

**INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS
SUPERIORES DE MONTERREY
CAMPUS MONTERREY**

**DIVISION DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA
PROGRAMA DE GRADUADOS EN INGENIERIA**



**TECNOLÓGICO
DE MONTERREY.**

**Proceso prototipo para la recuperación y purificación de
B-ficoeritrina producida por *Porphyridium cruentum***

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

Por

TANHIA DENYS HERNANDEZ MIRELES

MONTERREY, N. L.

MAYO 2006

**INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE
MONTERREY**

CAMPUS MONTERREY

DIVISIÓN DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

PROGRAMA DE GRADUADOS EN INGENIERÍA



**TECNOLÓGICO
DE MONTERREY.**

**Proceso prototipo para la recuperación y purificación de B-ficoeritrina
producida por *Porphyridium cruentum***

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

POR:

TANHIA DENYS HERNÁNDEZ MIRELES

MONTERREY N. L.

MAYO 2006

**INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE
MONTERREY**

CAMPUS MONTERREY

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
PROGRAMA DE GRADUADOS EN INGENIERÍA**



**TECNOLOGICO
DE MONTERREY.®**

**Proceso prototipo para la recuperación y purificación de B-ficoeritrina
producida por *Porphyridium cruentum***

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

POR:

TANHIA DENYS HERNÁNDEZ MIRELES

MONTERREY N. L.

MAYO 2006

Agradecimientos

Le doy las gracias a Dios por darme la oportunidad de finalizar este proyecto. Agradezco a mis padres y a mis hermanos por apoyarme en todo momento y brindarme todo su amor.

Le doy las gracias al Dr. Marco A. Rito Palomares por darme la oportunidad de participar en este proyecto. Agradezco sinceramente todo su apoyo, tiempo, dedicación, profesionalismo y amistad.

Le doy las gracias a la Dra. Carmen Hernández y al Dr. Sergio Serna por ser excelentes profesores y reflejar un gran amor y vocación por su trabajo.

Le doy las gracias a Daniel Jacobo Velázquez, Jorge Benavides, Alejandro Aguilar y José Manuel Aguilar por su ayuda incondicional, por sus buenas enseñanzas y por su amistad.

Agradezco a todas las personas que participan en el Centro de Biotecnología y que siempre me brindaron su ayuda, amistad y cariño.

A mis padres con todo mi amor

Resumen

Se presenta el desarrollo de un proceso prototipo simplificado para la purificación de B-ficoeritrina (BFE) producida por *Porphyridium cruentum* explotando el uso de sistemas de dos fases acuosas (SDFA) y precipitación isoeléctrica. Se realizó la evaluación del comportamiento de partición de BFE en SDFA con poli-etilen-glicol (PEG)-Sulfato, PEG-Fosfato y PEG-Dextrano para determinar bajo que condiciones BFE y los contaminantes se podrían concentrar en fases opuestas. El SDFA con PEG1000-Fosfato permitió, después de precipitación isoeléctrica a pH 4.0, la recuperación de BFE purificada (definida como una relación de absorbancias de 545 entre 280nm mayor a 4.0) con un valor comercial tan alto como \$50 dólares/mg. La etapa de extracción de SDFA seleccionada (29.5% p/p de PEG1000, de 9.0% p/p de fosfato, relación de volumen de las fases (V_r) igual a uno, pH de 7.0, concentración del 40% p/p de extracto crudo, generado por precipitación), permitió recuperar BFE con un rendimiento del 72% y una pureza de 4.1 ± 0.2 . La pureza de BFE del extracto original se incrementó 5.9 veces después de las etapas de precipitación isoeléctrica y SDFA en conjunto. Los resultados de este estudio demuestran los beneficios de la aplicación práctica de la precipitación isoeléctrica en conjunto con los SDFA para el desarrollo de un proceso que permita la recuperación y purificación de BFE producida por *Porphyridium cruentum*.

Palabras clave: *Sistemas de dos fases acuosas, B-ficoeritrina, Porphyridium cruentum, recuperación de proteínas.*

Índice General

Capítulo 1	Antecedentes	1
1.1	Desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos para la recuperación y purificación de colorantes proteicos de origen microbiano.	1
Capítulo 2	Introducción	5
2.1	Características y propiedades bioquímicas de B-ficoeritrina	5
2.2	Importancia y aplicación de B-ficoeritrina	7
2.3	Sistema de dos fases acuosas y precipitación isoelectrica para la recuperación y purificación de B-ficoeritrina.	8
2.4	Objetivo de la investigación	13
2.5	Hipótesis de la investigación	13
Capítulo 3	Materiales y métodos	15
3.1	Materiales	15
3.1.1	Reactivos	15
3.1.2	Material Biológico	16
3.2	Técnicas analíticas	17
3.2.1	Cuantificación de proteína total mediante el método de Bradford.	17
3.2.2	Determinación de la concentración de B-ficoeritrina	18
3.2.3	Determinación de la pureza de B-ficoeritrina mediante la relación de absorbancias ($Abs_{545nm} / Abs_{280nm}$)	19
3.3	Fermentación de <i>Phorphyridium cruentum</i>	20
3.3.1	Composición del agua de mar artificial	20
3.3.2	Composición del medio de cultivo Algal (MA)	21

3.3.3	Condiciones de cultivo	22
3.4	Ruptura celular de <i>Phorphyridium cruentum</i> por sonicación	25
3.5	Precipitación isoelectrica escalonada	26
3.6	Construcción de Sistemas de dos fases acuosas para la recuperación de B-ficoeritrina	27
3.7	Electroforesis SDS-PAGE	30
Capítulo 4	Resultados y Discusión	37
4.1	Recuperación y purificación de B-ficoeritrina en sistemas de dos fases acuosas	37
4.2	Recuperación de B-ficoeritrina con precipitación isoelectrica y sistemas de dos fases acuosas	49
4.3	Proceso simplificado para la recuperación y purificación de B-ficoeritrina utilizando precipitación isoelectrica y sistema de dos fases acuosas	57
Conclusiones		63
Referencias		65
Anexos		71
Publicaciones		79

Índice de Figuras

Figura 1.1	Diagrama de proceso de purificación de B-ficoeritrina producida por <i>Porphyridium cruentum</i> desarrollado por Bermejo y col. (2002).	3
Figura 1.2	Diagrama de proceso de purificación de B-ficoeritrina producida por <i>Porphyridium cruentum</i> desarrollado por Bermejo y col. (2003).	4
Figura 3.1	Determinación de movilidad relativa (M_r) en los geles de poliacrilamida mediante la relación de distancias recorridas por cada una de las proteínas del estándar (DB_x) y la distancia total (dT).	36
Figura 4.1	Pureza en fase superior de B-ficoeritrina obtenida en los SdFA compuestos de PEG-Dextrano.	42
Figura 4.2	Porcentaje de recuperación en fase superior de B-ficoeritrina obtenido en los SdFA compuestos de PEG-Dextrano.	43
Figura 4.3	Sistemas de dos fases acuosas PEG1450-Dextrano500 con una concentración de 10% p/p (A) y 40% p/p (B) de extracto crudo proveniente de la sonicación.	45
Figura 4.4	Fotografías provenientes de la etapa de precipitación isoeléctrica de B-ficoeritrina producida por <i>Phorphyridium cruentum</i>.	51
Figura 4.5	Pureza y porcentaje de recuperación de B-ficoeritrina producida por <i>Porphyridium cruentum</i> proveniente del precipitado isoeléctrico.	52
Figura 4.6	Pureza en fase superior de B-ficoeritrina obtenida en los SdFA compuestos de PEG-Fosfato y PEG-Dextrano después de la implementación de la precipitación isoeléctrica.	54
Figura 4.7	Porcentaje de recuperación en fase superior de B-ficoeritrina obtenido en los SdFA compuestos de PEG-Fosfato y PEG-Dextrano después de precipitación isoeléctrica.	55

Figura 4.8	Proceso simplificado de recuperación y purificación de B-ficoeritrina.	58
Figura 4.9	Gel de poliacrilamida en donde se muestran los contaminantes removidos a través del proceso de extracción y recuperación.	59

Índice de Tablas

Tabla 3.1	Composición del agua de mar artificial utilizada para la preparación del medio de cultivo Algal (MA) para <i>Phorphyridium cruentum</i>.	23
Tabla 3.2	Composición del medio de cultivo utilizado para la fermentación de <i>Porphyridium cruentum</i>.	23
Tabla 3.3	Composiciones de los sistemas de dos fases acuosas seleccionados para evaluar el efecto de partición sobre la pureza y porcentaje de recuperación de B-ficoeritrina.	29
Tabla 3.4	Componentes utilizados para preparar 10mL de monómero utilizado para los geles de poliacrilamida.	33
Tabla 3.5	Componentes utilizados para preparar la solución amortiguadora de la muestra.	34
Tabla 4.1	Pureza y porcentaje de recuperación de la fase superior de B-ficoeritrina en SDFa PEG-Sulfato alimentado con extracto crudo.	39
Tabla 4.2	Porcentaje de recuperación y pureza proteica de cada operación unitaria del proceso propuesto para la recuperación de B-ficoeritrina.	61

Capítulo 1. Antecedentes

1.1 Desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos para la recuperación y purificación de colorantes proteicos de origen microbiano

La creciente importancia comercial de colorantes de origen microbiano para ser utilizados en la industria de alimentos, cosméticos, detergentes y de biología molecular, ha despertado un enorme interés de las compañías biotecnológicas por el desarrollo de procesos eficientes y de fácil escalamiento para llevar al mercado estos productos.

El reducido número de protocolos reportados para la recuperación primaria de colorantes proteicos intracelulares involucran; la liberación del producto de interés mediante métodos mecánicos y posterior recolección por centrifugación. La suspensión resultante es fraccionada para purificar el colorante proteico, mediante un número excesivo de operaciones unitarias. El protocolo completo en la mayoría de los casos es complicado por las multi-etapas cromatográficas necesarias para obtener la proteína de interés con los niveles de pureza necesarios. La necesidad de multi-etapas que demandan los protocolos convencionales comúnmente resulta en bajos rendimientos y altos costos de procesos (Ranjitha y Kaushik 2005).

Consecuentemente, el escalamiento potencial de este tipo de procedimientos es percibido negativamente desde el punto de vista económico.

Para minimizar las desventajas atribuidas a los protocolos de purificación establecidos para colorantes proteicos, se han propuesto diferentes enfoques. Tales enfoques involucran la reducción de etapas cromatográficas (Liu y *col.* 2005) y el uso de técnicas de recuperación alternativas, tales como sistemas de dos fases acuosas (Benavides y Rito-Palomares 2005). En este contexto, el desarrollo de un proceso de recuperación y purificación de B-ficoeritrina, un colorante proteico presente en la naturaleza (cianobacterias, algas eucariotas, etc.) (Koller y *col.* 1977, Ritter y *col.* 1999), representa un caso de estudio muy atractivo.

La complejidad de los protocolos de recuperación y purificación de BFE ha limitado su potencial de implementación práctica a nivel comercial. Estos procesos se encuentran usualmente caracterizados por tener un elevado número de operaciones unitarias, bajos rendimientos y limitaciones para el fácil escalamiento. Intentos previos por purificar BFE han sido documentados, por ejemplo los protocolos reportados por Bermejo y *col.* (2002, 2003) que involucran el uso de cromatografía líquida de intercambio iónico a alta presión o el uso de cromatografía de absorción en lecho expandido, los cuales dan como resultado maneras efectivas de purificar BFE a nivel laboratorio (Ver Figuras 1.1 y 1.2). Sin embargo, cuestionamientos económicos surgen cuando se considera la escala industrial. La cromatografía líquida a alta presión puede involucrar altos costos de inversión y operación. Consecuentemente, la necesidad de explorar enfoques alternativos es evidente a fin de recuperar y purificar BFE de una manera práctica.

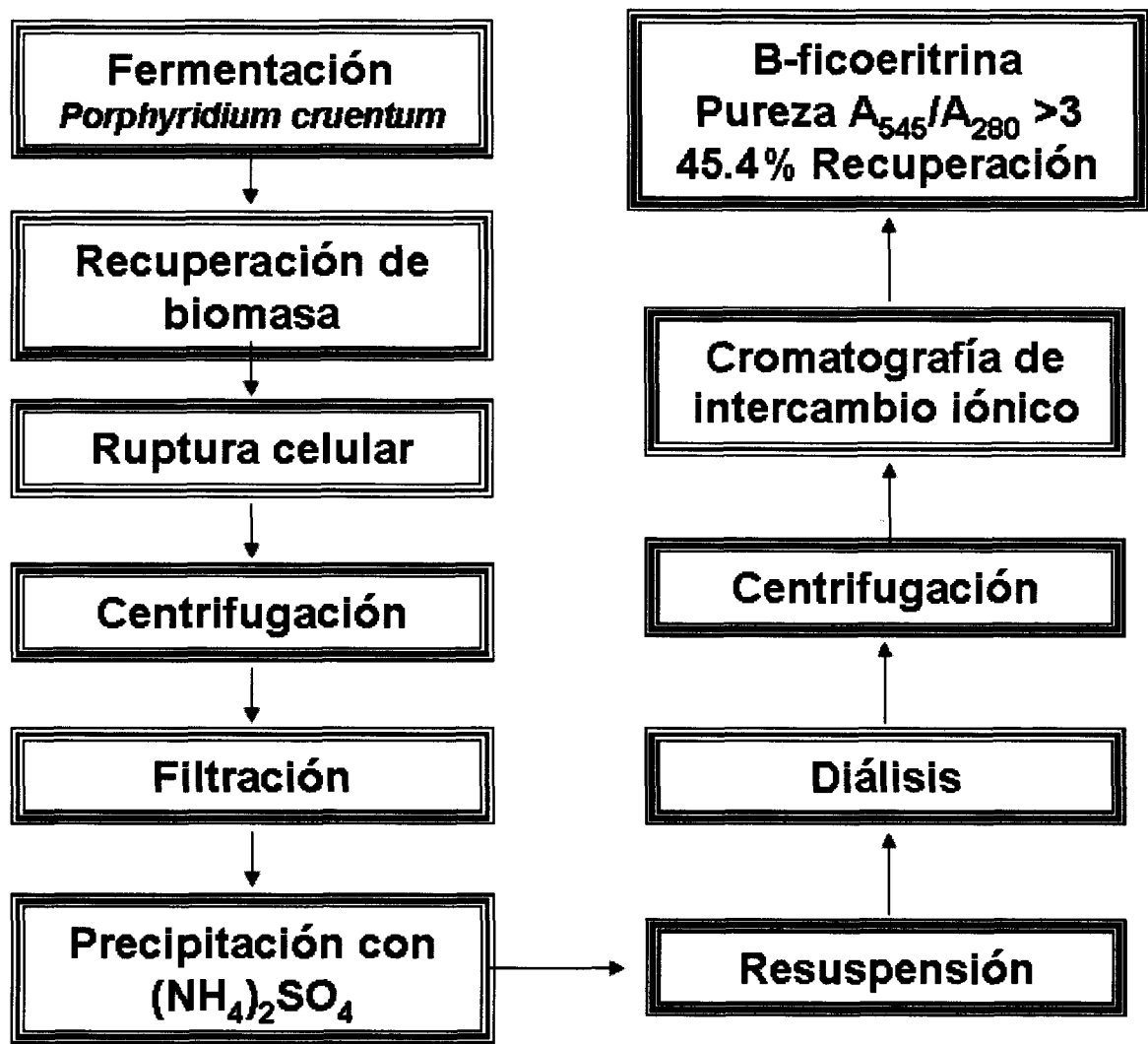


Figura 1.1 Diagrama de proceso de purificación de B-ficoeritrina producida por *Porphyridium cruentum* desarrollado por Bermejo y col. (2002).

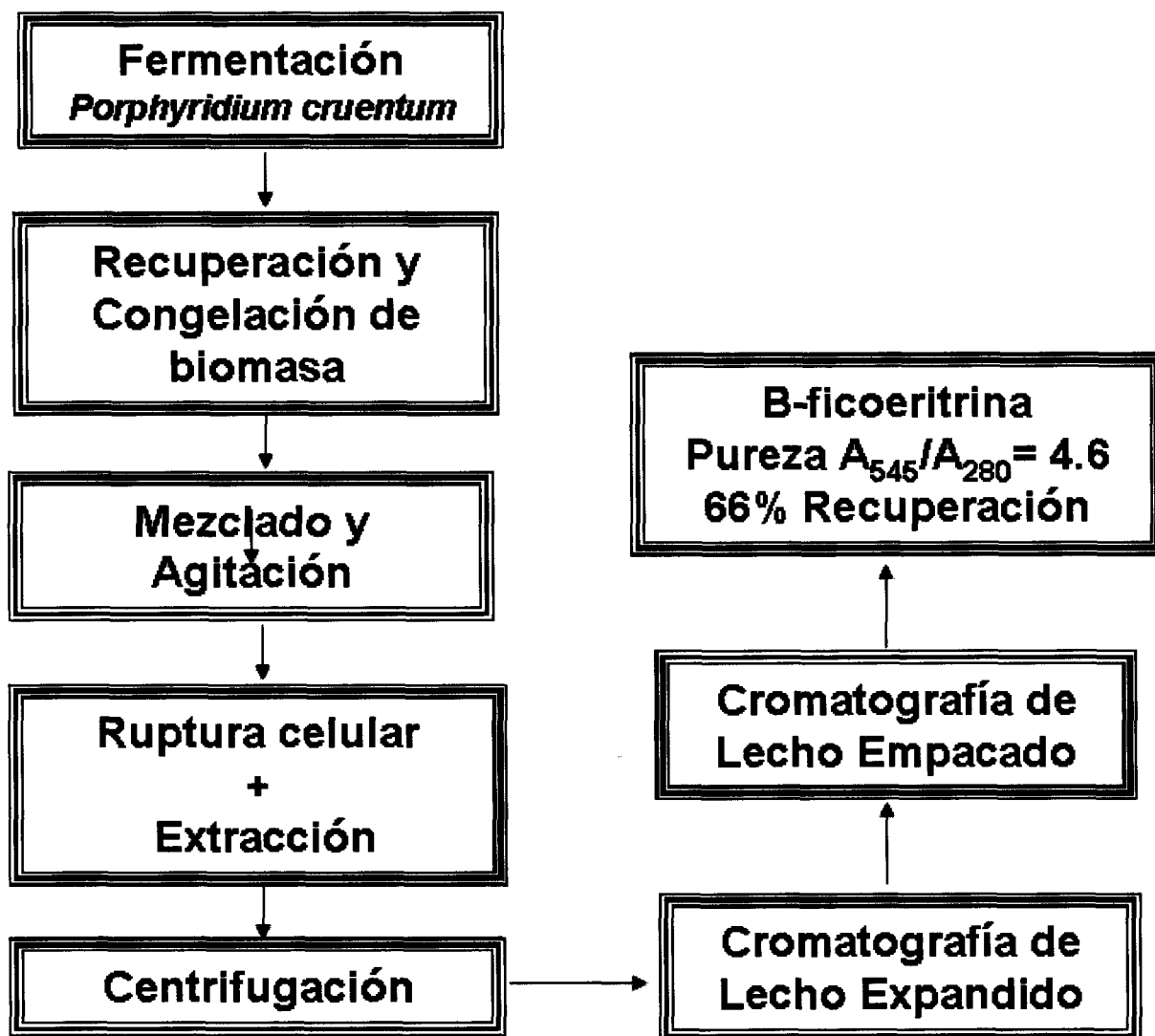


Figura 1.2 Diagrama de proceso de purificación de B-ficoeritrina producida por *Porphyridium cruentum* desarrollado por Bermejo y col. (2003).

Capítulo 2. Introducción

2.1 Características y propiedades bioquímicas de B-ficoeritrina

La B-ficoeritrina (BFE) obtenida de *Porphyridium cruentum* (una microalga unicelular de color rojo) es una ficobiliproteína coloreada que se produce como pigmento accesorio y se encuentra embebida en la membrana tilacoidal del sistema fotosintético de esta microalga.

Las ficobiliproteínas son proteínas con grupos prostéticos tetrapirrólicos lineales (bilinas), que se encuentran unidos mediante enlaces covalentes a residuos de cisteína específicos de las proteínas (Bermejo *y col.* 2002, Berns y MacColl 1989, Ritter *y col.* 1999).

Las ficobiliproteínas están ensambladas dentro de una estructura celular organizada, llamada ficobilisoma. Estos complejos absorben la luz dentro de un rango amplio de longitud de onda dentro del espectro visible, y transfieren la energía de excitación resultante de la absorción de luz a los centros de reacción en las membranas fotosintéticas (tilacoides) dentro de los cloroplastos, para de esta forma generar energía química (Glazer *y col.* 1976, Gantt 1980, Glazer 1985, Glazer 1989). Estas proteínas pueden ser encontradas en cianobacterias (algas verde-azules), en algas eucarióticas monocelulares biflageladas y en rodofitas (algas rojas o rodofitas).

La microalga *Porphyridium cruentum* ha demostrado ser eficiente en la producción de BFE, ya que se ha encontrado que esta especie produce grandes cantidades de esta proteína (representa aproximadamente el 1.66 % peso seco del alga). Las proteínas representan el 33% del peso de *Porphyridium cruentum* en base seca. La B-ficoeritrina representa el 5% de la proteína total en esta microalga, mientras que R-ficocianina (otra ficobiliproteína presente en *Porphyridium cruentum*) representa solamente el 1% (Bermejo y col. 2002).

La estructura de la B-ficoeritrina corresponde a un heteropolímero formado por 13 subunidades: 6 subunidades α y 6 subunidades β , cada una de las cuales tiene un peso molecular aproximado de 17,500 Da y una subunidad γ , con un peso molecular entre 29,000 y 30,000 Da. Su peso molecular total es de aproximadamente 240,000 Da (MacColl y Guard-Frair 1987).

La B-ficoeritrina muestra tres picos de absorbancia en el espectro visible, con valores de 498, 545 y 563nm, siendo su pico máximo de absorbancia el de 545nm (Bryant 1982). De igual forma, la BFE muestra dos picos de absorbancia en el espectro ultravioleta uno a 180nm, que corresponde al pico de absorbancia debido al los enlaces peptídicos de la proteína, y otro a 280nm, debido a la absorbancia generada por los residuos aromáticos de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano. La B-ficoeritrina no solo absorbe luz, sino que también la transmite, es decir, presenta fluorescencia, teniendo esta su pico máximo entre 575 y 578nm aproximadamente (Bryant 1982, MacColl y Guard-Frair 1978).

El punto isoeléctrico es aquel valor de pH en el que la carga neta electroquímica de la proteína es cero, es decir, la proteína tiene el mismo número de cargas positivas y negativas. El punto isoeléctrico de B-ficoeritrina, producida por *Rhodella violacea*, es 4.2 (Koller y col. 1977).

La B-ficoeritrina es soluble en agua y tiene una gran resistencia al blanqueamiento por contacto con la luz (Telford y col. 2001). Estas características hacen de la BFE una proteína colorante muy atractiva y con diversas aplicaciones.

2.2 Importancia y aplicación de B-ficoeritrina

Dentro de las aplicaciones de BFE destacan su aplicación como pigmento en alimentos, cosméticos, en la industria farmacéutica y como marcador fluorescente (Arad y Yaron 1992, Ayyagari y col. 1995, Bermejo y col. 2002, Qiu y col. 2004).

Además, una creciente demanda de productos con aplicación en nuevas técnicas de biología molecular, ha tomado gran auge en los últimos días. Investigaciones recientes han reportado el uso de B-ficoeritrina especialmente como marcador extracelular en técnicas de citometría de flujo e inmunoensayos (Telford y col. 2001). Otras aplicaciones de BFE han sido reportadas en técnicas emergentes de microarreglos proteicos desarrollados para el estudio y expresión de proteínas (Xu y Bao 2003).

El valor comercial de BFE altamente pura (definida como una relación de absorbancias a 545 y 280nm mayor a 4.0) ha sido reportado como superior a \$50 dólares/mg (Martek Corporation 2005, Haugland 1996). Este elevado valor comercial hace atractivo el intento por desarrollar un proceso eficiente para la recuperación y purificación de BFE.

2.3 Sistema de dos fases acuosas y precipitación isoelectrica para la recuperación y purificación de B-ficoeritrina.

El uso de sistemas de dos fases acuosas (SDFA) ha sido sugerido como una alternativa atractiva para minimizar o eliminar algunas de las desventajas atribuidas a los protocolos de purificación de BFE establecidos. La técnica de SDFA ha demostrado tener un enorme potencial para la recuperación y purificación de compuestos biológicos (Rito-Palomares 2004, Rito-Palomares y *col.* 2000a, Rito-Palomares y Lyddiatt 2000, He y *col.* 2005).

Los sistemas de dos fases acuosas se forman al mezclar dos o más sustancias que en ciertas concentraciones se vuelven inmiscibles en agua. Existen sistemas de dos fases acuosas polímero-polímero, los cuales están formados, por dos fases acuosas poliméricas (PEG-Dextrano, PEG-Polivinil alcohol, etc.). Dentro de los sistemas polímero-polímero, aquellos que utilizan PEG-Dextrano son los más empleados para la recuperación de proteínas (Rito-Palomares y *col.* 2001). Sin embargo, estos sistemas están limitados para ciertas aplicaciones (productos de alto valor) por los altos costos de polímeros como el dextrano (Rito-Palomares 2004) el cual tiene un precio que asciende a los \$200 dólares por 50g (Sigma Chemicals USA 2006).

