

# Aislamiento, purificación y caracterización parcial de la C-ficocianina-620 obtenida a partir de la *Spirulina platensis*

Yoania Cabranes Campos, José Marcial Lagomasino Rodríguez y José Antonio Lagomasino Carreras.

Instituto de Oceanología, Avenida 1ra No. 18406 entre 184 y 186, Reparto Flores, Ciudad de La Habana, Código Postal 12100, Cuba.

Recibido: 21 de noviembre de 1999. Aceptado: 8 de mayo del 2000.

Palabras clave: *Spirulina platensis*, cianobacterias, ficobiliproteínas, ficocianina, aloficocianina, bilinas, ficobilisomas, cromatografía de intercambio iónico

Key words: *Spirulina platensis*, cyanobacteria, phycobiliproteins, phycocyanin, alophycocyanin, bilins, phycobilisomes, ionic exchange chromatography.

**RESUMEN.** La *Spirulina platensis* posee gran cantidad de ficobiliproteínas, dentro de las que se hayan la ficocianina y la aloficocianina, las cuales se asocian para formar complejos macromoleculares denominados ficobilisomas. Las ficobiliproteínas son pigmentos-proteínas coloreados y fluorescentes que forman parte de los complejos antenas cosechadores de luz de cianobacterias (algas verdes-azules). Estas cromoproteínas tienen unido covalentemente tetrapirroles lineales, las bilinas, relacionadas estructuralmente con la biliverdina. Las ficobiliproteínas por sus propiedades fluorescentes son utilizadas en la industria, en la biotecnología y en la medicina. El método de extracción de ficobiliproteínas de la biomasa de *Spirulina platensis* utilizado fue el de congelación-descongelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La C-ficocianina se purifica por cromatografía de intercambio aniónico en gel DEAE Sepharosa Fast Flow y posteriormente, se comprueba su pureza mediante una electroforesis en gel de poliácridamida (8 a un 25 %) y una cromatografía líquida de alta presión. Para la caracterización parcial del hexámero de C-ficocianina, se disocian sus subunidades alfa y beta, se separan en filtración en gel y se verifica su pureza por electroforesis en gel de poliácridamida (8 a un 25 %). Posteriormente, se estima el peso molecular del hexámero y de sus subunidades. Como resultado se obtiene el hexámero de C-ficocianina puro con un peso molecular en 229 kDa y las subunidades alfa y beta, también puras, con un peso molecular de 17,92 y 19,85 kDa respectivamente.

**ABSTRACT.** *Spirulina platensis* has a big quantity of phycobiliproteins, such as phycocyanin and alophycocyanin. They are components of a macromolecular complex called phycobilisome. The phycobiliproteins are colored and fluorescent pigment-proteins which constitute the light-harvesting antenna complexes in cyanobacteria (blue-green algae). These chromoproteins have covalently attached linear tetrapyrroles, bilins, structurally linked to the biliverdin. For their fluorescent properties, phycobiliproteins are used in industry, biotechnology and medicine. The extraction method of phycobiliproteins from biomass of *Spirulina platensis* was by freeze-unfreeze at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The C-phycocyanin was purified by anionic exchange chromatography using gel DEAE Sepharose Fast Flow and then its purity was verified by electrophoresis (8 to 25 % polyacrylamide) and high pressure liquid chromatography. For the partial characterization of the C-phycocyanin hexamer, its alpha and beta subunits, were separated by gel filtration. Their purity was proved by electrophoresis (8 to 25 % polyacrylamide). Later, the molecular weight of the hexamer and its subunits, was estimated. The pure C-phycocyanin with 229 kDa and the alpha and beta subunits, also pure, with 17.92 and 19.85 kDa were obtained respectively.

## INTRODUCCION

Se considera que las cianobacterias (algas verde-azules), más específicamente, la *Spirulina platensis*, entre otras microalgas, posee la mayor cantidad de ficobiliproteínas, que representan el 40 % de las proteínas totales de esta cianobacteria.

