxygen radical. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*. 1999;18(2):168-71.

158. Glazer AN. Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics*. 1984;768(1):29-51.

159. YIN Gang LC, HE Qing-hua, LIU Zheng, YUAN Nai-ju, DING Fu-xin Isolation and characterization of biliproteins and polysaccharides from spirulina. *Fine Chemicals*. 1999;16(2):10-2.

160. Q. F. Liu HLW, and X. K. Zhang. Isolation and characterization of phycobiliprotein from *Spirulina subsalsa*. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 1988(2):146-53.

161. J. H. Li ZHT, S. Q. Zeng, and S. J. Yang. Study on properties of phycocyanin of *Spirulina maxima*,. *Journal of Nainjing University (Natural Science)*,. 1996(1):61-5.

162. L. L. Zhou. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Phycocyanin and Inhibitory Activity of Hydrolysate to Obesity-Related Enzymes, Tianjin Business University. 2014.

163. Storf M, Parbel A, Meyer M, Strohmann B, Scheer H, Deng M-G, et al. Chromophore Attachment to Biliproteins: Specificity of PecE/PecF, a Lyase-Isomerase for the Photoactive 31-Cys- α 84-phycoviolobilin Chromophore of Phycoerythrocyanin. *Biochemistry*. 2001;40(41):12444-56.

164. C. W. Zhang SQZ, and Y. Z. Zhang. Separation, purification and physicochemical properties of phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Natural Product Research and Development*. 1996(2):29-34.

165. W. M. Peng STS, Y. L. Fu, and G. Q. Liu. Properties of phycobili-proteins from *Spirulina platensis*. *Journal of China Agricultural University*. 1999;4(Z1):35-8.

166. Hilditch CM, Smith AJ, Balding P, Rogers LJ. C-Phycocyanin from the cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Phytochemistry*. 1991;30(11):3515-7.

167. A. D. Xia JCZ, L. J. Jiang, D. L. Li, and X. Y. Zhang. Energy transfer kinetics in C-phycoyanin from cyanobacterium *wastiellopsis prolifica* studied by pump-probe techniques,”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1991;179(1):558-64.
168. Q.H. Li YFZ, and X.C. Liu. Study on characteristic and purification of phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences)*,. 1999(3):66-8.
169. Liu Q, Huang Y, Zhang R, Cai T, Cai Y. Medical Application of *Spirulina platensis* Derived C-Phycocyanin. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2016;2016:7803846.
170. Molina AR. Obtención y purificación de ficocianinas mediante cromatografía de adsorción en lecho expandido y aplicación como colorantes naturales. Universidad de Jaén. 2011.
171. Silveira ST, Burkert JF, Costa JA, Burkert CA, Kalil SJ. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource technology*. 2007;98(8):1629-34.
172. Kuddus M, Singh P, Thomas G, Al-Hazimi A. Recent Developments in Production and Biotechnological Applications of C-Phycocyanin. *BioMed Research International*. 2013;2013:9.
173. O'Brien EP, Brooks BR, Thirumalai D. Effects of pH on proteins: Predictions for ensemble and single molecule pulling experiments. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134(2):979-87.
174. Talley K, Alexov E. On the pH-optimum of activity and stability of proteins. *Proteins*. 2010;78(12):2699-706.
175. Chaiklahan R, Chirasuwan N, Bunnag B. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry*. 2012;47(4):659-64.