Existen también sistemas de dos fases acuosas polímero-sal los cuales son el resultado de la combinación de diversos polímeros (poli-etilen-glicol; PEG, poli-etilen-oxide-sulfide; PEOS, etc.) y una solución salina (fosfato de potasio, sulfato de sodio, etc.) (Huddleston *y col.* 1991a, Albertsson *y col.* 1990, Hernandez-Mireles y Rito-Palmomares 2006a, 2006b). Debido a su bajo costo y al corto tiempo de separación, uno de los sistemas de dos fases acuosas más utilizados es el sistema poli-etilen-glicol – solución salina (Hustedt *y col.* 1985, Kula *y col.* 1982).

A pesar de que el mecanismo de formación de las fases en un sistema PEG – sal no se conoce del todo, se sabe que este está relacionado con el balance de fuerzas entálpicas y entrópicas involucradas en la hidratación de los solutos. Se cree que la separación de las fases depende del grado en el cual las asociaciones catiónicas del oxígeno en los monómeros del polietilenglicol son capaces de sustituir las asociaciones catiónicas del agua. Los factores involucrados en este fenómeno son el largo de cada cadena de polímero (peso molecular y estructura), así como el tamaño y la carga de los aniones asociados (Huddleston *y col.* 1991a).

Los eventos fisicoquímicos involucrados en la partición de proteínas en los sistemas de dos fases acuosas no son totalmente entendidos. La preferencia de una proteína por migrar a una fase en particular depende de varios factores, entre los cuales se encuentran: su peso molecular, su área superficial, carga electroquímica neta, punto isoelectrico y contenido de residuos hidrofóbicos de aminoácidos.

Sin embargo, no solo las características de la proteína a separar influyen en su comportamiento de partición, existen parámetros relacionados con los sistemas de dos fases acuosas (longitud de la línea de corte [LLC], peso molecular de los polímeros, pH, relación de volúmenes [Vr], temperatura, etc.) que están involucrados en el mecanismo de partición de las proteínas.

La recuperación y purificación parcial de BFE producida por *Porphyridium cruentum* utilizando SDFA ha sido reportada anteriormente (Benavides y Rito-Palomares 2004). Sin embargo, el proceso propuesto para la recuperación primaria de BFE, que involucra el uso de SDFA con polietilenglicol (PEG) y fosfato después de etapas de ruptura celular, precipitación con sulfato de amonio y centrifugación, no permitió obtener BFE con alta pureza (pureza mayor a 4.0) y resultó en BFE parcialmente purificada (pureza igual a 2.9) (Benavides y Rito-Palomares 2004). Como consecuencia, es evidente la necesidad de estrategias adicionales para incrementar la pureza de la proteína de interés.

En el presente trabajo se utilizó una técnica de precipitación isoeléctrica posterior a la etapa de ruptura celular y previa a la extracción por SDFA con el objetivo de remover posibles contaminantes en el extracto crudo de BFE. Uno de los métodos más sencillos para la precipitación de una proteína con el objetivo de purificarla es mediante el ajuste del pH de la solución a un punto cercano o igual al punto isoeléctrico (Harris y Angal 1994).

La precipitación isoeléctrica es una técnica bien establecida, fácil de implementar a gran escala y atractiva para recuperar sin dañar la estabilidad de compuestos biológicos (Glatz 1990).

Esta técnica explota la agregación y precipitación de las proteínas cuando se encuentran en su punto isoeléctrico. El punto isoeléctrico es característico de cada proteína.

Los residuos de algunos de los aminoácidos que forman parte de las proteínas se protonan y desprotonan dependiendo del pH en que se encuentran, adquiriendo de esta forma una carga electroquímica característica. El punto isoeléctrico es aquel valor de pH en el que la carga neta electroquímica de la proteína es cero, es decir, la proteína tiene el mismo número de cargas positivas y negativas. En el valor de pH correspondiente al punto isoeléctrico, la proteína tiende a precipitar ya que al tener carga electroquímica nula, no existen repulsiones electrostáticas que impidan la aglomeración de las proteínas (Stryer 1992).

2.4 Objetivo de la investigación

En este trabajo, se examinó el uso de SDFA formados con PEG-Sulfato, PEG-Dextrano y PEG-Fosfato para definir etapas de extracción que permitan recuperar y purificar BFE a partir de *Porphyridium cruentum*. Adicionalmente, se evaluó el uso de precipitación isoeléctrica después de ruptura celular para aumentar la pureza de BFE proveniente del extracto crudo y aumentar la eficiencia de las etapas de extracción subsecuentes utilizando SDFA. La precipitación isoeléctrica en conjunto con SDFA fueron evaluadas a fin de establecer un proceso para obtener BFE purificada (pureza mayor a 4.0) a partir de extracto celular de *Porphyridium cruentum*.

2.5 Hipótesis de la investigación

La recuperación y purificación de B-ficoeritrina mediante sistemas PEG-Fosfato, PEG-Sulfato y PEG-Dextrano, en conjunto con la precipitación isoeléctrica previa al SDFA, dará como resultado un proceso para la obtención de B-ficoeritrina purificada (pureza mayor a 4.0 definida como la relación de absorbancias a $Abs_{545nm} / Abs_{280nm}$).

Capítulo 3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos

Los experimentos con sistemas de dos fases acuosas se prepararon utilizando soluciones estándar de poli-etilen-glicol (PEG, Sigma Chemicals USA) de peso molecular nominal de 1000 y 1450 g/mol y dextrano de peso molecular nominal 40,000, 70,000 y 500,000 g/mol, (Dextrano, Sigma Chemicals USA) todas preparadas al 80% (p/p) en agua bidestilada. Las soluciones salinas fueron preparadas utilizando fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) y sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) (Sigma Chemicals USA).

La solución estándar de fosfatos al 40% (p/p) utilizada para los SDFAs se preparó en una relación 7:18 con fosfato monobásico y dibásico, respectivamente. Para preparar 100g de esta solución se pesaron 11.2g de fosfato monobásico, 28.8g de fosfato dibásico y se disolvieron en 60g de agua bidestilada. Esta solución se mezcló con un agitador magnético de pastilla hasta obtener una solución homogénea y totalmente cristalina. Finalmente, se ajustó el pH a 7 con una solución de ácido ortofosfórico (45.6 N) o hidróxido de potasio (1N) según fue necesario.

Las soluciones estándar de sulfatos se prepararon con sulfato de sodio anhidro al 30% (p/p) en agua bidestilada. La disolución de los compuestos se realizó de la misma manera antes señalada para la solución estándar de fosfatos. El pH de la solución fue ajustado a 7, 6, 5 y 4 con ácido sulfúrico (5N) y como resultado se obtuvieron cuatro soluciones estándar de sulfato. El pH inicial de los SDFAs está en función del pH de la solución salina utilizada (Benavides y Rito Palomares 2004).

3.1.2 Material biológico

Durante la presente investigación se trabajó con una cepa axénica de *Porphyridium cruentum* (CDBB-A-001002 IPN) adquirida en el CINVESTAV (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados). La cepa fue recibida en un tubo de ensayo de vidrio de 15mL en medio líquido y cultivada en el medio sugerido (Sección 3.3.2) durante 7 meses previos al inicio de esta investigación.

3.2 Técnicas analíticas

3.2.1 Cuantificación de proteína total mediante el método de Bradford

La cuantificación de proteína total se llevo acabo utilizando el método de Bradford (1976). El método está basado en la unión del colorante azul brillante (Coomasie G-250) a los residuos básicos (principalmente arginina) y aromáticos de las proteínas, dando como resultado un complejo coloreado que tiene un pico máximo de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Es en esta longitud de onda (595nm) en donde se realizan las lecturas de absorbancia para determinar la concentración de proteína total.

Para la determinación de proteína se agregaron 1.5 mL del reactivo de Bradford (Bradford reagent B6916, Sigma Chemicals USA) a 50 μ L de la solución problema. La muestra fue agitada por inversión y se dejó reposar durante 10 minutos de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el proveedor (Sigma Chemicals USA). Todos los ensayos se llevaron acabo por triplicado a temperatura ambiente (22-25°C).

Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 595nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible (Beckman DU650, Beckman Instruments USA). Para la determinación de proteína total se construyó una curva de calibración utilizando como proteína estándar albúmina bovina (BSA, B4287, Sigma Chemicals USA) preparada en soluciones de concentración conocida (0.1- 1.2mg/mL).

3.2.2 Determinación de la concentración de B-ficoeritrina

La concentración de B-ficoeritrina fue estimada de acuerdo al método espectrofotométrico previamente reportado para la cuantificación de esta proteína (Bermejo y col. 2002, Benavides y Rito Palomares 2004). Este método utiliza un sistema de ecuaciones simultaneas (Ec. 3.1, Ec. 3.2 y Ec. 3.3) desarrollado por Bennet y Bogorad (1973) el cual, mediante relaciones de absorbancia a diferentes longitudes de onda (565, 620 y 650nm) estima la concentración de BFE y otras ficobiliproteínas (APC; aloficocianina, RPC; R-ficocianina) presentes en la muestra.

$$RPC(mg / mL) = \frac{(OD_{620nm} - 0.8OD_{650nm})}{7.38} \quad \text{Ec. 3.1}$$

$$APC(mg / mL) = \frac{(OD_{650nm} - 0.19OD_{620nm})}{5.65} \quad \text{Ec. 3.2}$$

$$BFE(mg / mL) = \frac{(OD_{565nm} - 2.8[RPC] - 1.34[APC])}{12.7} \quad \text{Ec. 3.3}$$

El fundamento de estas ecuaciones se basa en el coeficiente de extinción constante que estas ficobiliproteínas (RPC, APC y BFE) presentan en longitudes de onda de 565, 620 y 650, al encontrarse dentro de un rango de densidad óptica (OD) de 0.05-1.0 (Bennet y Bogorad 1973). Para las lecturas de absorbancia a 565, 620 y 650nm, se utilizó un espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible (Beckman DU650, Beckman Instruments USA) con celdas de cuarzo (Micro Cell 8mm; Beckman Instruments USA).

Las lecturas se realizaron a temperatura ambiente (22-25°C). El porcentaje de recuperación de BFE se determinó relativo a la concentración de dicha proteína en el extracto crudo o clarificado alimentado al sistema.

3.2.3. Determinación de pureza de B-ficoeritrina mediante la relación de absorbancias

$$(Abs_{545nm} / Abs_{280nm})$$

La B-ficoeritrina exhibe tres picos de absorbancia en el espectro visible a 498, 545 y 563nm, siendo su pico máximo el de 545nm. De igual manera, esta proteína tiene dos picos de absorbancia en el espectro ultravioleta uno a 180nm debido a sus enlaces peptídicos y otro a 280nm debido a los residuos aromáticos (tirosina, triptófano y fenilalanina) en su estructura (Bryant 1982).

El método utilizado determina la pureza de B-ficoeritrina mediante la relación de absorbancias en la longitud de onda donde ésta proteína muestra su absorbancia máxima (545nm) y la longitud de onda en la cual todas las proteínas, debido a los residuos de los aminoácidos aromáticos, absorben luz ultravioleta (280nm). Consecuentemente, la pureza de la B-ficoeritrina (BFE) se determinó utilizando la relación de absorbancias ($Abs_{545nm} / Abs_{280nm}$) como se ha descrito previamente (Bermejo y *col.* 2002, Benavides y Rito Palomares 2004).

Se ha reportado que una relación de Absorbancia 545nm / Absorbancia 280nm (en lo posterior representada como $Abs_{545nm} / Abs_{280nm}$) superior a 4.0 clasifica a la BFE como producto comercial altamente purificado ($\geq 95\%$ de pureza) (Benavides y Rito-Palomares 2004, Prozyme 2003). Las lecturas de absorbancia a 280 y 545nm fueron realizadas en un espectrofotómetro ultravioleta-visible (Beckman DU650, Beckman Instruments USA) con celdas de cuarzo (Micro Cell 8mm; Beckman Instruments USA) a temperatura ambiente (22-25°C).

3.3 Fermentación de *Porphyridium cruentum*

Para la fermentación de *Porphyridium cruentum* se utilizó el protocolo recomendado por el proveedor de la cepa (CINVESTAV), el cual fue implementado por Benavides (2004) en el Laboratorio de Biotecnología del ITESM. El medio de cultivo utilizado para la fermentación fue el medio Algal (MA) preparado en agua de mar artificial (sección 3.3.1) como se describe en la sección 3.3.2.

3.3.1 Composición del agua de mar artificial

El agua de mar artificial se preparó de acuerdo a la especificación estándar para agua de mar artificial de la ASTM (American Society for Testing Materials, ASTM Designación D1141-75,1975).

El cloruro de estroncio (SrCl_2), el fluoruro de sodio (NaF) y los demás elementos traza, fueron omitidos. En la tabla 3.1 se muestra la composición detallada de los compuestos utilizados así como la cantidad utilizada para preparar un litro de agua de mar artificial.

Todos los compuestos fueron pesados en una balanza analítica (OHAUS USA). Posteriormente, se agregó el agua bidestilada correspondiente a la cantidad de solución deseada y se mezcló mediante el uso de un agitador magnético de pastilla hasta obtener una solución homogénea.

3.3.2 Composición del medio de cultivo Algal (MA)

En la tabla 3.2 se describen los compuestos y las cantidades utilizadas para la preparación del medio de cultivo Algal (MA) (Fábregas y col. 1984), el cual fue preparado utilizando agua de mar artificial (sección 3.3.1). Todos los compuestos se pesaron en una balanza analítica (OHAUS USA) y fueron disueltos en la cantidad de agua de mar artificial correspondiente.

Posteriormente, esta solución se mezcló a temperatura ambiente (22-25°C) utilizando un agitador magnético de pastilla hasta lograr una solución homogénea. El pH del medio de cultivo fue ajustado a 7.6 con ácido clorhídrico (1N) o hidróxido de sodio (1N) según fue necesario y posteriormente fue esterilizado en una autoclave de 15 L (Electric Pressure, Steam Sterilizer Model N°25X) a 15 psi durante 20 minutos.

3.3.3 Condiciones de cultivo

Porphyridium cruentum fue cultivado en un sistema de fermentación de un solo lote. Para ello, se utilizó el medio MA en matraces Erlenmeyer con un volumen de 1.0 L y a temperatura ambiente (22-25°C). El cultivo fue sometido a aireación mediante el uso de una bomba para aire ELITE799 (Hagen USA) de 115 Volts y con un flujo volumétrico aproximado de 9.63 cm³/seg.

El inóculo de *Porphyridium cruentum* utilizado para iniciar la fermentación se encontraba en el medio de cultivo antes descrito (sección 3.3.2) y su volumen fue de 100mL (1.8g de biomasa húmeda) por cada litro de medio de cultivo a fermentar.

Una vez esterilizado el medio de cultivo, se inoculó *Porphyridium cruentum* en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar The Baker Company, Inc. Sterilchem Gard 4TX).

Las células se cultivaron durante 30 días bajo las condiciones antes descritas y siguiendo el protocolo sugerido en investigaciones previas (Benavides y Rito-Palomares 2004). Al terminar la fermentación se recuperaron 25g de biomasa húmeda por cada litro de caldo de fermentación.

Tabla 3.1 Composición del agua de mar artificial utilizada para la preparación del medio de cultivo Algal (MA) para *Porphyridium cruentum*.

Nombre del Compuesto*	Fórmula	Concentración (g/L)
Cloruro de sodio	NaCl	24.53
Cloruro de magnesio	MgCl ₂	5.20
Sulfato de sodio	Na ₂ SO ₄	4.09
Cloruro de calcio	CaCl ₂	1.16
Cloruro de potasio	KCl	0.70
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	0.20
Bromuro de potasio	KBr	0.10
Acido bórico	H ₃ BO ₃	0.03

*Todos los compuestos utilizados para la preparación del medio de cultivo fueron de grado reactivo.

Tabla 3.2 Composición del medio de cultivo utilizado para la fermentación de *Porphyridium cruentum*.

Nombre del Compuesto*	Fórmula	Concentración (mg/L)
Nitrato de sodio	NaNO ₃	170.00
Fosfato de sodio monobásico	NaH ₂ PO ₄	13.80
Cloruro de zinc	ZnCl ₂	0.14
Cloruro manganoso	MnCl ₂	0.20
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄	0.24
Cloruro de cobalto	CoCl ₂	0.01
Sulfato de cobre	CuSO ₄	0.03
EDTA sal disódica	Na ₂ C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈	9.90
Citrato de hierro	Fe ₃ (C ₆ H ₅ O ₇) ₂	4.50

*El medio de cultivo fue preparado en agua de mar artificial (sección 3.3.1). Todos los compuestos utilizados para la preparación del medio de cultivo fueron de grado reactivo.

3.4 Ruptura celular de *Phorphyridium cruentum* por sonicación

La biomasa proveniente de la etapa de fermentación fue recuperada mediante centrifugación a 2300 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se removió por decantación. La biomasa recuperada (25g de biomasa húmeda/L de fermentación) se utilizó para preparar un extracto concentrado al 20% (p/v) de biomasa húmeda en agua bidestilada. El extracto se colocó en un tubo de ensayo de vidrio de 50mL de capacidad.

El extracto concentrado de biomasa fue sometido a ruptura celular en un sonicador Branson 1510-MTH de 115 Volts (Bransonic, Ultrasonic Instruments) durante 12 minutos por cada gramo de biomasa húmeda siguiendo el protocolo reportado por Benavides y Rito-Palomares (2005). La temperatura del agua bidestilada utilizada en el tanque del sonicador se mantuvo constante a 4°C mediante la adición directa de hielo molido al tanque del sonicador.

El homogenizado resultante de la etapa de sonicación (incluyendo restos celulares) se le llamó “extracto crudo”. El sobrenadante resultante de someter a centrifugación a 2300 x g durante 5 minutos el extracto crudo, se le llamó “extracto clarificado”.

3.5 Precipitación isoelectrica escalonada

La precipitación isoelectrica aplicada al extracto crudo de B-ficoeritrina obtenido de la ruptura celular de *Porphyridium cruentum* se realizó siguiendo el protocolo descrito por Zaman y col. (1999).

El pH del extracto crudo y de las soluciones fue determinado mediante el uso de un potenciómetro digital (Beckman Instruments USA). Para iniciar la precipitación se partió de 100mL de extracto crudo con un valor de pH de 6.9. Posteriormente, mediante la adición de HCl 0.1M, se ajustó el pH del extracto y se tomaron muestras de 1.0mL en un rango de pH de 6.9 a 1.5.

Todas las soluciones obtenidas fueron centrifugadas a 2300 x g durante 3 minutos. El sobrenadante resultante fue recuperado por decantación y el precipitado fue resuspendido en su volumen original (1.0mL) con una solución amortiguadora de fosfatos. Para preparar la solución amortiguadora de fosfatos se pesaron 15.67g de fosfato de potasio dibásico y 1.36g de fosfato de potasio monobásico para después ser mezclados y aforados a 1.0 L con agua bidestilada. El pH de la solución amortiguadora fue ajustado a 7.0 mediante la adición de ácido ortofosfórico al 45.6N. Cada una de las muestras fue caracterizada mediante la determinación de pureza, concentración y porcentaje de recuperación de B-ficoeritrina mediante los métodos antes descritos (sección 3.2.3 y 3.2.2 respectivamente). Los resultados reportados en este trabajo representan el promedio de tres experimentos independientes y el error estándar fue estimado en un máximo de $\pm 10\%$ del promedio.

3.6 Construcción de Sistemas de dos fases acuosas para la recuperación de B-ficoeritrina

Para la construcción de los sistemas de dos fases acuosas, se pesaron las soluciones estándar (PEG, dextrano, sulfato de sodio o fosfato de potasio y extracto crudo de B-ficoeritrina) a las composiciones definidas (Ver tabla 3.4) para cada sistema y se agitaron por 10 minutos hasta lograr la mezcla total de los compuestos. Cuando fue necesario se ajustó el pH mediante la adición de ácido ortofosfórico (45.6N) o hidróxido de potasio (1N). La separación de las fases se logró mediante centrifugación a 2000 x g por 10 minutos en una microcentrífuga para tubos Eppendorf (Microcentrifuge, Eppendorf) o en una centrifuga (Ultra-Turrax, IKA Works, Inc.) para tubos de 15mL. Los volúmenes de las fases superior e inferior fueron estimados por observación visual utilizando tubos graduados de 1.8mL y 10mL. Posteriormente se estimó la relación de volumen de las fases (V_r , definida como el volumen de la fase superior dividido por el volumen de la fase inferior).

A fin de realizar los análisis necesarios, se extrajeron muestras de las fases. La pureza de B-ficoeritrina se estimó mediante la relación de absorbancias ($Abs_{545nm} / Abs_{280nm}$). La cuantificación de B-ficoeritrina se determinó mediante el sistema de ecuaciones descrito en la sección 3.2.2.

La recuperación de BFE de la fase superior se estimó como la cantidad de B-ficoeritrina presente en la fase (volumen de la fase por concentración de B-ficoeritrina en la fase) y se expresó relativa a la cantidad original (mg) de B-ficoeritrina alimentada al sistema de dos fases acuosas. Los resultados reportados en este trabajo representan el promedio de tres experimentos independientes y el error estándar fue estimado en un máximo de $\pm 10\%$ del promedio.

Tabla 3.3 Composiciones de los sistemas de dos fases acuosas seleccionados para evaluar el efecto de partición sobre la pureza y porcentaje de recuperación de B-ficoeritrina.

Sistema	Fase superior	Concentración de PEG % (p/p)	Fase inferior	Concentración de Dextrano o Sal % (p/p)	Vr
I	PEG1450	18.3	Sulfato	11.0	1.0
II	PEG1000	29.5	Fosfato	9.0	1.0
III	PEG1000	18.0	Fosfato	15.0	1.5
IV	PEG1450	12.0	Dextrano 40	12.0	1.6
V	PEG1450	10.0	Dextrano 70	13.0	1.0
VI	PEG1450	10.0	Dextrano 500	13.0	1.0
VII	PEG1450	12.0	Dextrano 500	12.0	1.6
VIII	PEG1450	14.0	Dextrano 500	11.0	2.5

El uso de PEG1450 y PEG1000 representa el peso molecular nominal del poli-etilen-glicol; 1000 y 1450 (g/mol) respectivamente. De igual manera, 40, 70 y 500 representa el peso molecular nominal del dextrano; 40,000, 70,000, 500,000 (g/mol). Los sistemas comprendidos PEG-Sulfato tuvieron una base másica fija de 10g y se prepararon en tubos de plástico cónicos de 15 mL. El pH los sistemas PEG-Sulfato se varió (7.0, 6.0, 5.0 y 4.0) utilizando las soluciones de sulfato descritas en la sección 3.1.1. Los sistemas PEG-Dextrano y PEG-Fosfato se prepararon con una base másica fija de 1.5g en tubos eppendorf de 1.8mL y se agitaron bajo las mismas condiciones descritas para los sistemas PEG-Sulfato. El pH de los sistemas PEG-Dextrano y PEG-Fosfato se ajustó a 7.0 mediante la adición de ácido ortofosfórico (45.6N) o hidróxido de potasio (1N) según fue necesario. La relación de volúmenes (Vr) definida como el volumen de fase superior entre el volumen de fase inferior, se determinó en SDFa sin material biológico y utilizando tubos de plástico graduados.

3.7 Electroforesis SDS-PAGE

Con la finalidad de determinar el peso molecular de los contaminantes removidos a través del proceso de extracción y purificación de B-ficoeritrina, así como para comprobar la presencia de éstos en las muestras purificadas, se utilizó electroforesis desnaturalizante discontinua en geles de poliacrilamida (PAGE; polyacrilamide gel electrophoresis) con dodecil sulfato de sodio (SDS; sodium dodecyl sulfate).

La electroforesis en geles de poliacrilamida es un método analítico que permite caracterizar la pureza de las proteínas además de ser utilizado como método de monitoreo en los procesos de purificación e identificación de contaminantes (Harris y Angal 1994). Este método utiliza como fundamento la movilidad que exhiben algunas moléculas cargadas al ser expuestas a un campo eléctrico.

Las proteínas por naturaleza y fuera de su punto isoelectrico, están cargadas negativa o positivamente dependiendo de la solución en la cual estén contenidas. Esta característica las vuelve atractivas para ser separadas mediante la técnica de electroforesis (Harris y Angal 1994).

La velocidad de migración de las proteínas dependerá del tamaño o peso molecular de las mismas (Laemmli 1970). Las moléculas más pequeñas se desplazan fácilmente a través de los poros del gel, mientras que las moléculas más grandes se desplazan con mayor dificultad, oponiendo mayor resistencia y desplazándose a menor velocidad.

Una vez que se tiene las proteínas distribuidas en el gel, estas son teñidas con agentes colorantes como el azul *coomasie* para poder ser identificadas de manera visual. La desnaturalización de las proteínas con calor en presencia de agentes detergentes aniónicos como el SDS y agentes tioles (mercaptoetanol) permite que la mayoría de los polipéptidos se unan al SDS a una relación de peso constante, tal que puedan exhibir densidades de cargas idénticas que les permiten migrar en los geles de poliacrilamida de acuerdo a su tamaño. Bajo estas condiciones, se puede obtener una relación lineal entre el logaritmo del peso molecular de los polipéptidos y su movilidad relativa (Hames y Rickwood 1982).