Las ficobiliproteínas son pigmentos-proteínas fluorescentes naturales, que presentan grupos cromóforos denominados bilinas, que son tetrapirroles lineales unidos a su esqueleto covalente, responsables de sus características ópticas más generales.<sup>1,2</sup>

Las ficobiliproteínas se agrupan en tres grandes grupos: ficocianina (absorbancia 620 nm), aloficocianina (absorbancia 650 nm) y ficoeritrina (absorbancia 565 nm), con diferentes características espectroscópicas.<sup>3</sup> Estas se asocian para conformar los ficobilisomas, a lo cual contribuyen los polipéptidos enlazantes en ciertas algas rojas.<sup>4</sup> Los ficobilisomas se hallan en la cara citoplasmática de la membrana tilacoidal de las cianobacterias<sup>5</sup> y aún así, estas cromoproteínas, son solubles en medio acuoso, por lo que se comportan de manera diferente a las demás proteínas de membrana.<sup>6,7</sup>

La parte proteica de la ficocianina y la aloficocianina presentes en la *Spirulina platensis*, la constituyen dos cadenas polipeptídicas, alfa y beta,<sup>8</sup> de 17 y 19 kDa de pesos mole-

culares respectivamente.<sup>9</sup> El punto isoelectrico de las ficobiliproteínas oscila entre 4,7 y 5,3<sup>10</sup> y sus pesos moleculares, se encuentran entre 110 y 260 kDa.<sup>9</sup>

La secuencia aminoacídica de las cadenas polipeptídicas de las ficobiliproteínas, presentan zonas de homología entre las subunidades alfa y beta. Estas zonas de homología son debidas al carácter ancestral y conservado que presentan estos pigmento-proteínas.<sup>11,12</sup>

Una de las características significativas de la *Spirulina platensis*, es que presentan asociaciones moleculares entre la ficocianina y la aloficocianina 680, formando monómeros-trímeros, dímeros-trímeros y dímeros-hexámeros.<sup>13,14</sup> Es de destacar este comportamiento, hacia una adaptación cromática complementaria en la *Spirulina platensis* sobre la base de la constante acción del hombre sobre ella.<sup>15,16</sup>

Las ficobiliproteínas, por sus propiedades fluorescentes, son ampliamente utilizadas en la industria como colorantes,<sup>17</sup> en la biotecnología, para formar conjugados con biotina, con avidina<sup>3</sup> y con anticuerpos monoclonales.<sup>18</sup> Asimismo, la ficocianina, es utilizada en Inmunohistoquímica Fluorescente,<sup>18</sup> en técnicas de distribución de células mediante fluorescencia activada,<sup>19</sup> citometría de flujo a tres colores<sup>20</sup> y marcaje de DNA para la visualización y análisis del genoma.<sup>21</sup> En la medicina, son utilizadas en conjugados con interleukina-4 para estudios de la expresión de receptores de la artritis reumatoide,<sup>22</sup> en conjugados con estreptavidina para estudios de receptores en células linfoides.<sup>23</sup>

El tema del trabajo ha sido abordado extensivamente por diferentes investigadores desde la década de los sesenta, pero en Cuba no se tiene conocimiento de que se haya realizado ningún estudio de este tipo y es aquí donde radica la originalidad del trabajo.

El objetivo de este trabajo consistió en extraer, purificar y caracterizar parcialmente la C-ficocianina-620 de la microalga *Spirulina platensis* para indagar en las características bioquímicas y moleculares de esta ficobiliproteína.

## MATERIALES Y METODOS

### Biomasa utilizada

*Spirulina platensis*.