Preparación y composición de geles

La electroforesis se llevó a cabo en una cámara de electroforesis vertical (Miniprotean III; BioRad USA). Para la preparación de los geles fueron seguidos los protocolos y metodologías proporcionadas con el equipo de electroforesis utilizado (Miniprotean III; BioRad USA). En la Tabla 3.5 se muestran las composiciones utilizadas para preparar el gel de corrida y el concentrador. Primero se preparó el gel de corrida, se pipeteó entre los vidrios de la cámara y se dejó polimerizar. Después de 30 minutos y una vez que el gel de corrida polimerizó, se prosiguió a preparar el gel concentrador. Para ello se siguió el mismo procedimiento antes mencionado con el gel de corrida a diferencia que al final de pipetear entre los vidrios, se colocaron los carriles que sirvieron de guía para cargar las muestras. El gel de corrida ocupó 2/3 partes de el área total del gel mientras que el gel concentrador solo ocupó 1/3 del área total del gel.

Preparación de muestras para geles

Para el acondicionamiento de las muestras se preparó la solución amortiguadora de las muestras con la composición descrita en la Tabla 3.6. Todos los reactivos junto con el agua deionizada fueron mezclados a excepción del mercaptoetanol. Posteriormente, se tomaron 50 μ L de mercaptoetanol y se disolvieron en 950 μ L de la solución amortiguadora previamente preparada.

La solución resultante fue utilizada para disolver cada una de las muestras provenientes de las diferentes etapas de extracción y purificación a una relación 1:1. Finalmente, las soluciones fueron calentadas en baño María a 95°C durante 4 minutos y cargadas en cada uno de los pozos de los geles.

Las muestras utilizadas para correr el gel, fueron aquellas soluciones resultantes de cada una de las etapas del proceso de extracción y recuperación propuesto durante la presente investigación (Ver Sección 4.3)

El estándar de pesos moleculares utilizado (161-0374; BioRad USA) tenía un rango de pesos moleculares de 10 a 250 kDa y fue cargado directamente en el gel en el carril A. El estándar de B-ficoeritrina (Prozyme; PB70262006) fue cargado en el carril B.

Tabla 3.4 Componentes utilizados para preparar 10mL de monómero utilizado para los geles de poliacrilamida.

Nombre del compuesto	Cantidades	
	Gel de corrida (14%)	Gel concentrador (4%)
Acrilamida/Bis acrilamida (30%)	4.7mL	1.3mL
1.5 M Tris-HCl pH 8	2.5mL	---
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	---	2.5mL
Agua deionizada	2.7mL	6.1mL
Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% (p/v)	0.1mL	0.1mL
Persulfato de Amonio (APS) al 10% (p/v)	1.0mL	1.0mL
TEMDED	10 μ L	10 μ L

La acrilamida /bis al 30% fue obtenida mezclando 87.6g de acrilamida y 2.4g de N'N'-bis-metil-acrilamida y aforada a 300mL con agua deionizada. La solución 1.5M Tris-HCl pH 8 se obtuvo mezclando 27.23g de Tris base con 80 mL de agua deionizada. Posteriormente, se ajustó el pH a 8.8 con una solución 6N de HCl. La solución de 0.5M Tris-HCl pH 6.8 se obtuvo mezclando 6g de Tris base con 60mL de agua deionizada y se ajustó el pH de la solución a 6.8 con HCl 6N. Todas las soluciones fueron almacenadas a 4°C previas a ser utilizadas. El SDS al 10% (p/v) se obtuvo disolviendo 10g de SDS y aforado a 100mL de agua deionizada. El APS al 10% (p/v) fue preparado 10 minutos antes de ser utilizado y se obtuvo mezclando 100mg de persulfato de amonio y 1.0mL de agua deionizada. El 14 y 4% (p/p) utilizados en la parte superior de las tablas representan la concentración de acrilamida y bisacrilamida para el gel de corrida y concentrador respectivamente.

Tabla 3.5 Componentes utilizados para preparar la solución amortiguadora de la muestra.

Compuesto	Cantidad
Agua deionizada	3.55mL
0.5M Tris-HCl pH 6.8	1.25mL
Glicerol	2.5mL
SDS al 10% (p/v)	2.0mL
0.5% Azul bromoferol	0.2mL
Mercaptoetanol	50 μ L

Todos los compuestos con excepción del mercaptoetanol fueron mezclados en las cantidades antes señaladas en un tubo cónico de plástico con volumen de 50mL. Se utilizaron 950 μ L de esta solución amortiguadora para disolver los 50 μ L de mercaptoetanol. La solución resultante se utilizó para disolver la muestra a una relación 1:1.

Procedimiento de corrida

Una vez cargadas las muestras en los geles, la cámara se llenó con una solución amortiguadora de corrida (10x Tris/Glicina/SDS, pH 8.3, 1610772; BioRad USA) y fue conectada a una fuente de poder eléctrica (Power supply Model 200/2.0 BioRad USA) a 150 Volts durante 90 minutos.

Después de los 90 minutos, se desconectó la cámara de la fuente de poder y los geles obtenidos fueron lavados con agua bidestilada y sometidos a una solución de tinte (3% metanol, 1% ácido acético, 6% agua bidestilada y 0.3% con azul *coomasie*; Coomassie Blue Satín IX, BioRad USA) durante 2 horas. Finalmente, los geles fueron sometidos a una solución de destinte (40% metanol, 7%, ácido acético y 53% de agua bidestilada) durante 6 horas.

Determinación de la movilidad relativa

La movilidad relativa fue determinada siguiendo el protocolo descrito por Hames (1998) utilizando un estándar con un rango de pesos moleculares de entre 10 y 250 kDa proporcionado por el proveedor (BioRad USA). El gel resultante fue fotodocumentado y utilizado para medir las distancias recorridas de cada una de las bandas del estándar y de las muestras.

Para la determinación de la movilidad relativa de las proteínas en el gel, se utilizó el estándar de pesos moleculares y se determinó la relación de la distancia recorrida de cada una de sus bandas (Ver Figura 3.1; dB_x ; donde $x = 1$ (250 kDa), 2 (150 kDa),...10 (10 kDa)) entre la distancia total

recorrida por el estándar de menor peso molecular (dT) obteniendo como resultado $Mr_x = dB_x/dT$.

En la Figura 3.1. se muestra de manera gráfica las mediciones realizadas en el gel.

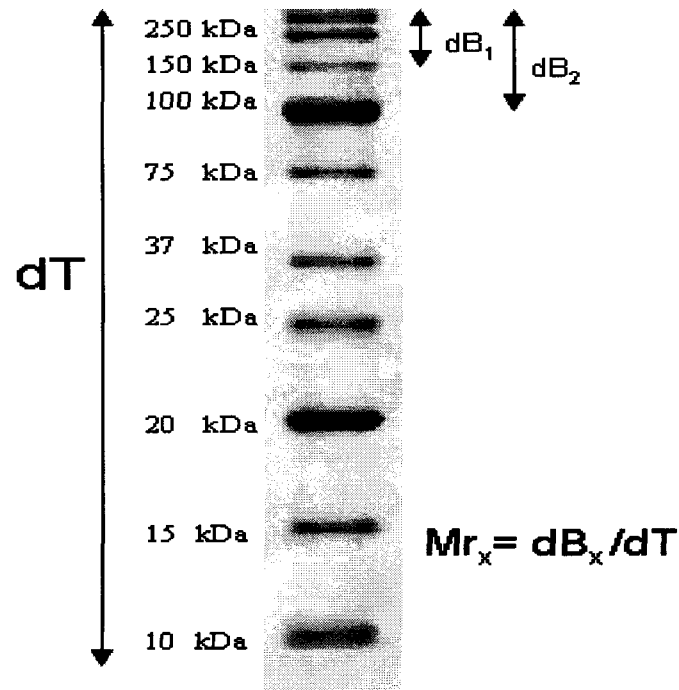


Figura 3.1 Determinación de movilidad relativa (Mr) en los geles de poliacrilamida mediante la relación de distancias recorridas por cada una de las proteínas del estándar (DB_x) y la distancia total (dT)

Una vez que se tuvieron los datos correspondientes, se graficó el logaritmo natural del peso molecular ($\ln PM$) contra la movilidad relativa (Mr) de cada una de las bandas del estándar y este gráfico sirvió para calcular los pesos moleculares de las bandas identificadas en las muestras provenientes de cada una de las etapas del proceso de extracción y purificación de B-ficoeritrina.

Capítulo 4. Resultados y Discusión

4.1 Recuperación y purificación de B-ficoeritrina en sistemas de dos fases acuosas

Para el diseño de un proceso particular de extracción con SDFA, una vez que condiciones generales (por ejemplo, el tipo de polímero y sal) han sido seleccionadas con base en la experiencia o limitaciones de proceso, condiciones más específicas (concentración de polímero y sal, relación de volumen de las fases, etc.) necesitan ser definidas experimentalmente. Con el fin de evaluar el comportamiento de partición de BFE en SDFA y beneficiar la etapa de extracción mediante un posible incremento en el porcentaje de recuperación y pureza, se identificaron los SDFA cuya fase inferior estuviera compuesta por una sal (sulfato o fosfato) o dextrano. Las condiciones experimentales iniciales de los SDFA seleccionados fueron establecidas en base a reportes previos (Rito-Palomares *y col.* 2000b, 2001).

Con el objetivo de evaluar sistemas con un pH cercano al punto isoeléctrico de BFE (4.2-4.3; Koller *y col.* 1977) y debido a la inestabilidad (precipitación de sales) que los sistemas PEG-Fosfato presentan en valores de pH menores de 6.9 (Benavides y Rito-Palomares 2005), sistemas PEG-Sulfato fueron seleccionados. Los sistemas PEG-Sulfato permitieron evaluar el impacto del pH en la extracción y purificación de BFE (Tabla 4.1).

Adicionalmente, se evaluó el comportamiento de BFE en sistemas PEG-Fosfato con composiciones previamente reportadas como óptimas por Benavides y Rito Palomares (2004) a fin de comparar los resultados obtenidos de pureza y porcentaje de recuperación en fase superior de BFE.

Es claro que el uso de SDFA con sulfato no favoreció el incremento de la pureza o el porcentaje de recuperación de la fase superior de B-ficoeritrina (Tabla 4.1). Por el contrario, la pureza inicial del extracto crudo utilizado disminuyó ligeramente de 0.7 a 0.6 después de utilizar SDFA PEG1450- Sulfato, como resultado el factor de purificación fue inferior a uno (0.86). Este comportamiento coincide con el reportado en la partición de otro colorante proteico (c-ficocianina producida por *Spirulina maxima*) en SDFA con sulfato, en donde se documentó un incremento moderado en la pureza de la proteína (Rito-Palomares *y col.* 2001) asociado a la contaminación por la presencia de fragmentos celulares en la interfase de los sistemas.

En el estudio de la partición de BFE no fue posible determinar experimentalmente presencia de BFE en la interfase, debido a la presencia de fragmentos celulares. Es posible que la acumulación de BFE en la interfase o la posible precipitación proteica, asociada con los bajos porcentajes de recuperación de BFE de la fase superior (20-23% en Tabla 4.1), afectaran como en el caso del estudio de c-ficocianina, la pureza de la proteína de interés.

Tabla 4.1 Pureza y porcentaje de recuperación de la fase superior de B-ficoeritrina en SDFA PEG-Sulfato alimentado con extracto crudo.

Sistemas	pH	Pureza de B-ficoeritrina	Recuperación en fase superior de B-ficoeritrina (%)	Factor de Purificación
I-PEG1450-sulfato	4.0	0.60 ± 0.01	20.0 ± 0.5	0.86
	5.0	0.62 ± 0.01	23.0 ± 0.5	0.89
	6.0	0.60 ± 0.01	21.0 ± 0.5	0.86
	7.0	0.58 ± 0.01	20.0 ± 0.5	0.83
II-PEG1000-fosfato	7.0	1.8 ± 0.01	91.0 ± 4.0	2.6

Los sistemas comprendidos PEG 1450 y sulfato (18.3% p/p y 11.0% p/p respectivamente) fueron seleccionados para evaluar el impacto del incremento del pH en la pureza y recuperación de la B-ficoeritrina en fase superior. Para todos los sistemas la relación de volumen (estimado de manera experimental en sistemas sin material biológico) y la concentración del extracto crudo de B-ficoeritrina fueron mantenidos constantes a 1.0 y 40% (p/p), respectivamente. El sistema PEG 1000 (29.5% p/p) y fosfato (9.0% p/p) fue probado para realizar una comparación directa entre los resultados de pureza y porcentaje de recuperación en fase superior arrojados por ambos SDFA PEG-Sal. La recuperación de BFE en fase superior se expresa de manera relativa a la concentración de BFE original del extracto crudo alimentado a los SDFA. La pureza de BFE es definida como la relación de las absorbancias a 545 y 280nm (pureza de BFE igual a A_{545nm} / A_{280nm}) y el factor de purificación es la pureza de BFE obtenida de los SDFA dividida entre la pureza del extracto crudo proveniente de ruptura celular (pureza igual a 0.7).

A pesar de que ha sido reportado que los sistemas PEG-Sulfato son capaces de recuperar productos biológicos como plásmidos vectores de DNA, Ricina-B producida en células de tabaco, proteinasas extraídas de atún, (Klomklao *y col.* 2005, Trindale *y col.* 2005, Zhang C. *y col.* 2005, respectivamente) y en algunos casos reportados con mejores resultados que los sistemas PEG-Fosfato (Zhang Ch. *y col.* 2005), durante el presente estudio, BFE altamente purificada (pureza superior a 4.0) no fue obtenida.

En contraste, resulta evidente que el uso de SDFA PEG-Fosfato, utilizando las condiciones de sistemas identificadas previamente como una de las óptimas (Benavides y Rito-Palomares 2004), presentó un incremento en la pureza de BFE del extracto crudo de 0.7 a 1.8. Como resultado la pureza de BFE obtenida por sonicación se incrementó en 2.6 veces y se obtuvo un porcentaje de rendimiento superior al 90% (Tabla 4.1) después de la etapa de extracción por SDFA. El beneficio de este tipo de SDFA sobre el comportamiento de BFE ha sido reportado previamente (Benavides y Rito-Palomares 2004) cuando se utilizó extracto crudo de B-ficoeritrina concentrado por precipitación con sulfato de amonio. Sin embargo no se obtuvo BFE altamente purificada (pureza superior a 4.0). Consecuentemente, SDFA adicionales que utilizan dextrano como fase inferior fueron seleccionados, a fin de explorar el potencial incremento en la pureza del extracto crudo de BFE inicial.

En general, el uso de SDFA con PEG y dextrano para el desarrollo de procesos de extracción para la recuperación de productos biológicos se encuentra limitado por razones económicas.

Es decir, la aplicación de SDFA PEG-Dextrano se ha concentrado principalmente en la recuperación de productos de alto valor comercial por ejemplo, el cultivo de células de hibridomas (Zijlstra y col. 1996), adenovirus y retrovirus (Brass y col. 2000) en los cuales el costo del dextrano utilizado en la etapa de extracción es justificado con base al alto precio del producto final. En el caso de la recuperación y purificación de B-ficoeritrina utilizando SDFA con PEG y dextrano, el valor comercial de B-ficoeritrina altamente purificada (\$50 dólares/mg; Market Corporation, 2005) puede justificar potencialmente el uso de estos SDFA. Sin embargo, en esta etapa del presente trabajo no se consideraron cuestiones económicas.

El motivo principal que justifica el uso de SDFA con dextrano fue la necesidad de establecer un proceso de extracción que permitiera obtener B-ficoeritrina producida por *Porphyridium cruentum* con una pureza mayor o igual a 4.0.

El uso de SDFA PEG-Dextrano resultó en un aumento en la pureza inicial (0.7) del extracto crudo (Figura 4.1). En general, el uso de SDFA PEG1450-Dextrano500 (Figura 4.1) logró el mayor incremento en la pureza y porcentaje de recuperación de BFE en fase superior, cuando fueron procesados extracto crudo y clarificado. En particular cuando el extracto crudo al 10% fue alimentado al SDFA, la pureza máxima en la fase superior (2.68) fue obtenida. Esto representó un aumento de 3.8 veces en la pureza inicial con un porcentaje de recuperación en fase superior del 80% (Figura 4.2).

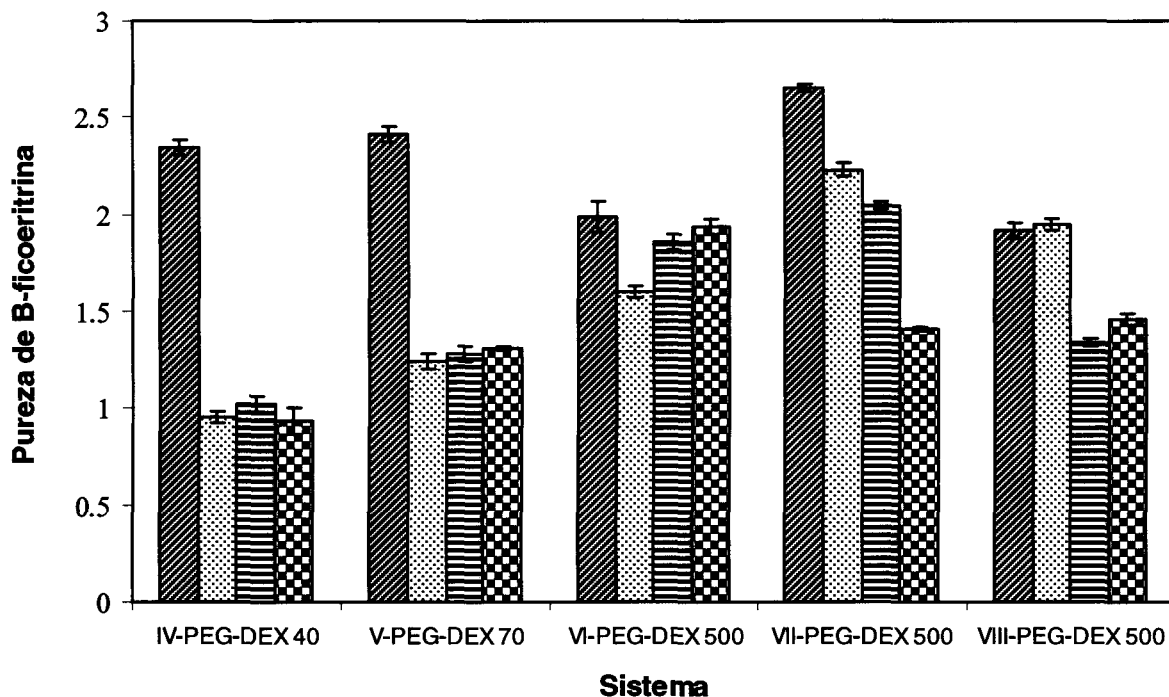


Figura 4.1 Pureza en fase superior de B-ficoeritrina obtenida en los SFA compuestos de PEG-Dextrano.

Para todos sistemas, fue evaluada la pureza partiendo de extractos crudos provenientes de la sonicación y extractos clarificados provenientes de una etapa adicional de centrifugación tal como se describe en materiales y métodos. La pureza del extracto alimentado crudo y/o clarificado fue de 0.7 para todos los sistemas. La pureza de BFE es definida como la relación de las absorbancias a 545 y 280 nm (pureza de BFE igual a A_{545nm} / A_{280nm}). La composición de los sistemas se define en la tabla 3.4 de la sección 3.6. ■ Extracto crudo al 10% (p/p) de muestra alimentada □ Extracto crudo al 40% (p/p) de muestra alimentada ▨ Extracto clarificado al 10%(p/p) de muestra alimentada ▩ Extracto clarificado al 40% (p/p) de muestra alimentada.

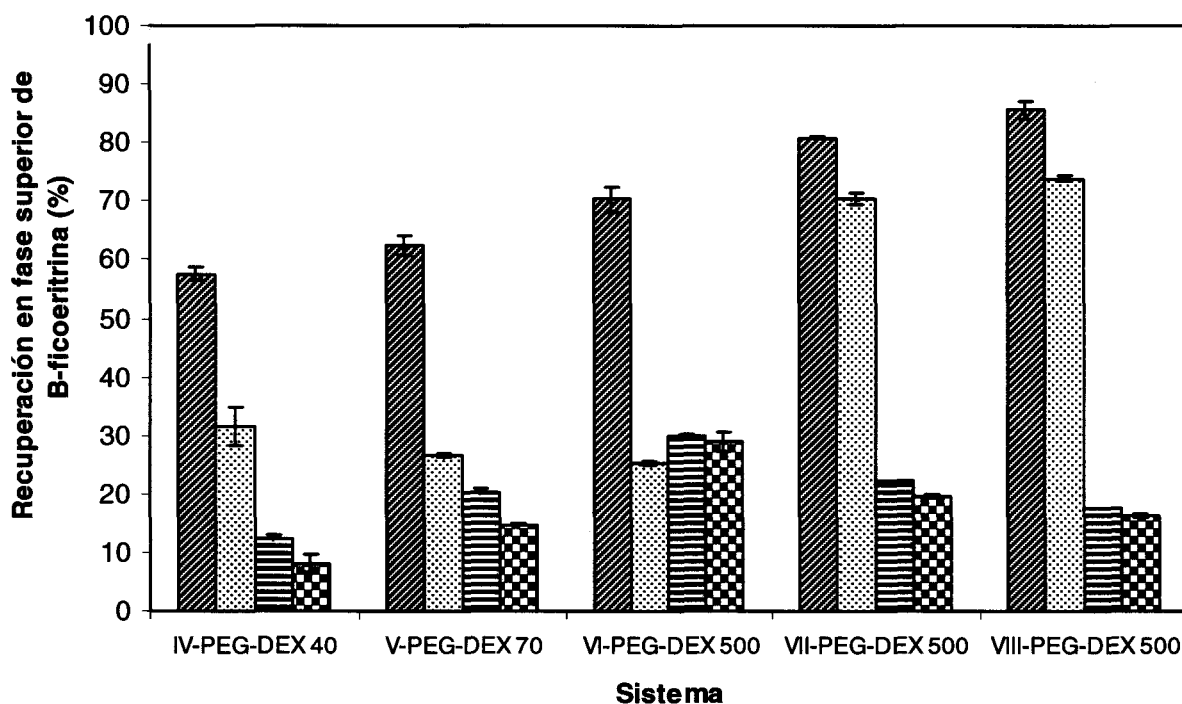


Figura 4.2 Porcentaje de recuperación en fase superior de B-fucoeritrina obtenido en los S DFA compuestos de PEG-Dextrano.

Para todos sistemas, fue evaluado el porcentaje de recuperación partiendo de extractos crudos provenientes de la sonicación y extractos clarificados provenientes de una etapa adicional de centrifugación tal como se describe en la sección de materiales y métodos. La pureza del extracto crudo y/o clarificado fue de 0.7 en todos los sistemas. El porcentaje de recuperación se expresa relativo a la concentración de BFE en el extracto crudo proveniente de la sonicación. La composición de los sistemas se define en la tabla 3.4 de la sección 3.6. ▨ Extracto crudo al 10% (p/p) de muestra alimentada ▩ Extracto crudo al 40% (p/p) de muestra alimentada ≡ Extracto clarificado al 10%(p/p) de muestra alimentada ⊞ Extracto clarificado al 40% (p/p) de muestra alimentada.

El comportamiento de las proteínas en los sistemas PEG-Dextrano fue documentado por Albertsson *y col.* (1987) y fue descrito mediante las fuerzas de repulsión y atracción que los polímeros ejercen entre sí. Las proteínas se ven atraídas por la fase polimérica de menor peso molecular y repelidas por las fases polimérica de mayor masa molecular. Este comportamiento se basa en dos fenómenos que se presentan simultáneamente al incrementar el peso molecular del polímero: a) aumento de la hidrofobicidad en la fase polimérica, y b) aumento en el volumen excluido (disminución en el volumen libre) (Huddleston *y col.* 1991a). El aumento en la hidrofobicidad al usar polímeros de alto peso molecular es debido a la reducción estequiométrica de los grupos hidrofílicos terminales en las moléculas de polímero, lo cual disminuye la afinidad del polímero (y en general de la fase polimérica) por el agua (Huddleston *y col.* 1991a).

La mayoría de las proteínas son solubles en agua, de tal forma que, al aumentar la hidrofobicidad de la fase, dicho compuesto tendrá menor afinidad hacia esta y tenderá a particionarse hacia la otra fase o bien, a la interfase. En los sistemas PEG-Dextrano evaluados se logró identificar claramente la afinidad de la BFE hacia la fase superior rica en PEG la cual tenía un peso molecular menor (1000 g/mol) al peso molecular del dextrano (40,000, 70,000 y 500,000 g/mol). En la Figura 4.3 se puede observar de manera visual la afinidad de la BFE por la fase superior rica en PEG y la acumulación de contaminantes en la fase inferior rica en dextrano.

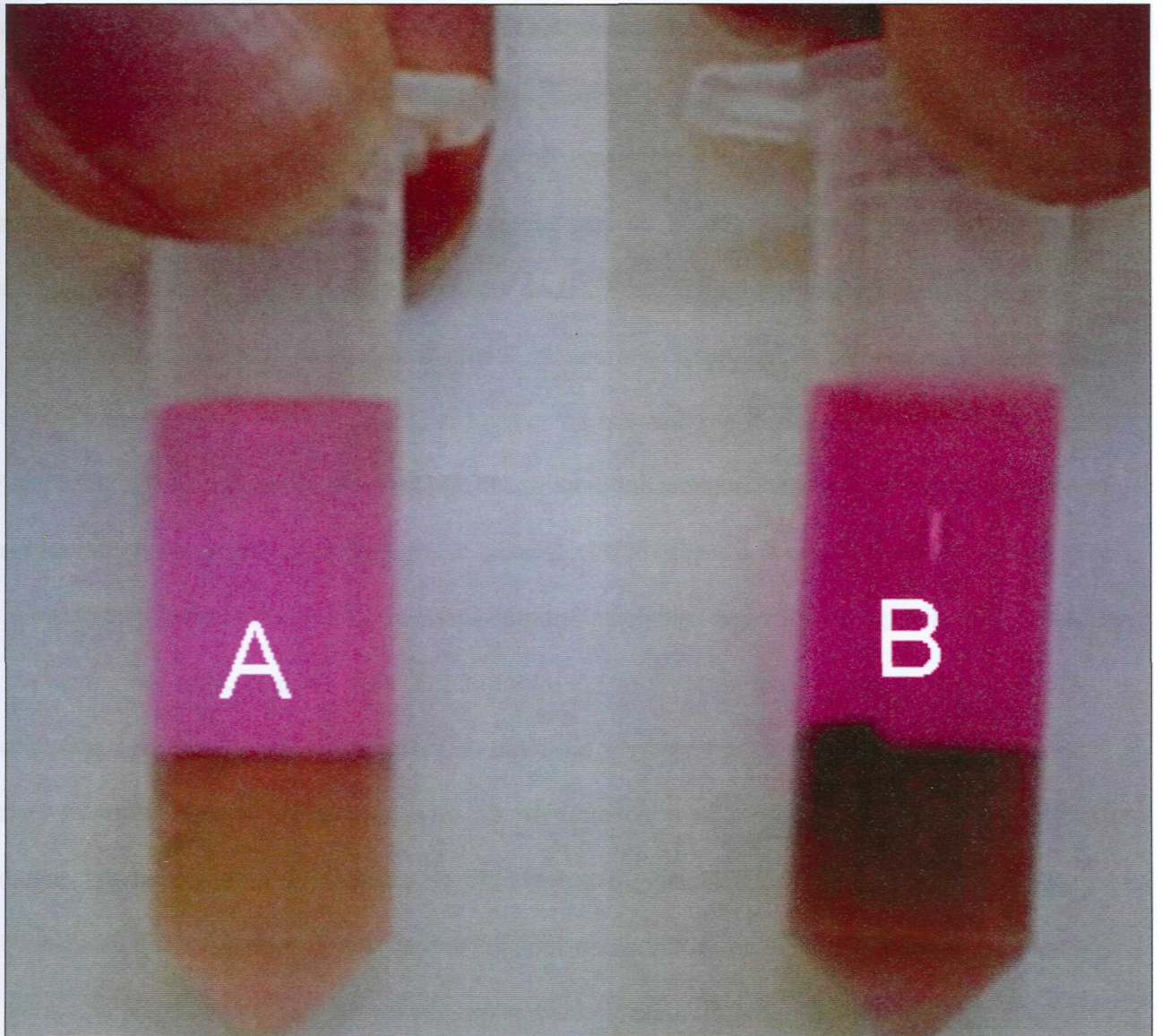


Figura 4.3 Sistemas de dos fases acuosas PEG1450-Dextrano500 con una concentración de 10% p/p (A) y 40% p/p (B) de extracto crudo proveniente de la sonicación.

Es claro observar que a medida que se aumentó el peso molecular del dextrano, se obtuvo una mayor pureza y porcentaje de recuperación de BFE en fase superior (rica en PEG) (Ver Figuras 4.1 y 4.2). Consecuentemente, el coeficiente de partición (definido como el cociente de la concentración de la proteína de interés en fase superior sobre su concentración en fase inferior) de las proteínas en fase superior (rica en PEG) se incrementa mediante el incremento del peso molecular del dextrano (fase inferior).

Por otra parte, se puede observar como los sistemas PEG-Dextrano alimentados con el 10% p/p de extracto crudo reportaron valores de pureza (Figura 4.1) y porcentaje de recuperación en fase superior (Figura 4.2) más altos que aquellos alimentados con el 40% p/p de extracto crudo.

El hecho de que las proteínas logren mayor partición en sistemas con polímeros de mayor peso molecular afecta directamente a la concentración de muestra que se podrá manipular en el sistema (Nivens *y col.* 1990). Este efecto es atribuido al aumento en la densidad del sistema causado por el uso de polímeros de alto peso molecular como es el caso del dextrano 500,000 g/mol y la concentración de los polímeros que componen el sistema.

En los resultados obtenidos para los sistemas PEG-Dextrano (Figura 4.1) se puede observar que conforme se aumentó el peso molecular del dextrano se logró una pureza mayor de BFE en fase superior (rica en PEG).

Por otro lado, de los tres sistemas PEG-Dextrano500 probados, el sistema VII con una concentración similar de PEG y Dextrano 500 (12% p/p) reportó la mayor pureza en fase superior de BFE (2.68).

Probablemente, un aumento excesivo en la densidad del sistema causado por el incremento en la concentración de PEG (14%) acompañado por una posible saturación de restos celulares en fase inferior del sistema VIII (Figura 4.3), tuvo como resultado la disminución en la pureza de BFE obtenida. Este fenómeno coincide con lo reportado por Bamberger y *col.* (1984) en donde se encontró que el aumento en la concentración de PEG daba como resultado un incremento en la densidad de la fase inferior rica en dextrano y una disminución en la solubilidad o dispersabilidad de otras moléculas en dicha fase. Por lo tanto, existe una mayor posibilidad de acumulación de contaminantes en la fase superior rica en PEG.

A pesar de que el uso de sistemas PEG-Dextrano40 y PEG-Dextrano70 logró un aumento en la pureza de BFE del extracto crudo inicial de 3 veces (de 0.7 a 2.3) y obtuvo un porcentaje de recuperación de entre 59 y 63%, respectivamente (Figura 4.2), no se logró superar los valores de pureza y recuperación obtenidos por los SDFAs PEG-Dextrano500 (2.68 y 85% respectivamente).

Es importante mencionar que cuando se probaron los mismos sistemas PEG-Dextrano con extracto clarificado de BFE, no se logró obtener valores de pureza mayores a 2.0 y el porcentaje de recuperación en fase superior de BFE de dichos sistemas fue muy bajo (10-30%) (Ver Figuras 4.1 y 4.2).

Es posible que una pérdida de la BFE en los restos celulares eliminados durante la centrifugación diera como resultado la disminución de la BFE en el extracto clarificado y una disminución en los porcentajes de recuperación de BFE en los sistemas PEG-Dextrano.

A pesar de intentos posteriores considerando parámetros de sistemas adicionales (por ejemplo; concentración de PEG y dextrano, relación de volumen de las fases, etc.), no se logró un aumento en la pureza de BFE superior a 2.68. Consecuentemente, no se consideró una optimización adicional de la etapa de extracción con SDFA PEG-Dextrano, bajo este esquema de purificación.

4.2 Recuperación y purificación de B-ficoeritrina producida por *Porphyridium cruentum* con precipitación isoeléctrica y sistemas de dos fases acuosas.

Diferentes estrategias de bioingeniería pueden ser adoptadas, a fin de optimizar un proceso determinado de recuperación y purificación. Enfoques que involucran una etapa de ultrafiltración posterior a SDFA a fin de eliminar proteínas contaminantes que contiene la proteína de interés ha sido documentado previamente (Rito-Palomares *y col.* 2001). Sin embargo, después de diversos intentos en la presente investigación no se logró un incremento en la pureza de BFE (pureza máxima obtenida 2.68).

Con el fin de obtener un producto con un nivel de pureza elevado, en la presente investigación se consideró un enfoque alternativo que involucró el procesamiento del extracto crudo de BFE obtenido de la etapa de ruptura celular antes de la etapa de extracción con SDFA.

De las distintas técnicas utilizadas comúnmente en las etapas iniciales de un proceso de recuperación y purificación para la concentración y purificación parcial de proteínas, se seleccionó la precipitación isoeléctrica para procesar el extracto crudo de BFE.

Considerando el éxito obtenido de la estrategia de precipitación isoeléctrica para la recuperación y purificación de proteínas como Lisozima (Zhang, C. *y col.* 2005) extraída de células de tabaco, extracción de α -lactalbumina de suero de leche (Bramaud, C. *y col.* 2000), entre otras, se decidió evaluar la implementación de esta etapa en el proceso de extracción y purificación de BFE.

La precipitación isoeléctrica, es una técnica bien establecida, y resulta atractiva porque es fácilmente adaptable a gran escala, utiliza equipo relativamente simple y puede ser utilizada con un riesgo muy bajo de dañar la estabilidad de los productos biológicos (Glatz 1990).

La resuspensión de los precipitados provenientes de la precipitación isoeléctrica a los diferentes valores de pH se muestra en la Figura 4.4 y la determinación de pureza y recuperación de BFE realizados a cada uno de ellos en la Figura 4.5. Es claro observar que, se obtuvo la máxima pureza de BFE (1.8) a un pH de 4.0. Este valor de pH (4.0) se encuentra muy cercano al punto isoeléctrico de BFE; (4.2– 4.4) (Koller *y col.* 1977). Estos resultados coinciden con uno de los principios establecidos por Harris y Angal (1994) en donde se establece que uno de los métodos más sencillos para la precipitación de una proteína con el objetivo de purificarla es mediante el ajuste del pH de la solución a un valor cercano o igual al punto isoeléctrico de la proteína de interés.

Los resultados de pureza obtenidos durante la precipitación isoeléctrica de BFE representan un aumento de 2.6 en la pureza del extracto crudo proveniente de la etapa de ruptura celular. A pesar de que el sobrenadante de la precipitación isoeléctrica fue examinado, la pureza de BFE no se incrementó con respecto a la del extracto crudo inicial. Por lo tanto, el precipitado obtenido a un pH de 4.0 fue seleccionado para ser procesado por SDFA. Mediante la precipitación isoeléctrica escalonada (Ver Figuras 4.4 y 4.5) aplicada al extracto proveniente de la sonicación se logró identificar de manera experimental el valor de pH óptimo para la obtención de BFE parcialmente purificada (1.8) y con un porcentaje de recuperación mayor al 70%.

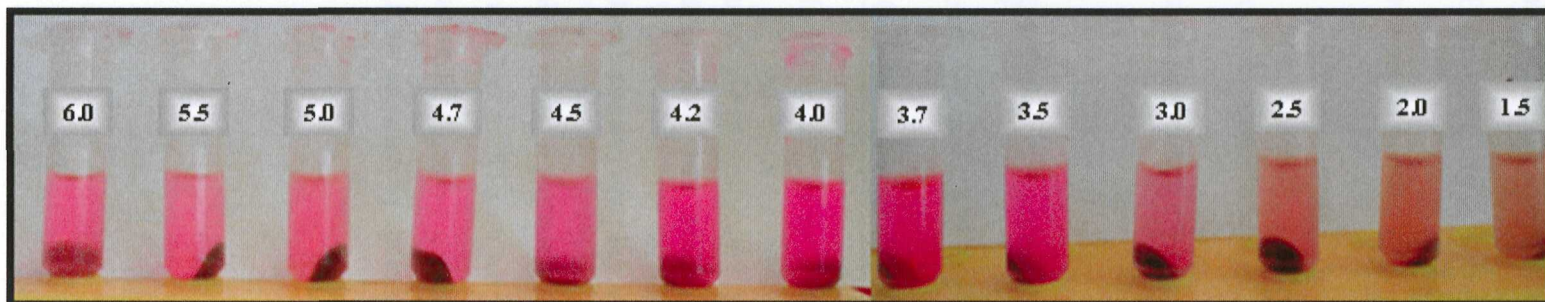


Figura 4.4 Fotografías provenientes de la etapa de precipitación isoelectrica de B-ficoeritrina (BFE) producida por *Porphyridium cruentum*.

Para todos los sistemas, se partió del extracto crudo proveniente de la sonicación con un valor de pH de 6.9 y fue modificado mediante la adición de HCL .1N dentro de un rango de pH de 6 a 1.5. La pureza de BFE es definida como la relación de las absorbancias a 545 y 280 nm (pureza de BFE igual a A_{545nm} / A_{280nm}) y el porcentaje de recuperación de BFE se expresa de manera relativa a la concentración de BFE original del extracto crudo.

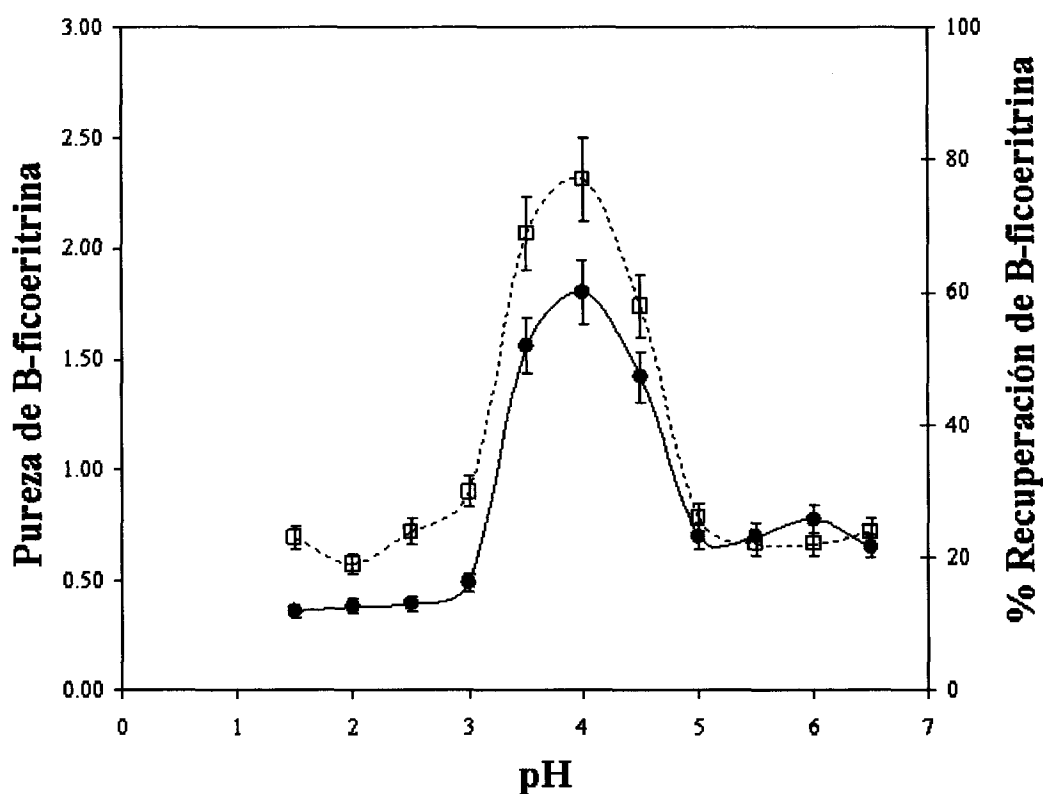


Figura 4.5 Pureza y porcentaje de recuperación de B-ficoeritrina producida por *Porphyridium cruentum* proveniente del precipitado isoeléctrico.

La pureza de B-ficoeritrina del precipitado isoeléctrico (producido como se describió en Materiales y métodos) es expresada relativa al pH utilizado. La pureza de BFE es definida como la relación de las absorbancias a 545 y 280 nm (pureza de BFE igual a $A_{545\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$). El porcentaje de recuperación se expresa relativo a la concentración de BFE en el extracto crudo proveniente de la sonicación. — Pureza de BFE, ----- Porcentaje de recuperación de BFE.

Los SDFA PEG1000-Fosfato (Sistemas II y III de la Figura 4.6) y PEG1450-Dextrano500 (Sistemas VII y VIII de la Figura 4.6) fueron seleccionados con base en los resultados de este trabajo y reportes previos de nuestro grupo de investigación (Benavides y Rito-Palomares 2005, Hernandez-Mireles y Rito-Palomares 2006b). Los sistemas seleccionados fueron probados únicamente con extracto crudo debido a que el uso de extracto clarificado no reportó beneficio en la obtención de pureza y porcentaje de recuperación (Ver Figuras 4.1 y 4.2).

Es claro que los resultados de pureza de BFE obtenidos con SDFA PEG-Fosfato fueron superiores a los obtenidos por SDFA PEG-Dextrano después de la etapa de precipitación isoeléctrica (Figura 4.6). Para el caso de los SDFA con PEG y dextrano, a pesar de que se obtuvo un alto porcentaje de recuperación de BFE (92-95% en Figura 4.7), no se logró un beneficio considerable en la pureza de la proteína. La pureza de BFE obtenida de los SDFA PEG-Dextrano después de la etapa de precipitación isoeléctrica se mantuvo relativamente constante (1.8 – 2.6) con respecto a la obtenida sin precipitación isoeléctrica (Ver Figura 4.1).

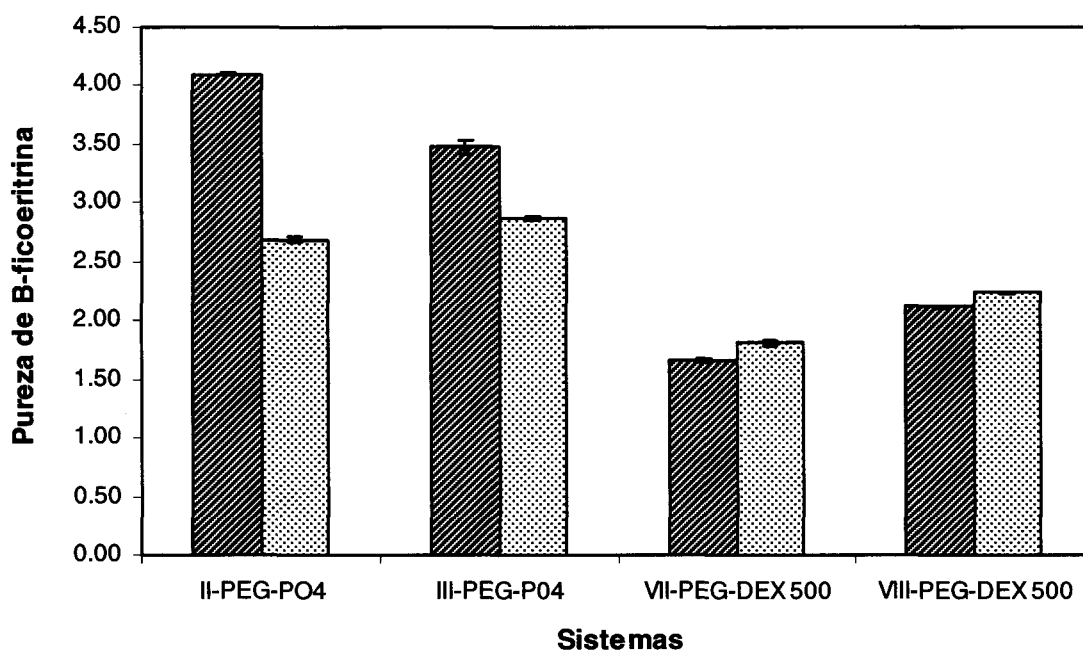




Figura 4.6 Pureza en fase superior de B-ficoeritrina obtenida en los SDFA compuestos de PEG-Fosfato y PEG-Dextrano después de la implementación de la precipitación isoeléctrica.

Para todos sistemas, fue evaluada la pureza partiendo de extractos de BFE provenientes de la precipitación isoeléctrica. La pureza del extracto de BFE proveniente de la precipitación alimentado en todos los sistemas fue de 1.8. La pureza de BFE es definida como la relación de las absorbancias a 545 y 280 nm (pureza de BFE igual a $A_{545\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$). La composición de los sistemas se define en la tabla 3.4 de la sección 3.6.  Extracto crudo al 40% (p/p) de muestra alimentada  Extracto crudo al 10% (p/p) de muestra alimentada.

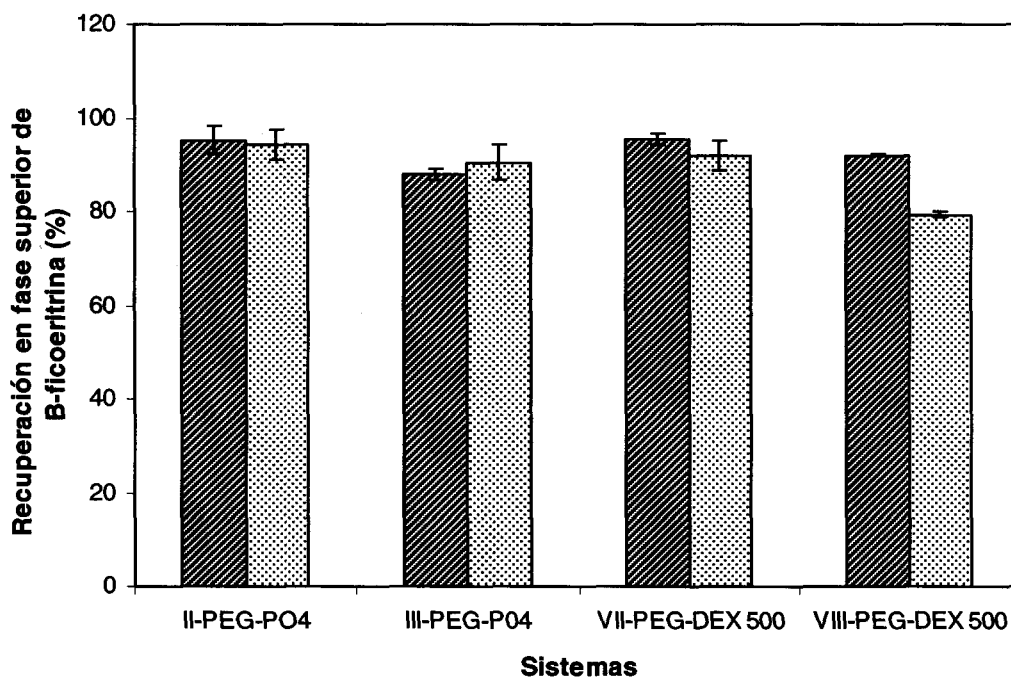


Figura 4.7 Porcentaje de recuperación en fase superior de B-ficoeritrina obtenido en los SDFA compuestos de PEG-Fosfato y PEG-Dextrano después de precipitación isoeléctrica

Para todos sistemas, fue evaluado el porcentaje de recuperación partiendo de extractos de BFE provenientes de la precipitación isoeléctrica. La pureza del extracto proveniente de la precipitación que se alimentó en todos los sistemas fue de 1.8. El porcentaje de recuperación se expresa relativo a la concentración de BFE en el extracto crudo proveniente de la sonicación. La composición de los sistemas se define en la tabla 3.4 de la sección 3.6. ▨ Extracto crudo al 40% (p/p) ▩ Extracto crudo al 10% (p/p).

En contraste, las extracciones con SDFA PEG-Fosfato permitieron un incremento en la pureza de BFE de 5.3 - 5.9 veces con respecto a la pureza del extracto crudo proveniente de ruptura celular. En particular el uso del SDFA II compuesto por 29.5% p/p de PEG1000, 9.0% p/p de fosfato, con una relación de volumen de las fase de 1.0, pH 7.0 y alimentado con precipitado de BFE al 40% p/p, permitió recuperar en esta etapa de extracción 95% de BFE altamente purificada (pureza superior a 4.0). Aparentemente, la adición de la etapa de precipitación dio como resultado la eliminación de contaminantes proteicos adicionales asociados a la membrana tilacoidal con pesos moleculares que varían entre 16 y 90kDa (Piven *y col.* 2005). Como resultado, la precipitación isoelectrica permitió aumentar la pureza del extracto crudo y mejorar el desempeño de la etapa de extracción con SDFA PEG-Fosfato.

En el caso de los SDFA PEG-Dextrano es posible suponer que se alcanzó la máxima capacidad del sistema de acumular BFE en la fase superior. Es importante considerar que el mecanismo que gobierna la partición de BFE en SDFA PEG-Dextrano no es del todo comprendido y estudios adicionales son necesarios para extender el conocimiento sobre este fenómeno. Sin embargo, considerando que se obtuvo el objetivo general de recuperar y purificar BFE, se decidió no realizar experimentos adicionales involucrando PEG-Dextrano.

4.3 Proceso simplificado para la recuperación y purificación de B-ficoeritrina utilizando precipitación isoelectrica y sistemas de dos fases acuosas.

El proceso general propuesto para la recuperación de BFE producida por *Porphyridium cruentum* con alto nivel de pureza (Figura 4.8) es un proceso simplificado, caracterizado por una operación unitaria para producir y tres para recuperar (ruptura celular, precipitación isoelectrica y extracción con SDFA) BFE con una pureza de 4.1 ± 0.2 . A pesar de que el proceso reportado por Bermejo y col. (2003) también considera tres operaciones unitarias principales para obtener BFE purificada, dos de estas operaciones involucran pasos cromatográficos que pueden generar desventajas relacionadas con aspectos económicos y la naturaleza compleja del proceso.