### Procedimiento de extracción de ficobiliproteínas

Una biomasa de *Spirulina platensis* de 200 g fueron equilibrados a

pH neutro. La extracción de ficobiliproteínas del crudo de esa biomasa se realizó por la técnica de congelación y descongelación a -20 °C siguiendo los criterios de Cabranes.<sup>24</sup> El crudo de ficobiliproteínas obtenido fue centrifugado a 10 000 g, a 10 °C por 20 min y filtrado a través de membranas fibra de vidrio Sartorius modelo FG-11, para eliminar contaminantes naturales, según Lagomasino.<sup>25</sup> El filtrado resultante de ficobiliproteínas libre de contaminantes fue dispuesto para el proceso de purificación.

A cada extracción de los procesos de congelación y descongelación se les determinó la concentración de proteínas totales mediante el método de Bradford<sup>26</sup> modificado por Macart y Gerbaut.<sup>28</sup> Además, se les determinó la concentración de ficocianina y aloficocianina, siguiendo las ecuaciones cromáticas de Beer y Eshel,<sup>27</sup> las muestras fueron almacenadas a 4 °C hasta su utilización, con adición de sales de azida sódica a 0,03 %.

### Purificación del hexámero ( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub> de C-ficocianina

El hexámero de C-ficocianina fue purificado en el sistema cromatográfico automatizado BioPilot de Pharmacia (Suecia) por cromatografía de intercambio iónico en gel DEAE Sepharosa Fast Flow, Pharmacia (Suecia), partiendo de 50 mL (pH 7,2) del crudo obtenido de la primera extracción líquida por el método de congelación-descongelación.<sup>24</sup> Se utilizó una columna cromatográfica XK 26/20, la cual fue equilibrada con un regulador de fosfato de potasio (10 mmol/L, pH 7,2, azida sódica 0,03 %).

La elusión se realizó a un flujo de 5 mL/min, por un gradiente salino de 0 a 2,0 mol/L de cloruro de sodio en el mismo regulador fosfato de potasio.<sup>28</sup> La detección de las señales cromatográficas por el sistema BioPilot, se realizó a una longitud de onda de 280 nm.

A las fracciones cromatográficas colectadas se les determinó la concentración de proteínas totales<sup>26</sup> y de ficobiliproteínas por las ecuaciones cromáticas de Beer y Eshel.<sup>27</sup>

Las fracciones F<sub>1</sub>( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub> y agregado se diluyeron en el regulador de fosfato de potasio (10 mmol/L, pH 7,2) y se concentraron por ultrafiltración con presión positiva de nitrógeno (< 340 kPa) en el concentrador, Amicom (Holanda) y membranas de nitrato de celulosa del tipo YM-100. Ambos concentrados se les realizó un barrido entre 400 y 700 nm según Glazer y Fang<sup>1</sup> en espectrómetro UV

Ultravioleta-Plus, Pharmacia (Suecia). Posteriormente, los concentrados fueron almacenados a 4 °C.

Para eliminar los posibles contaminantes que quedan adsorbidos inespecíficamente a la columna de DEAE Sepharosa Fast Flow, Pharmacia (Suecia) y para su regeneración se procedió a su higienización *in situ* según Lagomasino<sup>25</sup> y Lagomasino y col.<sup>29</sup> La calidad de la columna limpia de contaminantes fue analizada con Coomassie G.<sup>30</sup>

### Control de la calidad del proceso cromatográfico de purificación del hexámero de C-ficocianina mediante electroforesis

A las fracciones F<sub>1</sub>( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub> y agregado obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico y a las fracciones alfa y beta colectadas durante la filtración en gel, previamente desalinizadas, concentradas y equilibradas a pH 7,2, se les realizó una electroforesis programada en el sistema automatizado PhastSystem con geles Phastgel heterogéneos, Pharmacia (Suecia) con un gradiente de un 8 a un 25 % de poliacrilamida.

El sistema regulador empleado fue acetato de sodio (0,11 mol/L) y Tris (0,11 mol/L), a pH 6,4. El regulador del electrodo estuvo formado por bandas de agarosa al 2 % para electroforesis, embebidas con L-alanina 0,88 mol/L y Tris 0,25 mol/L a pH 8,8. Las muestras se aplicaron a una concentración del orden de 50 µg/mL.