Como resultado de la electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) practicada a las muestras provenientes de cada una de las etapas de extracción y purificación descritas en la Figura 4.8, se obtuvo un gel de poliacrilamida que permitió monitorear la eliminación de contaminantes durante el proceso de extracción y purificación al cual fue sometido el extracto crudo de BFE (Figura 4.9).

Mediante el gel y el patrón de las bandas obtenido (Figura 4.9) se pudo comprobar que la pureza de BFE aumenta en cada etapa del proceso, mientras que su concentración disminuye. Las bandas en 17 y 30 kDa posiblemente correspondientes a las sub-unidades de la BFE permiten identificar a esta proteína durante el proceso además de permitir identificar la desaparición de bandas adicionales correspondientes a posibles contaminantes de la muestra.

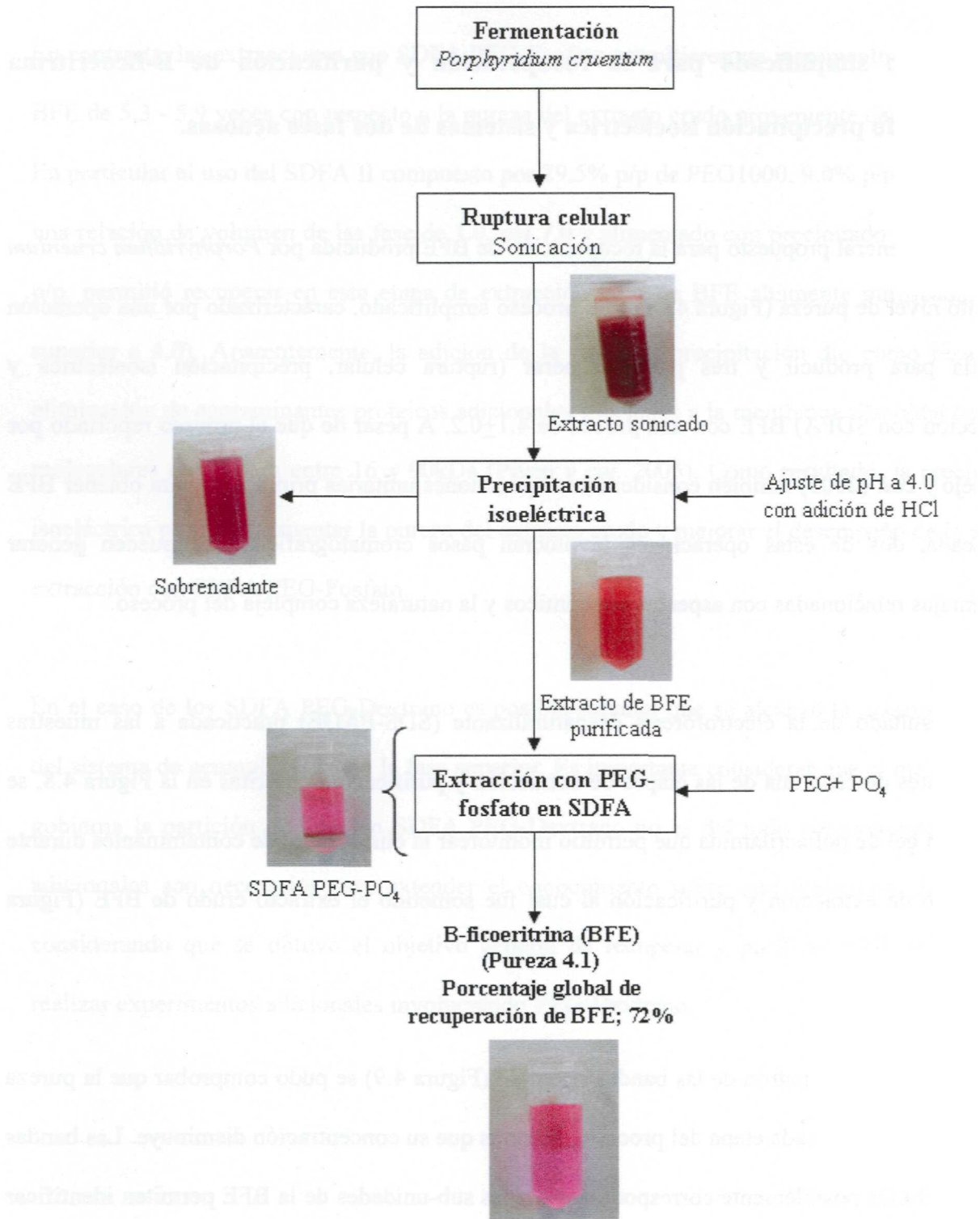


Figura 4.8 Proceso simplificado de recuperación y purificación de B-ficoeritrina

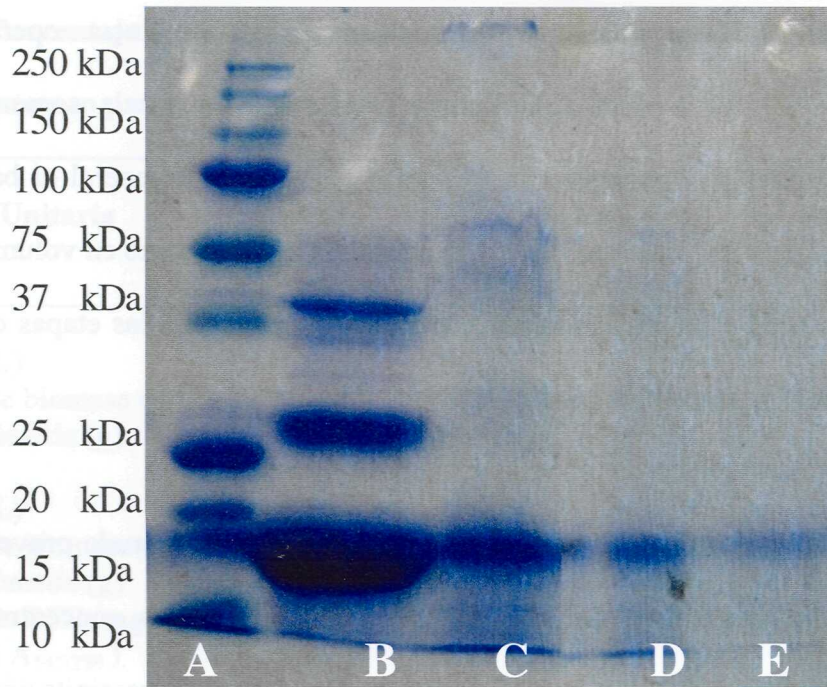


Figura 4.9 Gel de poliacrilamida en donde se muestran los contaminantes removidos a través del proceso de extracción y recuperación.

Cada una de las muestras, con excepción del estándar de pesos moleculares y el estándar de BFE, fue preparada tal como se describe en la sección 3.7. La secuencia de las muestras obedece el orden del proceso de extracción y purificación descrito en la sección 4.3 e ilustrado en la Figura 4.8. La columna A corresponde al estándar de pesos moleculares, la B al estándar de BFE, la C al extracto proveniente de sonicación, la D al extracto resultante de la precipitación isoelectrica y la columna E corresponde a la BFE purificada en SDFA PEG-PO₄.

En contraste, el proceso propuesto que utiliza SDFA involucra operaciones unitarias (precipitación y SDFA) simples y fáciles de implementar a escala comercial. Información detallada del porcentaje de recuperación y pureza de BFE y en general el balance de materia después de cada etapa del proceso (Tabla 4.2) considera el incremento en volumen causado por la adición de HCl 0.1M y los componentes que forman las fases en las etapas de precipitación y extracción con SDFA, respectivamente.

Para este análisis simplificado, se consideraron 0.10 L de extracto crudo proveniente de la etapa de ruptura celular como base de cálculo. Este extracto con una concentración de BFE de 250mg/L y una pureza de 0.70 (Tabla 4.2) se alimentó a la etapa de precipitación.

La corriente de proceso generada por la etapa de precipitación presentó una concentración de BFE de 140mg/L con una pureza de 1.8. Esto último representa un incremento de 2.6 veces en la pureza de BFE en esta etapa de proceso. La cantidad total de BFE de la etapa de precipitación (17.0mg), representa un porcentaje de recuperación de 77% con respecto a la cantidad de BFE contenida en el extracto crudo inicial (22.0mg). La etapa de extracción con SDFA permitió obtener 16.0 mg de BFE purificada (pureza de 4.1) con un porcentaje de recuperación por etapa del 95%.

Por lo tanto, se puede concluir que por cada gramo de biomasa húmeda proveniente de la fermentación de *Phorphyridium cruentum* que se recuperó mediante el proceso propuesto, 0.64mg de B-ficoeritrina con una pureza de 4.1 ± 0.2 fue obtenida.

Tabla 4.2 Porcentaje de recuperación y pureza proteica de cada operación unitaria del proceso propuesto para la recuperación de B-ficoeritrina.

Operación Unitaria	Entrada	Salida	Recuperación de BFE por etapa (%)	Recuperación de BFE del proceso (%)	Factor de purificación
<i>Fermentación</i>					
Volumen total (L)	-	1.00			
Concentración de biomasa (g/L)	-	25.0			
Biomasa total húmeda (g)	-	25.0			
<i>Ruptura Celular</i>					
Volumen total (L)	0.10	0.10			
Concentración de biomasa (g/L)	250	250			
Biomasa total húmeda (g)	25.0	25.0			
Concentración de BFE (mg/L)	-	220			
Pureza de BFE (A _{545/280})	-	0.70			
BFE total(mg)	-	22.0	100	100	
<i>Precipitación</i>					
Adición de HCl .1N (mL)	0.01	-			
Volumen total (L)	0.10	0.11			
Concentración de biomasa (g/L)	250	230			
Biomasa total húmeda (g)	25.0	25.0			
Concentración de BFE (mg/L)	220.0	140.0			
Pureza de BFE (A _{545/280})	0.70	1.80			2.6
BFE total (mg)	22.0	17.0	77.0	77.0	
<i>ATPS Extracción</i>					
Adición de PEG + PO ₄ (L)	0.16	-			
Volumen total (L)	0.11	0.27			
Concentración de biomasa (g/L)	230	93.0			
Biomasa total húmeda (g)	25.0	25.0			
Concentración de BFE (mg/L)	140.0	50.0			
Pureza de BFE (A _{545/280})	1.80	4.1			2.2
BFE total (mg)	17.0	16.0	95.00	72.0	
<i>BFE pureza 4.0 / Biomasa (mg/g)</i>		0.64			

La concentración de biomasa y biomasa total se expresa en masa húmeda. La pureza, concentración y porcentaje de recuperación de BFE para cada etapa de proceso se determinó como se describe en la sección de Materiales y métodos. El factor de purificación es la relación entre la pureza obtenida de BFE después y antes de cada operación unitaria.

Este trabajo de investigación presenta un proceso de recuperación y purificación que permite incrementar la pureza de BFE en 5.7 veces con respecto a la pureza del extracto crudo inicial, recuperando el 72% de la BFE con una pureza de 4.1 ± 0.2 (Tabla 4.2) y un valor comercial tan alto como de \$50 dólares/mg. El proceso propuesto en la presente investigación simplifica enormemente la manera mediante la cual BFE producida por *Porphyridium cruentum* puede ser recuperada e invita a considerar la validación e implementación del proceso.

Conclusiones

Se logró el desarrollo de un proceso prototipo basado en el uso de precipitación isoelectrica y sistemas de dos fases acuosas después de ruptura celular para la recuperación de BFE purificada (pureza superior a 4.0 definida como la relación de las absorbancias a 545 y 280nm) con un reducido número de operaciones unitarias.

Se estableció que los SDFA PEG-Sulfato y PEG-Dextrano fueron inadecuados para el desarrollo de un proceso que permitiera la recuperación de BFE purificada debido a los bajos valores de pureza y porcentajes de recuperación obtenidos.

En contraste, el uso de SDFA PEG-Fosfato (29.5% p/p y 9.0% p/p, respectivamente), después de una etapa adicional de precipitación isoelectrica, resultó en la recuperación de BFE con una pureza de 4.1. Esta etapa de precipitación incrementó la pureza del extracto crudo inicial y favoreció la extracción con SDFA. Las condiciones de operación establecidas para el proceso permitieron concentrar BFE y los contaminantes en fases opuestas con un porcentaje de recuperación total del 70%.

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

La manera en la cual el nuevo proceso propuesto simplifica enormemente la recuperación y purificación del colorante proteico, invita a considerar la necesaria validación del proceso a mayor escala como primer paso para el desarrollo de un proceso de purificación a nivel comercial.

Referencias

- Albertsson, P. A., Cajarville, A., Brooks, D.E. y Tjerneld, F. (1987). Partition of proteins in aqueous two-phase systems and the effect of molecular mass of the polymer. *Biochimica et Biophysica Acta*. **926**: 87-93.
- Albertsson, P. A., Johansson, G. y Tjerneld, F. (1990). Aqueous two phase separations. Asenjo J. Ed. Separation in Biotechnology. Marcel Dekker, New York. USA.
- Arad, S. y Yaron, A. (1992). Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends Food Science and Technology*. **3**: 92-97.
- Ayyagari, M., Pande, R., Kamtekar, S., Gao, H., Marx, K., Kumar, J., Tripathy, S., Akkara, J. y Kaplan, D. (1995). Molecular assembly of proteins and conjugated polymers: Towards development of biosensors. *Biotechnology and Bioengineering*. **45**: 116-121.
- Bamberger, S., Seaman, G.V.F., Brown, J.A. y Brooks, D.E. (1984). The partition of sodium phosphate and sodium chloride in aqueous dextran-polyethyleneglycol two-phase systems. *Journal of Colloid and Interface Science*. **99**:187-193.
- Beckman Instruments USA (2006). 4300N. Harbor Boulevard. Fullerton, CA 92834-3100.
- Benavides, J. y Rito-Palomares, M. (2004). Bioprocess intensification: a potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *Journal of Chromatography B*. **807**: 33-38.
- Benavides, J. y Rito-Palomares M. (2005). Potential aqueous two-phase processes for the primary recovery of colored proteins from microbial origin. *Engineering in Life Science*. **5**: 259-266.
- Bennet, A. y Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green algae. *Journal of Cell Biology*. **58**: 419-435.
- Bermejo, R., Alvarez-Pez, J.M., Acien-Fernandez, F.G. y Molina-Grima, E. (2002). Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology*. **93**:73-85.
- Bermejo, R., Acien, F.G., Ibáñez, M.J., Fernández, J.M., Molina, E. y Alvarez-Pez, J.M. (2003). Preparative purification of b-phycoerythrin from microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B*. **790**: 317-325.
- Berns, D.S. y MacColl, R. (1989). Phycocyanin in Physical-Chemical Studies. *Chem Rev*. **89**: 807-825.
- BioRad USA (2006). 1000 Alfred Nobel Drive. Hercules, CA 94547.
-

-
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**:248-254.
- Bramaud, C. Aimar, P. y Daufin, D. (2000). Whey protein fractionation: Isoelectric precipitation of α -lactalbumin under gentle heat treatment. *Biotechnology and Bioengineering*. **56**: 4. 391-397.
- Brass, G.M.F., Simon, G.W. y Lyddiatt, A. (2000). Recovery in aqueous two-phase systems of nanoparticulates applied as surrogate mimics for viral gene therapy vectors. *Journal of Chromatography B*. **743**: 409-419.
- Bryant, D.A. (1982). Phycoerythrocyanin and phycoerythrin: Properties and occurrence in cyanobacteria. *J. Gen. Micro.* **128**: 835-844.
- Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. (2006). Página de Internet: www.cinvestav.mx
- Fábregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. y Abalde, J. (1984). Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch culture with different salinities. *Aquaculture*. **42**: 207-215.
- Gantt, E. (1980). Structure and fuction of phycobilisomes: light harvesting pigment complexes in red and blue-green algae. *Int. Rev. Cytol.* **66**: 45-80.
- Glatz, C.E. (1990). Precipitation. In Downstream Processing Biotechnology. Asenjo J. Ed. Marcel Dekker. New York. USA.
- Glazer, A.N. (1985). Light harvesting phycobilisomes. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **14**: 17-77.
- Glazer, A.N. (1989). Light guides; Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *Biol. Chem.* **264**: 1-4.
- Glazer, A.N., Apell, G.S., Hixson, C.S., Bryant, D.A., Rimon, S. y Brown, D.M. (1976). Biliproteins of Cyanobacteria and Rhodophyta: Homologous family of photosynthetic accessory pigments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 428-431.
- Hames, B.D. y Rickwood, D. (1982). Gel electrophoresis of proteins; a practical approach. IRL Press. Oxford, England. 290p.
- Hames, B.D. (1998). Gel Electrophoresis of proteins; A practical approach, 3rd Ed. Oxford Univeristy Press, Oxford, New York.
- Harris, E.L.V. y Angal, S. (1994). Protein purification methods: a practical approach. IRL Press. Oxford, England. 316p.
-

-
- Haugland, R.P. (1996). Handbook of Fluorescent and Research Chemicals. 6th ed. Molecular Probes, Eugene.
- He, C., Li, S., Liu, H., Li, K. y Liu, F. (2005). Extraction of testosterone and epitestosterone in human urine using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt. *Journal of Chromatography A*. **1082**: 143-149.
- Hernandez-Mireles, T. y Rito-Palomares, M.A. (2006a). New aqueous two phase systems in poly (ethylene oxide sulfide) and potassium phosphate for the potential recovery of proteins. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **In press**.
- Hernandez-Mireles, T. y Rito-Palomares, M.A. (2006b). Improved recovery of B-phycoerythrin produced by the red microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **In press**.
- Huddleston, J.A., Veide, K., Kohler, J., Flanagan, S-O. Enfors y A. Lyddiat. (1991a). The molecular basis of partitioning in aqueous two phase systems. *TIBTECH*. **9**: 381-388.
- Hustedt, H., K.H. Kroner, y M.R. Kula. (1985). Applications of phase partition in biotechnology; Partition in Aqueous two phase systems. Theory, Methods, Uses and Application in Biotechnology. In Walter, H., Brooks, D.E. and Fisher, D. Ed. Academic Press. FL.USA.
- Koller, K.P., Wehrmeyer, W. y Schneider, H. (1977). Isolation and characterization of disc-shaped phycobilisomes from the red alga *Rhodella violacea*. *Archives of Microbiology*. **112**: 61-67.
- Klomklao, S., Benjakul, S, Visessanguan, W., Simpson, B. K., Kishimura, H. (2005). Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems. *Process Biochem*. **40**: 3061-3067.
- Kula, M.R., Kroner, K.H. y Hustedt, H. (1982). Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. *Advances in Biochemical Engineering*. Vol. 24, A. Fiechter and Springer Ed. Berlin. Alemania.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural proteins during the Assembly of the Head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680- 685.
- Layne, E. (1957) Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. *Methods in Enzymology* **3**: 447-455.
- Liu, L.N., Chen, X.L., Zhang, X.Y. y Zhou, B.C. (2005). One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. *Journal of Biotechnology*. **116**: 91-100.
- MacColl, R. y Guard-Farir, D. (1987). Phycobiliproteins. CRC Press. Boca Raton , Florida.
-

-
- Martek Corporation. (2005). Página de internet: <http://www.marketbio.com>.
- Nivens, G.W., Smith, S.J., Scurlock, P.G. y Andrews, A.T. (1990). Separation for biotechnology. Elsevier Applied Science, London.
- OHAUS USA (2006). 19A Chapin Road. Pine Brook, NJ. 07058.
- Piven I., Ajlani G., y Sokilenko A. (2005). Phycobilisome Linker Proteins are phosphorylated in *Synechocystis sp. PCC 6803*. *Journal of Biological Chemistry*. **22**: 21667-21672.
- Prozyme Inc. (2003). 1933 Davis Street , Suite 207. San Leandro, CA. 94577. USA.
- Qiu, J., Madoz-Gurpide, J., Misek, D.E., Kuick, R., Brenner, D.E, Michailids, G., Haab, B.B., Omenn, G.S., y Hanash, S. (2004). Development of natural protein microarrays for diagnosing cancer based on an antibody response to tumor antigens. *Journal of Proteome Research*. **3**: 261-267.
- Ranjitha, K. y Kaushik, B.D. (2005). Purification of phycobiliproteins from *Nostoc muscorum*. *Journal of Scientific and Industrial Research*. **64**: 372-375.
- Rito-Palomares, M., Dale, C. y Lyddiatt, A. (2000a). Generic application of an aqueous two-phase process for protein recovery from animal blood. *Process Biochemistry*. **35**: 665-673.
- Rito-Palomares, M., Negrete, A. Galindo, E. y Serrano-Carreón, L. (2000b). Aroma compounds recovery from micelial cultures in aqueous two-phase processes. *Journal of Chromatography B*. **743**: 403-408.
- Rito Palomares, M. Negreta, A., Miranda, L., Flores, C., Galindo, E. y Serrano-Carreón, L. (2001). The potential application of aqueous two-phase systems for in situ recovery of 6-pentyl-infinity-pyrone produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microbial Technology*. **28**: 625-631.
- Rito-Palomares, M. y Lyddiatt, A. (2000). Practical implementation of aqueous two-phase processes for protein recovery from yeast. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **75**: 632-638.
- Rito-Palomares, M., Nuñez, L. y Amador, D. (2001). Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycoyanin recovery from *Spirulina maxima*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **76**: 1272-1280.
- Rito-Palomares, M. (2004). Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. *Journal of Chromatography B*. **807**: 3-11.
-

-
- Ritter, S., Hiller, R. G., Wrench, P. M., Welte, W. y Diederichs, K. (1999). Crystal Structure of a Phycourobilin-Containing Phycoerythrin at 1.90-Å Resolution. *Journal of Structural Biology*. **126**: 86-97.
- Sigma Chemicals. (2006). 3050 Spruce Saint. St. Louis, MO 63103.
- Stryer, L. (1992). Bioquímica. 3rd Edición. Guanabara Koogan. Río de Janeiro. Brasil.
- Telford, William G., Moss, Mark W., Morseman, John P. y Allnut, Tomas F.C. (2001). Cryptomonad algal phycobiliproteins as fluorochromes for extracellular and intracellular antigen detection by flow cytometry. *Citometry*. **44**: 16-23.
- Trindade, I.P., Diogo, M.M., Prazeres, D.M.F. y Marcos, J.C. (2005). Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. *J. of Chromatogr. A*. **1082**: 176-184.
- Xu, Yangqing y Bao, Gang. (2003). A filtration-based protein microarray technique. *Analytical Chemistry*. **75**: 5345-5351.
- Zaman, F., Kusnadi, A.R. y Glatz, C.E. (1999). Strategies for recombinant protein recovery from canola by precipitation. *Biotechnology Progress*. **15**: 488-492.
- Zaslusky, Boris Y.(1995). Aqueous Two-phase Partitioning; physical chemistry and bioanalytical applications. Marcel Dekker Inc. New York.
- ZEN-U Biotechnology Co. Ltd. (2002). Chung Hsiao East Road 106 Taipei Taiwan.
- Zhang, Ch. Lillie, R. Cotter, J. y Vaugham, D. (2005). Lysozyme purification from tobacco extract by polyelectrolyte precipitation. *Journal of Chromatography A*. **1069**:107-112.
- Zhang, C., Medina-Bolivar, F., Buswell, S. y Cramer, C.L. (2005). Purification and stabilization of ricin B from tobacco hairy root culture medium by aqueous two-phase extraction. *Journal of Biotechnology* **117**: 39-48
- Zhu, B.H, Wang, G.C y Tseng, C.K. (2005). Interaction between phycobilisomes from *Porphyridium cruentum* and thylakoid membranes from *Gymnodinium sp.* or spinach. *Russian Journal of Plant physiology*. **52**: 288-293.
- Zijlstra, G.M., De Gooijer, C.D., Van Der Pol, L.A. y Tramper, J. (1996). Design of aqueous two-phase systems supporting animal cell growth: a first step towards extractive bioconversion. *Enzyme Microbial Technology*. **19**: 2-8.
-

Índice de Anexo

Tabla A1	Pureza y recuperación en fase superior de B-ficoeritrina en SDFa PEG-Dextrano alimentando extracto crudo al 10% (p/p).	73
Tabla A2	Pureza y recuperación en fase superior de B-ficoeritrina en SDFa PEG-Dextrano alimentando extracto crudo al 40% (p/p).	74
Tabla A3	Pureza y recuperación de la fase superior de B-ficoeritrina en sistemas de dos fases acuosas alimentados con 40% (p/p) de extracto crudo de <i>Porphyridium cruentum</i> obtenido por precipitación isoelectrica.	75
Tabla A4	Pureza y recuperación de la fase superior de B-ficoeritrina en sistemas de dos fases acuosas alimentados con 10% (p/p) de extracto crudo de <i>Porphyridium cruentum</i> obtenido por precipitación isoelectrica.	76
Figura A1	Curva de calibración para la cuantificación de proteína total utilizando BSA en concentraciones conocidas.	77
Figura A2	Movilidad relativa calculada a partir de la migración de las proteínas en los geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).	78

Tabla A1 Pureza y recuperación en fase superior de B-ficoeritrina en SDFA PEG-Dextrano alimentando extracto crudo al 10% (p/p).

Sistema	PEG (% p/p)	Dextrano (% p/p)	Pureza de B-ficoeritrina	Recuperación en fase superior de B-ficoeritrina (%)	Factor de purificación
PEG1450-dextrano 40	12	12	2.3 ± 0.04	58 ± 0.4	3.9
PEG1450-dextrano 70	10	13	2.4 ± 0.03	63 ± 0.6	4.0
PEG1450-dextrano 500	10	13	2.0 ± 0.04	70 ± 0.6	3.3
PEG1450-dextrano 500	12	12	2.7 ± 0.02	81 ± 0.1	4.4
PEG1450-dextrano 500	14	11	1.9 ± 0.04	86 ± 0.1	3.2

Para todos los sistemas, el uso de 40, 70 y 500 representa el peso molecular nominal del dextrano; 40,000, 70,000, 500,000 g/gmol. La concentración del extracto crudo de BPE alimentado en los SDFA se mantuvo constante a 7.0 y 10% (p/p), respectivamente. La recuperación de BFE en fase superior se expresa de manera relativa a la concentración de BFE original del extracto crudo alimentado a los SDFA La pureza de BFE es definida como la relación de las absorbancias a 545 y 280 nm (pureza de BFE igual a A_{545nm} / A_{280nm}) y el factor de purificación es la pureza de BFE de los SDFA dividida por la pureza del extracto crudo proveniente de ruptura celular.

Tabla A2 Pureza y recuperación en fase superior de B-ficoeritrina en SDFA PEG-Dextrano alimentando extracto crudo al 40% (p/p).

Sistema	PEG (% w/w)	Dextrano (% w/w)	Pureza de B-ficoeritrina	Recuperación en fase superior de B-ficoeritrina (%)	Factor de purificación
PEG1450-dextrano 40	12	12	1.0 ± 0.04	31 ± 3.4	1.6
PEG1450-dextrano 70	10	13	1.2 ± 0.04	27 ± 0.2	2.1
PEG1450-dextrano 500	10	13	1.6 ± 0.04	25 ± 0.2	2.7
PEG1450-dextrano 500	12	12	2.2 ± 0.02	70 ± 0.8	3.7
PEG1450-dextrano 500	14	11	2.0 ± 0.02	74 ± 0.5	3.3

Para todos los sistemas, el uso de 40, 70 y 500 representa el peso molecular nominal del dextrano; 40,000, 70,000, 500,000 g/gmol. La concentración del extracto crudo de BPE alimentado en los SDFA se mantuvo constante a 7.0 y 40% (p/p), respectivamente. La recuperación de BFE en fase superior se expresa de manera relativa a la concentración de BFE original del extracto crudo alimentado a los SDFA. La pureza de BFE (definida como la relación de las absorbancias a 545 y 280 nm (pureza de BFE igual a A_{545nm} / A_{280nm})) y el factor de purificación es la pureza de BFE de los SDFA dividida por la pureza del extracto crudo proveniente de ruptura celular.

Tabla A3 Pureza y recuperación de la fase superior de B-ficoeritrina en sistemas de dos fases acuosas alimentados con 40% (p/p) de extracto crudo de *Porphyridium cruentum* obtenido por precipitación isoelectrica

Sistema	PEG (% w/w)	Sal o dextrano (% w/w)	Pureza de B-ficoeritrina	Recuperación en fase superior de B-ficoeritrina (%)	Factor de purificación
PEG1000-fosfato	29.5	9.0	4.10± 0.01	95 ± 2.9	3.8
	18.0	15.0	3.48± 0.06	88 ± 1.2	2.7
PEG1450-dextrano500	12.0	12.0	1.7 ± 0.02	95 ± 2.0	1.3
	14.0	11.0	2.1 ± 0.01	92 ± 2.0	1.6

Para todos los sistemas, el pH y la concentración del extracto crudo de BPE en los SDFA se mantuvo constante a 7.0 y 40% (p/p), respectivamente. La relación de volumen de las fases (V_r) de todos los SDFA fue mantenido constante a un valor cercano a 0.30. La recuperación de BFE en fase superior se expresa de manera relativa a la concentración de BFE original del extracto crudo alimentado a los SDFA La pureza de BFE es definida como la relación de las absorbancias a 545 y 280 nm (pureza de BFE igual a A_{545nm} / A_{280nm}) y el factor de purificación es la pureza de BFE de los SDFA dividida por la pureza del extracto crudo proveniente de ruptura celular (pureza igual a 0.7).

Tabla A4 Pureza y recuperación de la fase superior de B-ficoeritrina en sistemas de dos fases acuosas alimentados con 10% (p/p) de extracto crudo de *Porphyridium cruentum* obtenido por precipitación isoeléctrica

Sistema	PEG (% w/w)	Sal o dextrano (% w/w)	Pureza de B-ficoeritrina	Recuperación en fase superior de B-ficoeritrina (%)	Factor de purificación
PEG1000-fosfato	29.5	9.0	2.7 ± 0.03	94 ± 3.0	2.1
	18.0	15.0	2.9 ± 0.01	90 ± 3.6	2.3
PEG1450-dextrano500	12.0	12.0	1.8 ± 0.1	92 ± 3.2	1.4
	14.0	11.0	1.0 ± 0.2	80 ± 1.0	0.78

Para todos los sistemas, el pH y la concentración del extracto crudo de BPE en los SDFA se mantuvo constante a 7.0 y 10% (p/p), respectivamente. La relación de volumen de las fases (Vr) de todos los SDFA fue mantenido constante a un valor cercano a 1.0. La recuperación de BFE en fase superior se expresa de manera relativa a la concentración de BFE original del extracto crudo alimentado a los SDFA La pureza de BFE es definida como la relación de las absorbancias a 545 y 280 nm (pureza de BFE igual a A_{545nm} / A_{280nm}) y el factor de purificación es la pureza de BFE de los SDFA dividida por la pureza del extracto crudo proveniente de ruptura celular (pureza igual a 0.7).

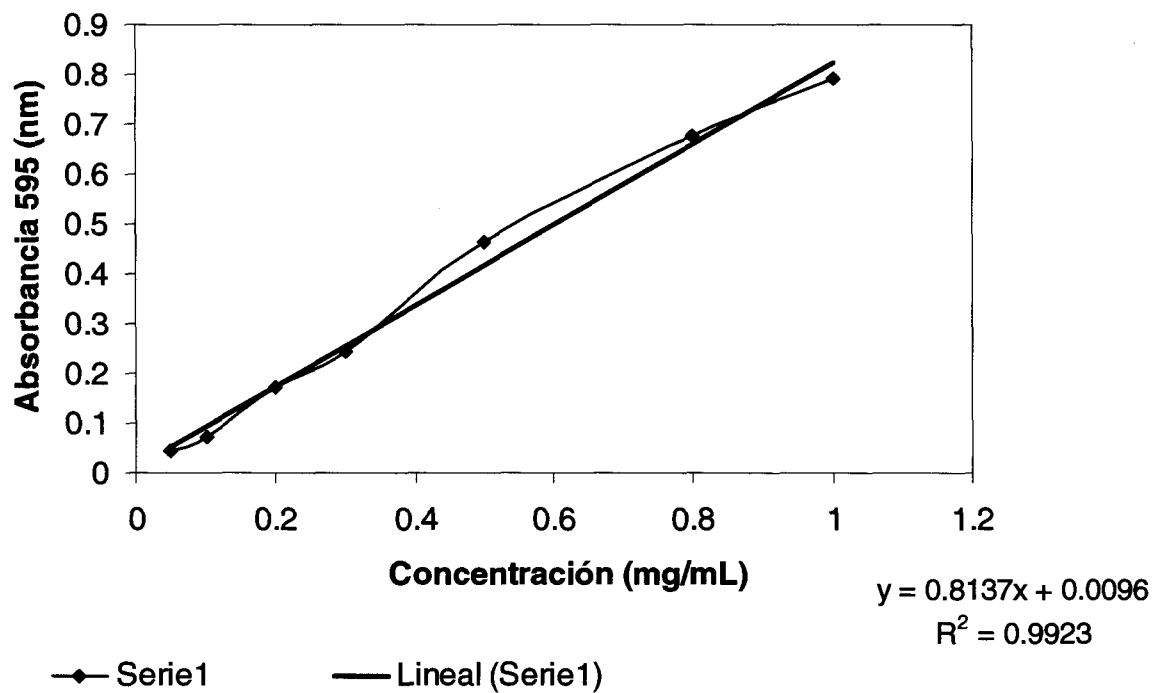


Figura A1 Curva de calibración para la cuantificación de proteína total utilizando BSA en concentraciones conocidas.

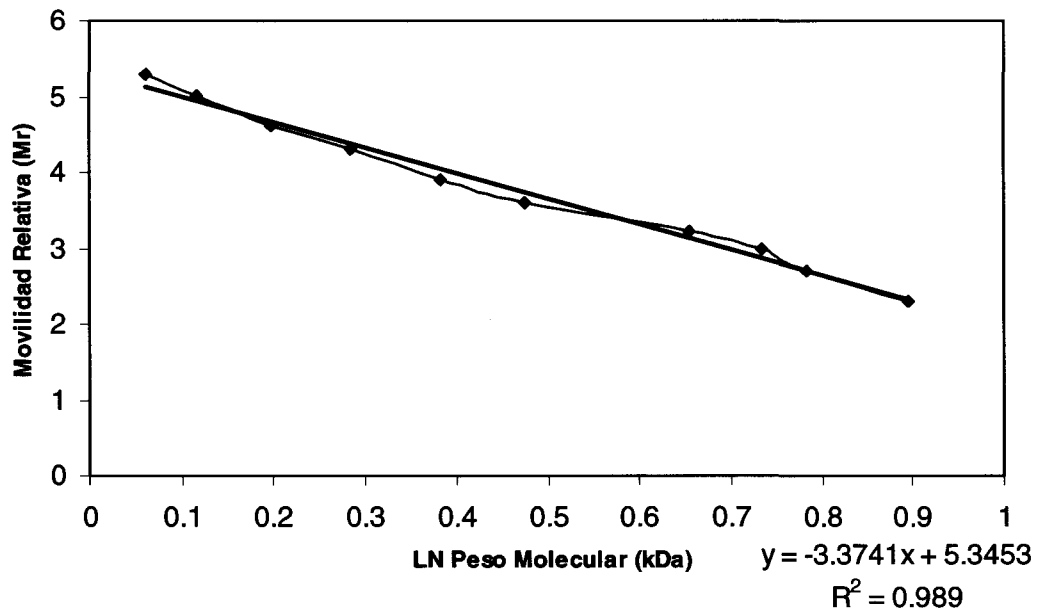


Figura A2 Movilidad relativa calculada a partir de la migración de las proteínas en los geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Improved recovery of B-phycoerythrin produced by the red microalga *Porphyridium cruentum*

Tanhia Hernandez-Mireles and Marco Rito-Palomares*

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

Abstract: A simplified process for the primary recovery and purification of B-phycoerythrin (BPE) from *Porphyridium cruentum* exploiting aqueous two-phase systems (ATPS) and isoelectric precipitation was developed in order to reduce the number of unit operations and benefit from increased purity and yield of the protein product. Evaluation of the partitioning behaviour of BPE in polyethylene glycol (PEG)/sulphate, PEG/dextran and PEG/phosphate ATPS was carried out to determine under what conditions the BPE and contaminants concentrated into opposite phases. An additional stage of isoelectric precipitation at pH 4.0 after cell disruption resulted in an increase in purity of the target protein from the BPE crude extract and enhanced the performance of the subsequent ATPS. PEG1000/phosphate ATPS proved to be suitable after isoelectric precipitation for the recovery of highly purified (defined as absorbance ratio $A_{545\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 4.0$) BPE with a potential commercial value as high as US\$50/mg. An ATPS extraction stage comprising 29.5% (w/w) PEG1000, 9.0% (w/w) phosphate, a volume ratio (V_r) equal to 1.0, a system pH of 7.0 and loaded with 40% (w/w) of the BPE extract generated by precipitation allowed BPE recovery with a purity of 4.1 ± 0.2 and an overall product yield of 72% (w/w). The purity of BPE from the crude extract increased 5.9-fold after isoelectric precipitation and ATPS. The results reported herein demonstrate the benefits of the practical application of isoelectric precipitation together with ATPS for the recovery and purification of BPE produced by *P. cruentum* as a first step in the development of a commercial purification process.

© 2006 Society of Chemical Industry

Keywords: aqueous two-phase systems; B-phycoerythrin; *Porphyridium cruentum*; protein recovery

INTRODUCTION

Biotechnological companies are focusing on the production of high-value products that will have an impact in different industrial sectors, e.g. pharmaceutical, health, chemical, food, etc. Currently, the development of a knowledge base that will economically and rapidly deliver new biological products to market in the shortest possible time is a key goal in biochemical engineering. The discouragement of the development of inefficient laboratory processes that are difficult or costly to scale up and that cannot be easily improved at later stages represents another important goal of biochemical engineering. In this context the development of simplified and easily scaled-up processes to produce colouring compounds for use in the food, cosmetic, detergent, molecular genetics and biosensor industries has great commercial significance.^{1,2} In particular, the production of the red-coloured protein B-phycoerythrin (BPE) by *Porphyridium cruentum* represents a very interesting case, because the industrial and commercial value of this product is considerable. The wide range of potential commercial applications,

e.g. natural dyes in foods and cosmetics and the development of biosensors,^{3,4} makes BPE the most valuable of the three main classes of phycoerythrins (B, R and C) from the photosynthetic system of *P. cruentum*. It is formed by three subunits α , β and γ (in a relative molar ratio of 6:6:1) of molecular weights 18.0, 18.0 and 29.0 kDa respectively.⁵ The commercial value of highly purified (defined as absorbance ratio $A_{545\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 4.0$) BPE has been reported to be as high as US\$50/mg.^{6,7} This makes it attractive to attempt to develop an efficient process for BPE recovery and purification.

The purification of coloured proteins such as BPE is a complex task and the multi-step nature of conventional methods can result in low process yield and high process cost.⁸ Consequently, limited practical implementation of existing protocols at the commercial level is anticipated. Previous attempts at the purification of BPE have been documented. For example, the protocols reported by Bermejo *et al.*^{9,10} involve ion exchange high-pressure liquid chromatography (HPLC) or expanded bed absorption chromatography, resulting in an effective way to purify BPE on the

* Correspondence to: Marco Rito-Palomares, Centro de Biotecnología, Departamento de Biotecnología e Ingeniería de Alimentos, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Ave. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Monterrey, NL 64849, Mexico

E-mail: mrito@itesm.mx

Contract/grant sponsor: CONACyT; contract/grant number: 39645

Contract/grant sponsor: ITESM Research Chair; contract/grant number: CAT005

(Received 31 October 2005; revised version received 29 November 2005; accepted 2 December 2005)

DOI: 10.1002/jctb.1503

laboratory scale. However, some economic constraints may arise on the industrial scale, because HPLC incurs high operational costs. Therefore alternative approaches to recover and purify BPE in practice need to be pursued. Aqueous two-phase systems (ATPS) have been suggested as an attractive alternative to overcome some of the disadvantages attributed to the established BPE purification protocols. ATPS is a technique that has proved to have great potential for the recovery and purification of biological compounds.^{11–14} The recovery and partial purification of BPE produced by *P. cruentum* using ATPS have been reported previously.¹⁵ However, the proposed process for the primary recovery of BPE involving the use of polyethylene glycol (PEG)/phosphate ATPS after ammonium sulphate precipitation, centrifugation and cell disruption did not yield highly purified (purity >4.0) BPE but resulted in only partially purified (purity 2.9) BPE.¹⁵ Consequently, the need for alternative bioengineering strategies to increase protein purity was evident.

In the present study the potential use of PEG/sulphate, PEG/dextran and PEG/phosphate ATPS was examined to develop extraction steps and benefit the resulting process by increased purity of BPE. Furthermore, the addition of an isoelectric precipitation stage after cell disruption was evaluated to increase the purity of the target protein from the BPE crude extract and enhance the performance of the subsequent ATPS extraction. Isoelectric precipitation and PEG/phosphate ATPS were exploited to establish a greatly simplified downstream process to obtain highly purified (purity >4.0) BPE from cell homogenate of *P. cruentum*. The way in which the newly proposed process greatly simplifies the primary recovery and purification of the protein product invites the necessary process validation on a large scale on route to the development of a commercial purification process.

EXPERIMENTAL

Porphyridium cruentum culture and cell disruption

Porphyridium cruentum was cultivated in the culture medium described previously by Bermejo *et al.*⁹ The alga was grown in batch culture (1 dm³ Erlenmeyer flasks) at 22–25 °C under natural light conditions; agitation and aeration were provided with an airflow rate of 3.2 cm³ s⁻¹ using a peristaltic pump (Elite 799, Rolf C Hagen Corp., Mansfield, MA, USA). The cells were allowed to grow for 30 days and were then harvested by centrifugation (Eppendorf 5415C, Westbury, NY, USA) at 1000 × *g* for 5 min. After harvesting, cell disruption was carried out in a 50 cm³ glass test tube using a sonicator (Branson 1510, Branson Ultrasonic Corp., Danbury, CT, USA). The wet biomass and deionised water (4 cm³ g⁻¹ wet biomass) were added to the glass tube. The sonication time was 10 min g⁻¹ wet biomass. During

sonication the contents were mixed periodically to prevent biomass aggregation at the bottom of the tube. Cell fragmentation was verified using an optical microscope (Olympus CK2, Olympus, Melville, NY, USA). The homogenate obtained as a result of cell disruption of the *P. cruentum* biomass was referred to as BPE crude extract and included the cell debris generated.

Aqueous two-phase experiments

For convenience, ATPS were prepared on a fixed mass basis. Predetermined quantities of stock solutions of PEG (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) of nominal molecular weights 1000 and 1450 g mol⁻¹ plus dextran (nominal molecular weights 40 000, 70 000 and 500 000 g mol⁻¹; Sigma Chemicals), sodium sulphate or potassium phosphate were mixed with BPE crude extract (containing 20% (w/v) wet homogenate from *P. cruentum* fermentation) to give a final weight of 1.5 g. The stock solutions (PEG with dextran, sodium sulphate or potassium phosphate and BPE crude extract) were mixed and the phases were dispersed by gentle mixing for 10 min. Adjustment of the pH was made by addition of 1 mol dm⁻³ orthophosphoric acid or 2 mol dm⁻³ sodium hydroxide when needed. Complete phase separation was achieved by low-speed batch centrifugation at 1500 × *g* for 10 min. Visual estimates of the volumes of the top and bottom phases were made in graduated tubes. The volumes of the phases were then used to estimate the experimental volume ratio (V_r , defined as the ratio between the volume of the top phase and the volume of the bottom phase). Samples were carefully extracted from the phases for biochemical analysis. The top phase recovery was estimated as the amount of BPE present in the phase (volume of the phase × BPE concentration in the phase) and expressed relative to the original amount loaded into the system. Bottom phase BPE recovery was not estimated because the amount of BPE present in this phase was undetectable. Interface BPE recovery was not experimentally determined owing to the presence of cell debris in this phase. Additional ATPS using a BPE extract obtained from isoelectric precipitation were also performed. In this case, isoelectric precipitation from the BPE crude extract (homogenate from *P. cruentum* fermentation) was done following the protocol described previously by Zaman *et al.*¹⁶ Briefly, 1.0 cm³ aliquots of the BPE crude extract were placed in 1.5 cm³ Eppendorf tubes and acidified with 0.1 mol dm⁻³ hydrochloric acid (HCl) to attain pH values from 1.5 to 6.5. Each tube was immediately shaken and then allowed to precipitate for 15 min. The slurry was centrifuged (in a refrigerated centrifuge precooled to 4 °C at 17 000 × *g* for 20 min) and the supernatant and resuspended precipitate (with 20 mmol dm⁻³ phosphate buffer, pH 7.0) were analysed for protein (BPE) content and purity. The resuspended precipitate with the maximum purity and recovery was then used to

prepare the ATPS as described above. Results reported are the average of three independent experiments, and standard errors were judged to be a maximum of $\pm 10\%$ of the mean value.

Analytical procedures

The total protein concentration in the samples was estimated by the method of Bradford.¹⁷ The purity of BPE was determined as the 545/280 nm absorbance ratio (purity of BPE = $A_{545 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$). Bermejo *et al.*⁹ reported the use of the 545/280 nm absorbance ratio as an estimate of BPE purity, since the absorption spectrum of this protein exhibits a peak at 545 nm. Under this circumstance a ratio greater than 4.0 corresponds to highly purified BPE (defined as pure commercial BPE; Sigma Chemicals). The concentration of BPE produced by *P. cruentum* was estimated by measuring the absorbance at 565 nm and using the equation system reported previously.^{9,18}

RESULTS AND DISCUSSION

Partitioning of BPE from *Porphyridium cruentum* in PEG/sulphate ATPS

For the design of a particular ATPS extraction process, once general conditions have been selected on the basis of experience or process limitations (e.g. polymer and salt type), more specific partitioning conditions (polymer and salt concentration, volume ratio, etc.) need to be established empirically. Although PEG/phosphate ATPS have been more extensively studied than other PEG/salt systems, in previous reports^{15,19} the direct application of PEG/phosphate ATPS after cell disruption did not yield highly purified (purity >4.0) BPE. Furthermore, phase separation in PEG/phosphate ATPS is unstable at a system pH below 6.5.^{12,20} Thus evaluation of the partitioning behaviour of BPE below pH 7.0 (under conditions close to its isoelectric point, i.e. pH 4.2–4.4²¹) was not feasible using ATPS in which the salt-forming phase was phosphate. Extraction using PEG/sulphate ATPS was evaluated in the present study to investigate the partitioning behaviour of BPE around its isoelectric point and the benefit to the extraction stage of an increase in protein recovery and purity. Table 1 illustrates the effects of changing the system pH (from 4.0 to 7.0) on the purity and top phase recovery of BPE from PEG1450/sulphate ATPS. It is clear that PEG/sulphate ATPS did not benefit either the purity or the top phase recovery of BPE over the range of pH studied. The purity of the initial BPE crude extract decreased slightly from 0.7 to 0.58–0.62 after PEG/sulphate ATPS, as a result of which the purification factor was less than 1.0 for all systems evaluated (Table 1). In a previous report²⁰ on the partitioning of a coloured protein (c-phycoerythrin produced by *Spirulina maxima*) in PEG/sulphate ATPS a moderate increase in purity of the protein was

Table 1. Purity and top phase recovery of B-phycoerythrin from PEG/sulphate ATPS^a

System	pH	Top phase		
		Purity of B-phycoerythrin	recovery of B-phycoerythrin (%)	Purification factor
PEG1450/sulphate	4.0	0.60 \pm 0.01	20.0 \pm 0.5	0.86
	5.0	0.62 \pm 0.01	23.0 \pm 0.5	0.89
	6.0	0.60 \pm 0.01	21.0 \pm 0.5	0.86
	7.0	0.58 \pm 0.01	20.0 \pm 0.5	0.83

^a Systems comprising PEG1450 (18.3% w/w) and sulphate (11.0% w/w) were selected to evaluate the impact of increasing pH on the purity and top phase recovery of B-phycoerythrin (BPE). For all systems the volume ratio (estimated from non-biological experimental systems) and concentration of crude extract of BPE in the ATPS were kept constant at 1.0 and 40% (w/w) respectively. The top phase BPE recovery is expressed relative to the original amount of BPE from crude extract loaded into the systems. The BPE purity is defined as the absorbance ratio $A_{545 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$, while the purification factor is the ratio between the BPE purity obtained at the top phase of the system and that from the BPE crude extract (i.e. purity of the BPE in the initial crude extract was 0.7) loaded into the ATPS.

associated with potential contamination due to the presence of cell debris at the interface. Interface BPE recovery was not experimentally determined owing to the presence of cell debris in this phase. It is possible that BPE concentrated at the interface or protein precipitation (associated with an extremely low top phase BPE recovery, i.e. 20–23% in Table 1) together with the accumulation of cell debris at the interface and in the top phase (data not shown) affected the purity of the target protein as in the case of c-phycoerythrin. Although recent reports^{22–24} have shown successful applications of PEG/sulphate ATPS for the recovery of various biological products such as plasmid DNA vectors, ricin B from tobacco hairy root and proteinase from tuna spleen, compared with PEG/phosphate ATPS,²³ it is clear that alternative ATPS need to be considered in the case of BPE.