En este procedimiento electroforético se utilizaron las disoluciones: fijadora de ácido tricloroacético 20 %; de lavado 1. etanol (50 %) y ácido acético (10 %), 2. etanol (10 %) y ácido acético (5 %); sensibilizadora de glutaraldehído (32 %). Se prosiguió con agua destilada para lavar. Se desarrolló la tinción con nitrato de plata (0,5 %).<sup>31</sup> Se continuó con las disoluciones de lavado 3. carbonato de sodio (12,5 %) y formaldehído (0,2 %) y 4. ácido acético (5 %).

### Control de la calidad del proceso cromatográfico de purificación del hexámero de C-ficocianina mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión

Se trabajó con una columna de filtración en gel, con gel de sílice, del tipo TSK-G3000SW (4,6 × 300) mm, Toyo Pearl (Japón), en el sistema HPLC (LKB). El volumen de muestra aplicado fue de 50 mL, de los cuales 20 mL fueron del hexámero de C-ficocianina, 10 mL fueron del estándar interno constituido por la proteína fibronectina (440 kDa) y 20 µL fue-

ron del regulador de fosfato de potasio (10 mmol/L, pH 8,6). El flujo fue de 0,8 mL/min y la detección de las señales cromatográficas por el sistema HPLC (LKB), se realizó a una longitud de onda de 280 nm.

#### Separación de las subunidades alfa y beta del hexámero de C-ficocianina

Se realizó con una disolución reguladora de ácido acético 20 % (v/v) (pH 3,6), a la cual se le añadió lentamente urea (8 mol/L) y 2-mercaptoetanol (10 mmol/L) según Glazer y Fang.<sup>1</sup> Posteriormente, se agregaron 20 mL del concentrado de la fracción  $F_1(\alpha\beta)_6$  (1 mg/mL de ficocianina) desalinizada a 20 mL de la disolución reguladora (pH 3,6).

#### Purificación de las subunidades alfa y beta del hexámero de C-ficocianina

El proceso de purificación se desarrolló a partir de 11 mL de muestra en el sistema cromatográfico automatizado FPLC por filtración en gel, con gel Superdex-75, Pharmacia (Suecia) y una columna cromatográfica XK 26/100 con un diámetro de 2,6 cm y una altura de 90,0 cm. La columna se equilibró con disolución reguladora (pH 3,6), a un flujo de 0,65 mL/min. La elución se llevó a cabo a través de un flujo constante de 0,55 mL/min y la detección de las señales cromatográficas, se realizó a una longitud de onda de 280 nm.

A las fracciones  $\alpha$  y  $\beta$  obtenidas, se les determinó la concentración de proteínas totales según Bradford.<sup>25</sup> Ambas fracciones fueron lavadas individualmente en el concentrador, Amicom (Holanda) con membranas de nitrato de celulosa del tipo PM-10 y con sucesivos volúmenes del regulador de fosfato de potasio (10 mmol/L, pH 7,2) y concentradas hasta obtener finalmente, 1 mg de proteínas por mililitro en cada una. Posteriormente, fueron conservadas a 4 °C.

#### Determinación del peso molecular del hexámero de C-ficocianina y sus subunidades

Con el auxilio de la electroforesis en gel de poliacrilamida (8 a un 25 %) antes mencionada y utilizando como jue-

go de patrones de Pharmacia (Suecia) las proteínas siguientes: citocromo c (12,5 kDa), quimotripsinógeno (25,0 kDa), ovalbúmina (45,0 kDa), BSA (68,0 kDa), aldolasa (158,0 kDa), catalasa (240,0 kDa), ferritina (450,0 kDa), se determinó el peso molecular del hexámero de C-ficocianina y de las subunidades alfa y beta, según el método de Ferguson modificado por Hames y Rickwood.<sup>32</sup>