Partitioning of BPE from *Porphyridium cruentum* in PEG/dextran ATPS

The use of PEG/dextran ATPS was considered in the present study to further explore the potential increase in purity of BPE from the crude extract. In general, the development of extraction processes for the recovery of macromolecules involving the use of PEG and dextran is limited for economic reasons. Thus applications of PEG/dextran ATPS have focused on the recovery of high-value products (e.g. cultures of hybridoma cells,²⁵ adenovirus and retrovirus products²⁶) in which the cost of the chemicals used in the extraction process is justified based on the price of the final product. In the case of the recovery of BPE using PEG/dextran systems, the commercial cost of highly purified BPE (US\$50/mg⁶) can potentially justify the use of such ATPS. However, economic aspects were not considered at this stage. The driving force behind the use of PEG/dextran ATPS was the need to establish an extraction process that results in purity >4.0 for BPE produced by

Table 2. Purity and top phase recovery of B-phycoerythrin from PEG/dextran ATPS^a

System	Volume ratio V_r	Purity of B-phycoerythrin	Top phase recovery of B-phycoerythrin (%)	Purification factor
PEG1450/dextran 40	1.6	0.9 ± 0.09	32 ± 3.0	1.3
PEG1450/dextran 70	1.0	1.2 ± 0.10	27 ± 2.0	1.7
PEG1450/dextran 500	1.0	1.6 ± 0.10	25 ± 2.0	2.3
PEG1450/dextran 500	1.6	2.1 ± 0.20	70 ± 3.0	3.0
PEG1450/dextran 500	2.3	2.0 ± 0.20	74 ± 3.0	2.9

^a For each system the number 40, 70 or 500 represents the nominal molecular weight of dextran, i.e. 40 000, 70 000 or 500 000 g mol⁻¹ respectively. V_r was estimated from non-biological experimental systems as described in the Experimental section. The system pH and concentration of crude extract of BPE in the ATPS were kept constant at 7.0 and 40% (w/w) respectively. The top phase BPE recovery is expressed relative to the original amount of BPE from crude extract loaded into the systems. The BPE purity is defined as the absorbance ratio $A_{545\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$, while the purification factor is the ratio between the BPE purity obtained at the top phase of the system and that from the BPE crude extract (i.e. purity of the BPE in the initial crude extract was 0.7) loaded into the ATPS.

P. cruentum. For all PEG/dextran ATPS characterised by $V_r \geq 1.0$ (i.e. 1.0–2.3; Table 2), the initial purity of the BPE crude extract (i.e. 0.7) increased after ATPS. PEG1450/dextran 500 ATPS with $V_r = 1.6$ and 2.3 exhibited the highest increases in purity (from 0.7 to 2.1 and 2.0 respectively; Table 2), resulting in purification factors of 3.0 and 2.9 respectively. Furthermore, the use of these two ATPS resulted in a top phase recovery of BPE greater than 70% compared with the 25–32% recovery obtained from the other PEG/dextran systems evaluated (Table 2). Although additional system parameters (e.g. PEG and dextran concentration, V_r , etc.) were evaluated in PEG/dextran ATPS, an increase in purity above 2.1 was not achieved (data not shown). In previous reports^{15,19} on the partitioning behaviour of BPE in PEG/phosphate systems a BPE purity of 2.8–2.9 was obtained after cell disruption. Thus further optimisation of the BPE extraction process exploiting PEG/dextran ATPS was not pursued. Furthermore, it can be anticipated that the economic aspects associated with the use of dextran will have an impact on the commercial application of the ATPS process that will need to be considered.

Partitioning of BPE from *Porphyridium cruentum* in ATPS after isoelectric precipitation

In order to improve the performance of defined downstream processes, different bioengineering strategies can be adopted. For the case of BPE primary recovery, to achieve highly purified BPE, two general practical approaches were considered. The first approach involved the further processing of the top PEG-rich phase containing the partially purified BPE to increase the purity above 4.0. The second approach considered the processing of the BPE crude extract obtained from the cell disruption stage prior to ATPS. Following the success achieved with another coloured protein (c-phycoerythrin produced by *S. maxima*²⁰), it was decided to process the top PEG-rich phase by ultrafiltration to remove PEG and additional contaminant proteins. However, after several attempts, no further increase in BPE purity was achieved, probably owing to the similarity of the molecular weights of the target protein and contaminants. Consequently, processing of

the resulting BPE crude extract from cell disruption to potentially concentrate and increase the purity of BPE was explored. From several techniques often used in the early stages of downstream processing for both product stream concentration and fractionation, isoelectric precipitation was selected. Isoelectric precipitation, a well-established technique, is attractive because it is easily adapted to large scale, uses simple equipment and can be done without denaturation of biological products.²⁷

The purity and recovery of BPE produced by *P. cruentum* from a precipitate obtained by isoelectric precipitation relative to the system pH are illustrated in Fig. 1. Examination of the isoelectric precipitation of BPE crude extract shows that the highest purity and protein content (expressed as protein recovery) of the target protein resulted at pH 4.0 (close to the BPE isoelectric point, pH 4.2–4.4²¹), with about 77% BPE recovery and a purity of 1.8. This represents a 2.6-fold increase in purity relative to the initial purity of the BPE crude extract after cell disruption (i.e. 0.7). The supernatant from the isoelectric precipitation was also examined. However, the purity of BPE did not increase and only low BPE recovery (less than 25%) was achieved. Thus the BPE crude precipitate obtained by isoelectric precipitation at pH 4.0 was selected to load ATPS. The purity and top phase recovery of BPE from PEG/dextran and PEG/phosphate ATPS loaded with resuspended BPE precipitate obtained by isoelectric precipitation are illustrated in Table 3. PEG1450/dextran 500 and PEG1000/phosphate were selected based upon results from this work and from a previous report by our group¹⁹ respectively. It is clear that PEG/phosphate was superior to PEG-dextran ATPS in increasing BPE purity after isoelectric precipitation. For the selected PEG/dextran, although high BPE recovery was achieved (i.e. 92–95%; Table 3), no significant benefit in protein purity was obtained by exploiting precipitation and ATPS. BPE purity obtained from isoelectric precipitation did not increase when extraction with PEG/dextran ATPS was applied (i.e. purification factor 1.0–1.2; Table 3). In contrast, PEG/phosphate ATPS extractions resulted in an increase of 2.1–2.3 in the purity of the initial BPE precipitate loaded into the systems (i.e. 1.8).

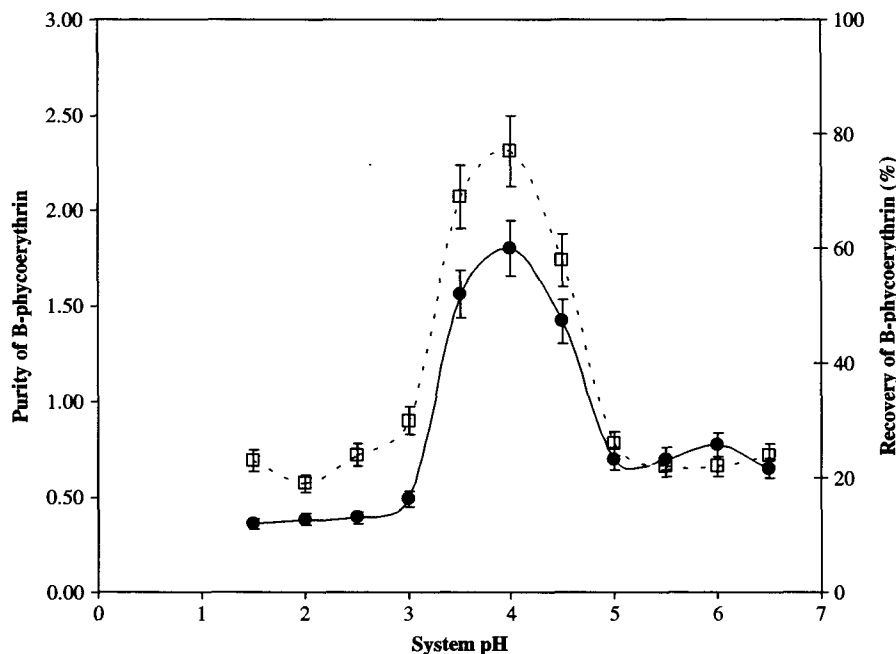


Figure 1. Purity and recovery of B-phycoerythrin (BPE) produced by *Porphyridium cruentum* from a precipitate obtained by isoelectric precipitation. The BPE recovery (\square) and purity (\bullet) from the precipitate (produced as reported in the Experimental section) are expressed relative to the system pH. The BPE recovery was estimated relative to the original amount of BPE initially present in the crude extract. The BPE purity is defined as the absorbance ratio $A_{545\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$.

Table 3. Purity and top phase recovery of B-phycoerythrin from ATPS loaded with *Porphyridium cruentum* crude extract obtained by isoelectric precipitation^a

System	PEG (% w/w)	Salt or dextran (% w/w)	Purity of B-phycoerythrin	Top phase recovery of B-phycoerythrin (%)	Purification factor
PEG1000/phosphate	29.5	9.0	4.1 \pm 0.2	95 \pm 3.0	2.3
	18.0	15.0	3.7 \pm 0.2	88 \pm 2.0	2.1
PEG1450/dextran 500	12.0	12.0	1.8 \pm 0.1	95 \pm 2.0	1.0
	14.0	11.0	2.1 \pm 0.2	92 \pm 2.0	1.2

^a For all systems the pH and concentration of crude extract of BPE in the ATPS were kept constant at 7.0 and 40% (w/w) respectively. The volume ratios for both PEG/phosphate systems were kept constant at 1.0 and for both PEG/dextran systems were greater than 1.0 (i.e. 1.6 and 2.3 as in Table 2). The top phase BPE recovery is expressed relative to the original amount of BPE from crude extract loaded into the systems. The BPE purity is defined as the absorbance ratio $A_{545\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$, while the purification factor is the ratio between the BPE purity obtained at the top phase of the system and that from the BPE crude extract (i.e. purity of the BPE in the initial crude extract was 1.8) loaded into the ATPS.

PEG1000/phosphate comprising 29.5% (w/w) PEG, 9.0% (w/w) phosphate, a volume ratio (V_2) equal to 1.0, a system pH of 7.0 and loaded with 40% (w/w) of the BPE extract generated by precipitation achieved the highest protein purity, resulting in highly purified (purity >4.0) BPE (Table 3). This result represents a 5.9-fold increase in purity over the BPE crude extract from cell disruption (purity 0.7) after precipitation and ATPS (purity 1.8 and 4.1 respectively; Table 4). It is possible that the addition of the precipitation stage eliminated additional contaminant proteins, resulting in a better performance of the PEG/phosphate ATPS extraction. Apparently, the maximum capacity of PEG/dextran to accumulate BPE in the top phase for this particular system was already achieved and, since the general mechanism of the partitioning of BPE in PEG/dextran ATPS is not clear, further characterisation is required

to extend our knowledge of this phenomenon. The general objective of recovering highly purified BPE was already achieved, so additional experiments involving PEG/dextran ATPS were not pursued. However, it is anticipated that better results would be expected with extended experiments with PEG/phosphate ATPS involving additional system parameters after precipitation. This assumption is based on the increased BPE purity of a crude extract from disrupted *P. cruentum* reported when a process for the primary recovery of BPE was developed using PEG/salt ATPS.¹⁵

The general process proposed for the recovery of highly purified BPE from *P. cruentum* is presented in a simplified manner in Fig. 2. This process is characterised by three unit operations for the downstream processing to produce BPE with a purity of 4.1. Although the process reported by Bermejo

Table 4. Protein recovery and purity from each unit operation of the process for the recovery of B-phycoerythrin (BPE)^a

Process stage	Inlet stream	Outlet stream	Recovery from each stage (%)	Process recovery (%)	Purification factor
Cell disruption					
Total volume (dm ³)	0.10	0.10			
Biomass concentration (g dm ⁻³)	250	250			
Total biomass (g)	25.0	25.0			
BPE concentration (mg dm ⁻³)		220			
BPE purity ($A_{545\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$)		0.70			
Total BPE (mg)		22.0	100	100	1.0
Precipitation					
HCl addition (dm ³)	0.01				
Total volume (dm ³)	0.10	0.11			
Biomass concentration (g dm ⁻³)	250	230			
Total biomass (g)	25.0	25.0			
BPE concentration (mg dm ⁻³)	220	140			
BPE purity ($A_{545\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$)	0.70	1.80			
Total BPE (mg)	22.0	17.0	77.0	77.0	2.6
PEG/phosphate ATPS extraction					
PEG + PO ₄ addition (dm ³)	0.16				
Total volume (dm ³)	0.11	0.27			
Biomass concentration (g dm ⁻³)	230	93			
Total biomass (g)	25.0	25.0			
BPE concentration (mg dm ⁻³)	140	50.0			
BPE purity ($A_{545\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$)	1.80	4.1			
Total BPE (mg)	17.0	16.0	95.0	72.0	5.9

^a The biomass concentration after cell disruption is expressed as wet weight/volume. The purity, concentration and recovery of BPE from each step were estimated as described in the Experimental section. The purification factor is the ratio between the BPE purity obtained after and before each unit operation.

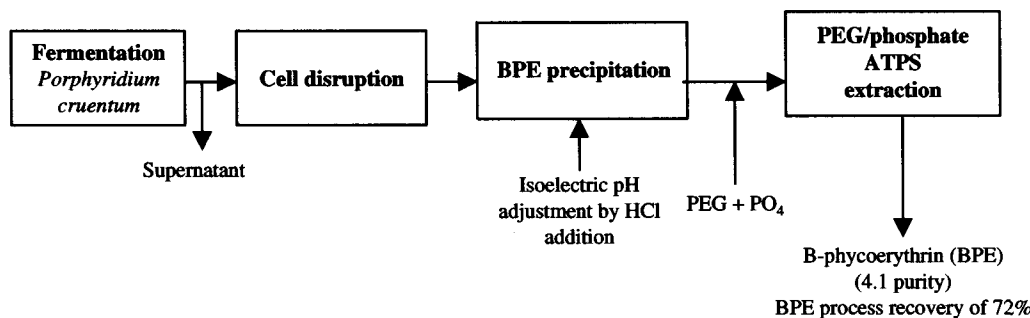


Figure 2. Simplified representation of the proposed process using aqueous two-phase systems for the recovery of B-phycoerythrin produced by *Porphyridium cruentum*. A biomass recovery step after fermentation is added to eliminate the supernatant. The biomass paste is then resuspended and processed for cell disruption by sonication. Precipitation by pH reduction is achieved by addition of 0.1 mol dm⁻³ HCl. After precipitation a stock solution of PEG and phosphate is added for ATPS extraction. Process information on the streams from each unit operation is detailed in Table 4.

*et al.*¹⁰ also considered three unit operations to obtain purified BPE, two of them are chromatography steps that raised potential constraints regarding the economics and the complex nature of the process. In contrast, the proposed ATPS process involves unit operations that are simple and easily adaptable on a large scale (i.e. precipitation and ATPS). The protein recovery and purity obtained after each process stage are illustrated in Table 4. The information presented considers the increase in volume caused by the addition of HCl and chemical-forming phases in the precipitation and ATPS stages respectively. The total amount of processed wet biomass throughout the entire process was assumed to remain constant

and no losses were considered between each unit operation. However, BPE recovery values take into account the losses occurring during each of the different streams of the process. The estimation of the mass balance of the proposed process was based upon 100 cm³ of 25% (wet w/v) disrupted biomass. After cell disruption an extract resulted with a concentration and purity of BPE of 220 mg dm⁻³ and 0.7 respectively (Table 4). Isoelectric precipitation caused a dilution of the BPE crude extract by the addition of 0.1 mol dm⁻³ HCl (10% of the volume of the extract). The process stream from precipitation exhibited a concentration and purity of

BPE of 140 mg dm^{-3} and 1.8 respectively. A 2.6-fold increase in purity of the BPE was obtained from this stage. The total amount of BPE obtained from the precipitation stage (i.e. 17 mg) represents 77% recovery of the BPE contained in the crude extract. ATPS produced a process stream with 16 mg of highly purified (purity 4.1) BPE. It can be anticipated that with this proposed process approximately 0.64 mg of BPE can be potentially produced from 1.0 g of wet biomass. The research presented here resulted in a recovery process that increased the protein purity up to 5.9 times with respect to the purity of the initial crude extract, producing an overall BPE recovery of 72% with a purity of 4.1 and potential economic value as high as US\$50/mg (Table 4). A direct comparison of the newly proposed process with the existing protocol involving chromatography steps¹⁰ highlights the superiority of the current approach. This novel process greatly simplifies the way in which BPE produced by *P. cruentum* can be recovered, with significant scope for commercial application.

CONCLUSIONS

This paper reports a simplified process based upon isoelectric precipitation and aqueous two-phase systems for the fractionation of cell homogenate of *P. cruentum* to obtain highly purified (purity >4.0) B-phycoerythrin. It has been shown that PEG/sulphate and PEG/dextran ATPS are unsuitable for the development of a process to recover highly purified BPE. In contrast, PEG/phosphate ATPS proved to be suitable for the recovery of purified BPE after an additional stage of isoelectric precipitation. Processing of cell homogenate of *P. cruentum* by isoelectric precipitation resulted in an increase in purity of the target protein from the BPE crude extract and enhanced the performance of the subsequent ATPS. The operating conditions established for the PEG1000/phosphate ATPS extraction resulted in a process for the recovery and purification of BPE from *P. cruentum*. These conditions concentrated the protein preferentially to the top PEG-rich phase and the contaminants to the opposite phase. The recovery process developed involved the use of the conventional technique of isoelectric precipitation prior to PEG/phosphate ATPS extraction, which further increased the purity of BPE by the elimination of contaminant proteins. Overall, the results reported here demonstrate the potential application of ATPS together with isoelectric precipitation for the recovery of purified BPE as a first step in the development of a commercial process.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledge the financial support of CONACyT (grant 39645) and the ITESM Research Chair (grant CAT005).

REFERENCES

- Cohen Z, The chemicals of *Spirulina*. In *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell Biology and Biotechnology*, ed. by Vonshak A. Taylor and Francis, London, pp. 175–204 (1997).
- Ciferri O, *Spirulina*, the edible microorganism. *Microb Rev* 47:551–578 (1983).
- Arad S and Yaron A, Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends Food Sci Technol* 3:92–97 (1992).
- Ayyagari M, Pande R, Kamtekar S, Gao H, Marx K, Kumar J, et al., Molecular assembly of proteins and conjugated polymers: towards development of biosensors. *Biotechnol Bioeng* 45:116–121 (1995).
- Bermejo R, Talavera EM and Alvarez-Pez JM, Chromatographic purification and characterization of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*: semipreparative HPLC separation and characterization of its subunits. *J Chromatogr A* 917:135–145 (2001).
- Martek Corporation. [Online]. Available: <http://www.market-bio.com> (Accessed October 2005).
- Haugland RP, *Handbook of Fluorescent and Research Chemicals* (6th edn). Molecular Probes, Eugene, OR (1996).
- Ranjitha K and Kaushik BD, Purification of phycobiliproteins from *Nostoc muscorum*. *J Sci Ind Res* 64:372–375 (2005).
- Bermejo R, Alvarez-Pez JM, Acien-Fernandez FG and Molina-Grima E, Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *J Biotechnol* 93:73–85 (2002).
- Bermejo R, Acien FG, Ibáñez MJ, Fernández JM, Molina E and Alvarez-Pez JM, Preparative purification of b-phycoerythrin from microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. *J Chromatogr B* 790:317–325 (2003).
- Rito-Palomares M, Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. *J Chromatogr B* 807:3–11 (2004).
- Rito-Palomares M, Dale C and Lyddiatt A, Generic application of an aqueous two-phase process for protein recovery from animal blood. *Process Biochem* 35:665–673 (2000).
- Rito-Palomares M and Lyddiatt A, Practical implementation of aqueous two-phase processes for protein recovery from yeast. *J Chem Technol Biotechnol* 75:632–638 (2000).
- He C, Li S, Liu H, Li K and Liu F, Extraction of testosterone and epitestosterone in human urine using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt. *J Chromatogr A* 1082:143–149 (2005).
- Benavides J and Rito-Palomares M, Bioprocess intensification: a potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *J Chromatogr B* 807:33–38 (2004).
- Zaman F, Kusnadi AR and Glatz CE, Strategies for recombinant protein recovery from canolaby precipitation. *Biotechnol Prog* 15:488–492 (1999).
- Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254 (1976).
- Bennet A and Bogorad L, Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue–green algae. *J Cell Biol* 58:419–435 (1973).
- Benavides J and Rito-Palomares M, Potential aqueous two-phase processes for the primary recovery of colored proteins from microbial origin. *Eng Life Sci* 5:259–266 (2005).
- Rito-Palomares M, Nuñez L and Amador D, Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycoerythrin recovery from *Spirulina maxima*. *J Chem Technol Biotechnol* 76:1272–1280 (2001).
- Koller KP, Wehrmeyer W and Schneider H, Isolation and characterization of disc-shaped phycobilisomes from the red alga *Rhodella violacea*. *Arch Microbiol* 112:61–67 (1977).

- 22 Klomkiao S, Benjakul S, Visessanguan W, Simpson BK and Kishimura H, Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems. *Process Biochem* 40:3061–3067 (2005).
- 23 Zhang C, Medina-Bolivar F, Buswell S and Cramer CL, Purification and stabilization of ricin B from tobacco hairy root culture medium by aqueous two-phase extraction. *J Biotechnol* 117:39–48 (2005).
- 24 Trindade IP, Diogo MM, Prazeres DMF and Marcos JC, Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. *J Chromatogr A* 1082:176–184 (2005).
- 25 Zijlstra GM, de Gooijer CD, van der Pol LA and Tramper J, Design of aqueous two-phase systems supporting animal cell growth: a first step towards extractive bioconversion. *Enzyme Microb Technol* 19:2–8 (1996).
- 26 Brass GMF, Simon GW and Lyddiatt A, Recovery in aqueous two-phase systems of nanoparticulates applied as surrogate mimics for viral gene therapy vectors. *J Chromatogr B* 743:409–419 (2000).
- 27 Glatz CE, Precipitation, in *Downstream Processing Biotechnology*, ed. by Asenjo J. Marcel Dekker, New York, NY, pp. 329–358 (1990).

New aqueous two-phase systems based on poly(ethylene oxide sulfide) (PEOS) and potassium phosphate for the potential recovery of proteins

Tanhia Hernandez-Mireles and Marco Rito-Palomares*

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

Abstract: A new aqueous two-phase system (ATPS) based on a degradable polymer called poly(ethylene oxide sulfide) with a molecular weight of $33\,000\text{ g mol}^{-1}$ (identified as PEOS-12) and potassium phosphate was exploited for the potential recovery of proteins. An initial characterisation of the ATPS was achieved by the construction of a phase diagram for the PEOS-12/phosphate system. The protein partitioning behaviour of lysozyme and bovine serum albumin (BSA), selected as single model proteins, and B-phycoerythrin (BPE) produced by *Porphyridium cruentum* in the new ATPS under increasing tie line length (TLL) conditions at constant phase volume ratio (V_r) and system pH was investigated. Both single proteins partitioned in the new ATPS, initially exhibiting bottom phase preference; however, lysozyme changed phase preference when TLL was increased. Fractionation of a complex model (production of BPE by *P. cruentum*) using PEOS-12/phosphate ATPS was performed to evaluate the potential protein recovery from fermentation broth or cell homogenate. The proposed new ATPS proved to be suitable for the potential recovery of BPE from crude extract of *P. cruentum*. In general, a system comprising $V_r = 1.0$, 18% (w/w) PEOS-12, 8% (w/w) phosphate and 30% (w/w) TLL at pH 7.0 provided conditions to concentrate BPE into the bottom phase (i.e. partitioning behaviour of BPE; $\ln K_{\text{BPE}} = -1.8$) with a protein recovery of 84%. The findings reported here demonstrate the potential application of the new ATPS for the recovery of proteins from complex biological suspensions.

© 2006 Society of Chemical Industry

Keywords: poly(ethylene oxide sulfide); protein recovery; aqueous two-phase systems

INTRODUCTION

Aqueous two-phase extraction represents a powerful technique for separation, concentration and purification of proteins, cells or organelles and other biological products. Aqueous two-phase systems (ATPS) have been extensively exploited to separate and purify proteins, without significant denaturing effects, from crude materials such as cell extracts, downstream broths and culture filtrates, because insoluble cell debris usually accumulates in one of the two phases.¹ ATPS are formed when, for example, two hydrophilic but incompatible polymers such as poly(ethylene glycol) (PEG) and dextran or a hydrophilic polymer and a salt (e.g. phosphate, citrate, sulfate) are simultaneously dissolved in water. Polymer/salt ATPS are commonly preferred over polymer/dextran ATPS because of their lower cost, lower viscosity and shorter time required for phase separation.^{1–3}

In order to improve some of the advantages of ATPS, alternative two-phase systems have been developed.^{4–6} A detailed evaluation of these new types of ATPS and their applications is given in

a recent review.¹ Although these new ATPS have been characterised by the use of alternative chemical forming phases and modification of the current ones, the complexity associated with the preparation of the modified systems, the cost of the resulting processes and the effect on the overall process recovery are factors that have to be considered in the generic application of these alternative ATPS. In this context the synthesis of a new PEG derivative degradable in reductive conditions, poly(ethylene oxide sulfide) (PEOS), was reported recently.⁷ However, this new polymer was presented in the light of its importance in delivery systems, because it facilitates solubilisation for long-term circulation of drugs, genes or proteins. In general, PEG is one of the most widely used polymers in fields such as drug or gene delivery,^{8,9} cell fusion,¹⁰ protein PEGylation,¹¹ etc. Although PEG shows no toxicity in mammalian cells because of the absence of degradable ether bonds in its backbone, the application of PEG for controlled release in drug delivery on the basis of degradable bonds is limited.⁷

* Correspondence to: Marco Rito-Palomares, Centro de Biotecnología, Departamento de Biotecnología e Ingeniería de Alimentos, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Ave. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Monterrey, NL 64849, Mexico

E-mail: mrito@itesm.mx

Contract/grant sponsor: CONACyT; contract/grant number: 39645

Contract/grant sponsor: ITESM Research Chair; contract/grant number: CAT005

(Received 29 September 2005; revised version received 5 December 2005; accepted 6 December 2005)

DOI: 10.1002/jctb.1506

The new PEG derivative PEOS has disulfide bonds within the PEG backbone which make it stable in the oxidative environment of the cell exterior, but it can be degraded in the cell interior. Such properties make it useful as a drug delivery material in which the polymer degrades after cell uptake. In this context the potential combined benefits of protein partition and delivery by using PEOS as a chemical forming phase of a new ATPS represent an interesting alternative to pursue.

In the present study the potential use of PEOS and potassium phosphate to establish a new ATPS for the recovery of proteins was investigated. A PEOS/phosphate binodal curve was constructed as a first step in the characterisation of the new ATPS. The protein partitioning behaviour in the PEOS/phosphate ATPS was examined using single model systems characterised by two commercial purified proteins (lysozyme and bovine serum albumin). A representative complex model system (production of B-phycoerythrin by *Porphyridium cruentum*) was selected to evaluate the potential of the new ATPS for the fractionation of proteins of microbial origin. This research provides an insight into the application of the new ATPS based on PEOS for protein recovery, with potential benefits to the field of drug delivery.

EXPERIMENTAL

Characterisation of PEOS/phosphate two-phase system

PEOS with a molecular weight of $33\,000\text{ g mol}^{-1}$ (identified as PEOS-12) was synthesised in the Chemistry Department of ITESM, Monterrey, Mexico following the protocol recently reported by Lee *et al.*⁷ Briefly, tosylated oligo ethylene oxide (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA) was thioacetylated, deacetylated by NH_3 and polymerised in dimethyl sulfoxide solution to yield PEOS-12. Stock solutions of PEOS-12 (50% w/w) and dipotassium hydrogen orthophosphate/potassium dihydrogen orthophosphate (30% w/w) were used to estimate the PEOS-12/phosphate binodal curve by the cloud point method.¹² The system tie line length (TLL), which represents the length of the line that connects the compositions of the top and bottom phases of a defined ATPS, was calculated as described by Albertsson.¹³

Experimental systems

In order to perform the partitioning experiments in the new ATPS, two types of experimental vehicle were selected, namely single model systems characterised by stock solutions of commercial purified proteins (lysozyme and bovine serum albumin (BSA); Sigma Chemicals) and a complex model system characterised by a crude extract of B-phycoerythrin (BPE) from cell homogenate of *P. cruentum*. The alga was cultivated in the culture medium previously defined by Bermejo *et al.*,¹⁴ following a protocol previously described by Benavides and Rito-Palomares.¹⁵ Briefly, *P. cruentum*

was grown in batch culture (1 dm^3 Erlenmeyer flasks) at $22\text{--}25^\circ\text{C}$ under natural light conditions; agitation and aeration were provided with an airflow rate of $3.2\text{ cm}^3\text{ s}^{-1}$ using a peristaltic pump (Elite 799, Rolf C. Hagen Corp., Mansfield, MA, USA). The cells were allowed to grow for 30 days and were then harvested by centrifugation (Eppendorf 5415C, Westbury, NY, USA) at $1000 \times g$ for 5 min. After harvesting, cell disruption was carried out in a 50 cm^3 glass test tube using a sonicator (Branson 1510, Branson Ultrasonic Corp., Danbury, CT, USA). Cell fragmentation was verified using an optical microscope (Olympus CK2 Olympus, Melville, NY, USA). The homogenate obtained as a result of cell disruption of the *P. cruentum* biomass was referred to as BPE crude extract and included the cell debris generated.

Aqueous two-phase experiments

For convenience, ATPS were prepared on a fixed mass basis. Predetermined quantities of stock solutions of PEOS-12 (50% w/w) and potassium phosphate (30% w/w) (see Table 1) were mixed with either a single model system (containing a 2 mg cm^{-3} stock solution of commercial purified protein, either lysozyme or BSA) or a complex model system (containing 10% (w/v) BPE crude extract from cell homogenate of *P. cruentum*) to give a final weight of 1.5 g. The stock solutions (PEOS-12 or salt) were mixed and the phases were dispersed by gentle mixing for 30 min at 25°C . Fine adjustment of the pH was made by addition of orthophosphoric acid or sodium hydroxide. Complete phase separation was achieved by low-speed batch centrifugation at $1500 \times g$ for 20 min at 25°C . Estimates of the volumes of the top and bottom phases and solids were made in graduated centrifuge tubes. The volumes of the phases were used to estimate the volume ratio (volume of the top phase/volume of the bottom phase, V_t). Samples were carefully extracted from the BPE crude extract and from the top and bottom phases of the ATPS and diluted for biochemical analysis. The protein concentration in the samples was estimated following the method of Bradford.¹⁶ Subsequently the protein partition coefficient (concentration of protein in the top phase/concentration of protein in the bottom phase, K) was calculated. The top and bottom phase protein recoveries were estimated as the amount of protein present in the upper or lower phase (volume of the phase \times protein concentration in the phase) and expressed relative to the original amount loaded into the system. The results reported are averages of three independent experiments, and errors were estimated to be a maximum of $\pm 10\%$ of the mean value.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to initiate the characterisation of the new ATPS, a phase diagram or binodal curve is needed. A

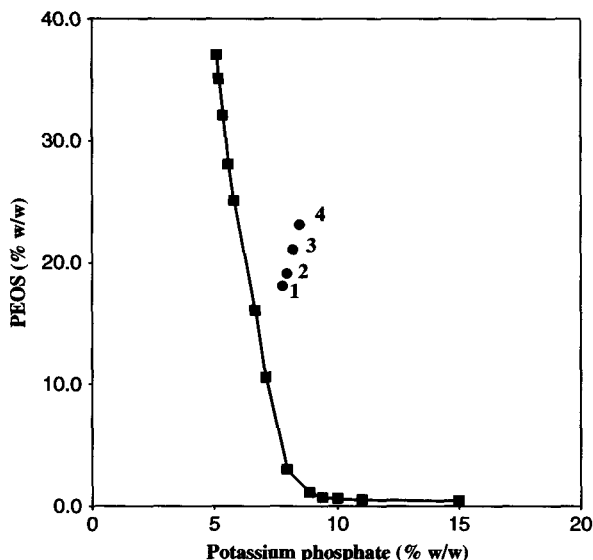


Figure 1. Binodal curve of the poly(ethylene oxide sulfide)/phosphate system at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and pH 7.0. The four systems (1–4; see Table 1 for their composition and tie line lengths) were selected with a volume ratio close to 1.0 and increasing tie line length to evaluate the protein partitioning behaviour in the new ATPS. The binodal curve was obtained as described in the Experimental section.

binodal curve can be constructed by determining the compositions of the top and bottom phases of a series of systems in which the concentrations of chemical forming phases are varied. In the present study the cloud point method, an alternative practical approach for the construction of the binodal curve, was used. This method exploits the first appearance of turbidity, which indicates that the system is about to enter the two-phase area, when a concentrated solution of the polymer is added to dropwise with a solution of salt. The binodal curve of the new PEOS-12/phosphate ATPS obtained by the cloud point method¹² is depicted in Fig. 1. The shape of the curve is similar to that from traditional PEG/phosphate ATPS with high-molecular-weight PEG, e.g. $20\,000\text{ g mol}^{-1}$,¹⁷ in which a reduced (with respect to ATPS with low-molecular-weight PEG) concentration of salt and polymer is required to form two phases (the binodal shift to the origin). It has been reported^{13,18} that, in polymer/polymer ATPS, phase formation depends on the hydrated surfaces of the two species being sufficiently incompatible to generate phase separation. In contrast, phase separation in polymer/salt systems was initially associated with differing interactions with the ether dipoles of the polymer chain.¹⁹ However, this explanation has not been widely adopted. Thus the descriptive mechanism in systems composed of polymer and salt remains unclear.^{20,21} In this study, once the binodal curve of the new ATPS was established, four systems (1–4 in Fig. 1 and Table 1) were identified in the two-phase area of the diagram to evaluate the protein partitioning behaviour in the PEOS-12/phosphate ATPS. These systems were characterised by increasing TLL (from 30 to 50%

Table 1. Systems selected for evaluation of the protein partitioning behaviour in the new ATPS^a

System	Poly(ethylene oxide sulfide) (PEOS-12) (% w/w)	Phosphate (% w/w)	System volume ratio V_r	Tie line length (TLL) (% w/w)
1	18.0	7.8	0.9 ± 0.10	30.0
2	19.0	8.0	0.95 ± 0.10	35.0
3	21.0	8.3	1.09 ± 0.10	42.0
4	23.0	8.5	1.2 ± 0.12	50.0

^a Systems comprising poly(ethylene oxide sulfide) (PEOS-12) of molecular weight $33\,000\text{ g mol}^{-1}$ and phosphate (systems 1–4) were selected to evaluate the impact of increasing TLL on the partitioning behaviour of selected proteins. V_r was estimated from blank non-biological systems. The TLLs of the systems were estimated from the composition of PEOS-12 and phosphate (columns 2 and 3), and all systems were assembled at pH 7.0 as described in the Experimental section.

w/w), constant volume ratio (V_r close to 1.0) and a system pH of 7.0.

Before studying the potential of the new ATPS for the fractionation of proteins of microbial origin, the protein partitioning behaviour in PEOS-12/phosphate systems was evaluated using single model systems. These systems took no account of the influence on the performance of ATPS of the whole range of proteins and contaminants such as pigments and other biopolymers (lipids, carbohydrates, etc.) and cell debris which may be present in a common fermentation broth. For the examination of the partitioning behaviour of proteins in the new ATPS, a practical approach exploiting the effect of TLL on the protein partition coefficient was used. Figure 2 illustrates the impact of increasing TLL on the protein partition coefficient for both purified proteins and BPE from the crude extract. It is clear that partitioning of proteins occurred in the new ATPS. As expected from an ATPS comprising a high-molecular-weight polymer, the majority of the proteins loaded into the systems concentrated in the lower phase at low TLL (i.e. 30% w/w). In the case of lysozyme the results showed that increasing TLL caused the partition coefficient to rise. Furthermore, this particular protein exhibited shifting phase preference behaviour (from bottom to top phase preference) when TLL increased ($\ln K$ changed from -1.3 to 0.42 as TLL increased from 30 to 50% w/w; Fig. 2). Such partitioning behaviour may be explained, as in the case of traditional ATPS, by the low molecular weight of the protein ($14\,400\text{ g mol}^{-1}$) associated with changes in the free volume²² and density of the phases.¹² The density of the PEOS-12-rich phase was estimated as 1.15 g cm^{-3} and that of the phosphate-rich phase as 1.38 g cm^{-3} .

It has been reported for several experimental vehicles¹ that the free volume in the bottom phase of a common PEG/phosphate ATPS decreases when TLL is increased.²² As a result, the protein (in this case lysozyme) in the lower phase may be forced

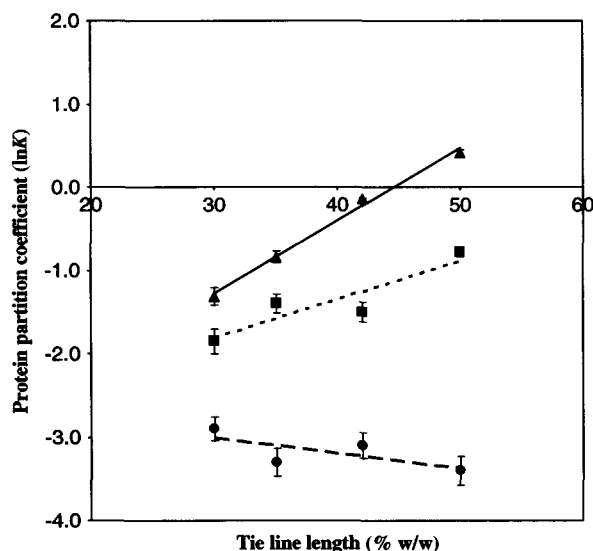


Figure 2. Influence of system tie line length (TLL) on protein partitioning behaviour in PEOS-12/phosphate ATPS. The TLLs of the systems were estimated from the composition of PEOS-12 and phosphate as described in the Experimental section. The protein partition coefficient of lysozyme (▲), bovine serum albumin (●) and B-phycoerythrin (■) represents the ratio of the concentration of the selected protein in the phases and is expressed as $\ln K$ and relative to TLL. For all systems the volume ratio (estimated from non-biological systems) and pH were kept constant at 1.0 and 7.0 respectively.

to migrate to the top phase; such migration was facilitated by the low size or molecular weight of the protein. It is important to point out that at low TLL (i.e. 30% w/w) the partition coefficient of lysozyme (K_{Lys}) was less than 1.0 ($\ln K_{Lys} < 0.0$; Fig. 2). A protein partition coefficient value (K) less than 1.0 is obtained when the protein concentration in the lower phase is greater than that in the upper phase. In the case of lysozyme loaded into the PEOS-12/phosphate ATPS, this protein concentrated predominantly in the phosphate-rich bottom phase (lysozyme bottom phase recovery of 77% in Table 2). However, when TLL increased, the protein tended to concentrate in the top phase (lysozyme top phase recovery of 59% at TLL of 50% w/w in Table 2). In the case of the partitioning behaviour of BSA (molecular weight $66\,200\text{ g mol}^{-1}$) in the new ATPS, it is clear that, regardless of the increment in TLL, a low protein partition coefficient ($\ln K_{BSA} < 0.0$) was obtained,

which means that the concentration of protein in the lower phase (BSA bottom phase recovery of 91–95% in Table 2) was superior to that in the top phase. Such partitioning behaviour may be explained by the free volume available for protein dissolution in the phosphate-rich phase. Partitioning of BSA into the top PEG-rich phase in common ATPS is favoured by using PEG of low molecular weight.²³ Such behaviour has been attributed to the fact that the interaction net of short polymer chains generates a lower excluded volume than that created by long chains. PEG of low molecular weight helps to overcome saturation problems in the top phase and therefore BSA is able to migrate to the top phase. However, an increase in the molecular mass of PEG in the system causes a shift in the accumulation of BSA from the top to the bottom phase. The effect of increasing molecular mass of PEG on solute partitioning behaviour has been explained on the basis of protein hydrophobicity^{24,25} and phase excluded volume.^{19,26} Clearly, the behaviour of BSA in ATPS with high-molecular-weight PEG is similar to that observed in the new PEOS-12/phosphate ATPS. Thus the suggested explanation for the partitioning behaviour of BSA in PEG/phosphate ATPS can also be applied to the new ATPS. Once the partitioning of model proteins in the new ATPS was proved, the fractionation of a complex biological suspension (i.e. crude extract from *P. cruentum*) in the PEOS-12/phosphate ATPS was evaluated.

BPE produced by *P. cruentum* was selected as a complex model system to evaluate the potential of the new PEOS-12/phosphate ATPS to fractionate a biological suspension for protein recovery. As in the case of model proteins, BPE exhibited bottom phase preference behaviour ($\ln K_{BPE} < 0.0$; Fig. 2). This implies that more than 60% of the BPE loaded into the ATPS concentrated in the lower phase (Table 2). Furthermore, an increase in TLL (from 30 to 50% w/w) caused the partition coefficient of BPE to rise ($\ln K_{BPE}$ increased from -1.85 to -0.80). However, a shift in phase preference from bottom to top phase (like the one observed for lysozyme) was not observed within the range of TLL evaluated. In the case of cell debris, such contaminants were concentrated at the interface (data not shown). Regarding the potential protein recovery, for single and complex model systems a total mass balance

Table 2. Influence of system tie line length on protein recovery from PEOS-12/phosphate ATPS^a

Tie line length (TLL) (% w/w)	Top phase recovery of lysozyme (%)	Bottom phase recovery of lysozyme (%)	Top phase recovery of BSA (%)	Bottom phase recovery of BSA (%)	Top phase recovery of B-phycoerythrin (%)	Bottom phase recovery of B-phycoerythrin (%)
30.0	21.5 ± 2.0	77.0 ± 7.0	6.2 ± 0.5	93.3 ± 4.0	14.0 ± 1.2	84.7 ± 4.0
35.0	26.4 ± 2.0	61.3 ± 6.0	3.2 ± 0.3	91.0 ± 4.0	15.0 ± 1.5	65.0 ± 4.0
42.0	41.5 ± 4.0	47.6 ± 4.0	3.8 ± 0.3	91.0 ± 4.0	16.0 ± 1.5	68.0 ± 4.0
50.0	59.0 ± 5.0	30.0 ± 3.0	3.0 ± 0.3	95.0 ± 5.0	29.0 ± 2.0	64.0 ± 4.0

^a The composition of the systems is given in Table 1. The top and bottom phase recoveries are expressed relative to the original amount of each selected protein (i.e. lysozyme, bovine serum albumin (BSA) and B-phycoerythrin) loaded into the systems. For all systems the volume ratio (estimated from non-biological experimental systems) and system pH were kept constant at 1.0 and 7.0 respectively.

was not met for all the selected ATPS (sum of top and bottom phase protein recoveries of Table 2 for each protein). This phenomenon can be associated with protein precipitation or concentration at the interface.²⁷ In general, from the ATPS studied, a system comprising $V_r = 1.0$, 18% (w/w) PEOS-12, 8% (w/w) phosphate and 30% (w/w) TLL at pH 7.0 provided conditions to concentrate BPE into the bottom phase (i.e. partitioning behaviour of BPE; $\ln K_{BPE} = -1.8$) with a protein recovery of 84% (Fig. 2 and Table 2). It is clear that partitioning of BPE in the new PEOS-12/phosphate ATPS has been shown, thus inviting consideration of the potential generic application of this ATPS for the recovery of proteins from crude extracts. The proposed new ATPS represents a useful technique to concentrate particular target proteins in either the top or the bottom phase of the system. A potential process in which the target protein concentrated in the top phase will benefit from the degradability of the polymer (PEOS-12) for drug delivery⁷ can be developed. In this case, once the protein of interest is concentrated in the PEOS-rich top phase, polymer removal can be achieved by exploiting the degradable nature of the new polymer. In contrast, bottom phase target protein preference can benefit from the new ATPS in a back-extraction scheme of a two-stage ATPS approach.¹ We have successfully exploited the potential of the new ATPS to partition proteins with outcomes similar to those observed in well-known ATPS. However, at this stage the partitioning behaviour and the mechanism governing the partitioning of proteins in PEOS-12/phosphate ATPS cannot be fully explained and further characterisation is required to clarify such phenomena in order to raise further the practical application of the technique for process development and enhancement.

CONCLUSIONS

To our knowledge, this is the first study to report the phenomenon of protein partitioning in a new PEOS-12/phosphate ATPS. The initial characterisation of the phase diagram of this new system based on PEOS-12 was achieved. It was shown that the selected proteins partitioned preferentially to the bottom phase of the ATPS. A shift in phase preference of lysozyme was observed when TLL was increased. The new PEOS-12/phosphate ATPS proved to be suitable for the potential recovery of BPE from the crude extract of *P. cruentum*. Overall, a system comprising $V_r = 1.0$, 18% (w/w) PEOS-12, 8% (w/w) phosphate and 30% (w/w) TLL at pH 7.0 concentrated BPE into the bottom phase (i.e. partitioning behaviour of BPE; $\ln K_{BPE} = -1.8$) with a protein recovery of 84%. The proposed new ATPS represents a useful technique to concentrate particular target proteins in either the top or the bottom phase of the system. Although characterisation of the performance of the PEOS-12/phosphate ATPS can be improved by further

investigation, these findings demonstrate the potential application of the new ATPS for the recovery of proteins from complex biological suspensions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledge the financial support of CONACyT (grant 39645) and the ITESM Research Chair (grant CAT005). The technical assistance of Mr Jesus Valencia (Chemistry Department, Monterrey Tech) in the synthesis of PEOS-12 is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Rito-Palomares M, Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. *J Chromatogr B* 807:3–11 (2004).
- Marcos JC, Fonseca LP, Ramalho MT and Cabral JMS, Partial purification of penicillin acylase from *Escherichia coli* in poly(ethylene glycol) sodium citrate aqueous two-phase systems. *J Chromatogr B* 734:15–22 (1999).
- Haghtalab A, Mokhtarani B and Maurer G, Experimental results and thermodynamic modeling of the partitioning of lysozyme, bovine serum albumin and α -amylase in aqueous two-phase systems of PEG and (K_2HPO_4 or Na_2SO_4). *J Chem Eng Data* 48:1170–1177 (2003).
- Pereira M, Wu YT, Madeira P, Venancio A, Macedo E and Teixeira J, Liquid–liquid equilibrium phase diagrams of new aqueous two-phase systems: ucon50-HB5100 + ammonium sulfate + water, ucon50-HB5100 + poly(vinyl alcohol) + water, ucon50-HB5100 + hydroxypropyl starch + water and poly(ethylene glycol) 8000 + poly(vinyl alcohol) + water. *J Chem Eng Data* 49:43–47 (2004).
- Sarubbo LA, Oliveira LA, Porto ALF, Duarte HS, Carneiro-Leao AMA, Lima-Filho JL, *et al.*, New aqueous two-phase systems based on cashew-nut tree gum and poly(ethylene glycol). *J Chromatogr B* 743:79–89 (2000).
- Tjernelid F, Berner S, Cajarville A and Johansson G, New aqueous two-phase system based on hydroxypropyl starch useful in enzyme purification. *Enzyme Microb Technol* 8:417–423 (1986).
- Lee Y, Koo H, Jin G-W, Mo H, Cho MY, Park JY, *et al.*, Poly(ethylene oxide sulfide): new poly(ethylene glycol) derivatives degradable in reductive conditions. *Biomacromolecules* 6:24–26 (2005).
- Campos AM, Sanchez A, Gref R, Calvo P and Alonso MJ, The effect of a PEG versus a chitosan coating on the interaction of drug colloidal carriers with the ocular mucosa. *Eur J Pharm Sci* 20:73–81 (2003).
- Putnam D, Zelikin AN, Izumrudov VA and Langer R, Polyhistidine–PEG:DNA nanocomposites for gene delivery. *Biomaterials* 24:4425–4433 (2003).
- Liu Y, Zhang W, Chan T, Saxena A and Xiang J, Engineered fusion hybrid vaccine of IL-4 gene-modified myeloma and relative mature dendritic cells enhances antitumor immunity. *Leuk Res* 26:757–763 (2002).
- Daly SM, Przybycien TM and Tilton RD, Adsorption of poly(ethylene glycol)-modified ribonuclease A to a poly(lactide-co-glycolide) surface. *Biotechnol Bioeng* 90:856–868 (2005).
- Bamberger S, Brooks DE, Sharp KA, van Alstine JM and Webber JJ, Preparation of phase systems and measurement of their phytochemical properties. In *Partitioning in Aqueous Two Phase Systems: Theory, Methods, Uses and Application in Biotechnology*, ed. by Walter H, Brooks DE and Fisher D. Academic Press, Orlando, FL, pp. 86–126 (1985).
- Albertsson PA, *Partition of Cell Particles and Macromolecules*. Wiley, New York, NY (1986).

- 14 Bermejo R, Alvarez-Pez JM, Acien-Fernandez FG and Molina-Grima E, Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *J Biotechnol* 93:73–85 (2002).
- 15 Benavides J and Rito-Palomares M, Potential aqueous two-phase processes for the primary recovery of colored proteins from microbial origin. *Eng Life Sci* 5:259–266 (2005).
- 16 Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254 (1976).
- 17 Zaslavsky BY, *Aqueous Two-phase Partitioning: Physical Chemistry and Bioanalytical Applications*. Marcel Dekker, New York, NY, pp. 653–664 (1995).
- 18 Abbott NL, Blankschtein D and Hatton TA, On protein partition in two-phase aqueous polymer systems. *Bioseparation* 1:191–225 (1990).
- 19 Huddleston JG, Ottomar KW, Ngonyani DM and Lyddiatt A, Influence of systems and molecular parameters upon fractionation of intracellular proteins from *Saccharomyces* by aqueous two-phase partition. *Enzyme Microb Technol* 13:24–32 (1991).
- 20 Cabezas H, Theory of phase formation in aqueous two-phase systems. *J Chromatogr B* 680:3–30 (1996).
- 21 Johansson H-O, Karstrom G, Tjerneld F and Haynes CA, Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. *J Chromatogr B* 711:3–17 (1998).
- 22 Grossman PD and Gainer JL, Correlation of aqueous two-phase partitioning of proteins with changes in free volume. *Biotechnol Prog* 4:6–11 (1988).
- 23 Rito-Palomares M, Dale C and Lyddiatt A, Aqueous two-phase fractionation of biological suspensions for protein recovery from bovine blood. *Biotechnol Tech* 12:711–714 (1998).
- 24 Kohler K, Ljungquist C, Kondo A, Veide A and Nilsson B, Engineering proteins to enhance their partition coefficient in aqueous two-phase systems. *Bio/Technology* 9:642–646 (1991).
- 25 Franco T, Andrews A and Asenjo J, The use of chemically modified proteins to study the effect of single protein property on partitioning in aqueous two-phase systems: effect of surface hydrophobicity. *Biotechnol Bioeng* 49:300–308 (1996).
- 26 Chen JP, Partitioning and separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in PEG/potassium phosphate aqueous two-phase systems. *J Ferment Bioeng* 73:140–147 (1992).
- 27 Rito-Palomares M and Middelberg APJ, Aqueous two-phase systems for the recovery of a recombinant viral coat protein from *Escherichia coli*. *J Chem Technol Biotechnol* 77:1025–1029 (2002).

Centro de Información-Biblioteca



30002006729560