#### Determinación de la actividad específica

Se determinó para el hexámero de C-ficocianina en el crudo, en la fracción  $F_1(\alpha\beta)_6$  obtenida por cromatografía de intercambio aniónico y en la fracción concentrada, por el criterio de Glazer y Hixon ( $A_{630}/A_{280} > 4$ ).<sup>33</sup>

#### Cálculo del rendimiento

Con el objetivo de determinar el contenido de ficocianina obtenido durante la cromatografía de intercambio aniónico, con respecto a la concentración de ficocianina presente en el crudo de partida, se calculó el rendimiento al finalizar la corrida cromatográfica por la ecuación siguiente:

$$R = \frac{M_{ff}}{M_{tfc}} \cdot 100 \quad (\%)$$

donde:

$M_{ff}$  masa de ficocianina en la fracción  $F_1(\alpha\beta)_6$ .

$M_{tfc}$  masa total de ficocianina en el crudo.

## RESULTADOS Y DISCUSION

#### Método de extracción de ficobiliproteínas

El volumen obtenido de la primera extracción líquida por el método de congelación-descongelación,<sup>24</sup> representó un crudo bastante rico en el pigmento-proteína de interés, la ficocianina, al ser el contenido de ésta superior al de aloficocianina (Tabla 1). Por lo tanto, la ficocianina constituye la cromoproteína predominante en el crudo dispuesto para el proceso de su purificación.

En el barrido (Fig. 1) realizado a dicho crudo se observó una señal correspondiente a la ficocianina (621 nm) que solapó la señal de la aloficocianina (650 nm). Además, aparecieron otras señales relacionadas con la clorofila a (420, 435, 675 nm) y con los carotenoides (460 a 500 nm).

#### Purificación del hexámero de $(\alpha\beta)_6$ de C-ficocianina

Al inyectar los 50 mL del crudo a la columna cromatográfica de DEAE Sepharosa Fast Flow, apareció en la parte superior de ésta, una franja color azul intenso debido a la adsorción de la ficocianina y aloficocianina a la columna cromatográfica. Inferior a esta franja se observó otra más ancha de color amarillo-verdoso debido a la presencia de clorofila y carotenos.

Una parte de la franja amarillo-verdosa, debido a la presencia de clorofila-a, descendió con el regulador de fosfato de potasio (10 mmol/L, pH 7,2)

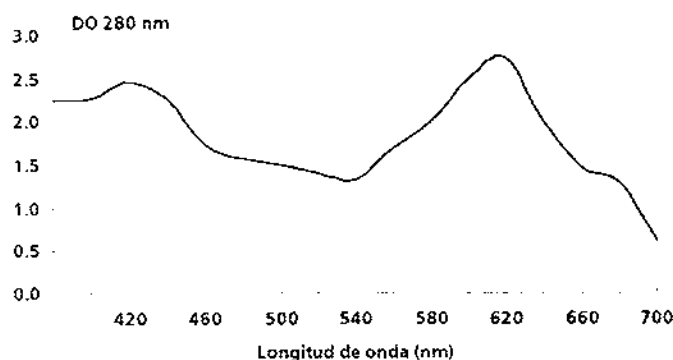


Fig. 1. Barrido de 400 a 700 nm de longitud de onda del crudo obtenido por el método de extracción de ficobiliproteínas por congelación-descongelación a -20 °C, para el proceso de purificación del hexámero de C-ficocianina.

Tabla 1. Crudo formado por la mezcla de los cinco volúmenes de las primeras extracciones obtenidas por el método de congelación-descongelación a -20 °C según Cabranes.<sup>24</sup>

|       | Volumen (mL) | Concentración de proteínas (mg/mL) | Proteínas totales (mg) | Concentración de ficocianina (mg/mL) | Ficocianina total (mg) | Concentración de aloficocianina (mg/mL) | Aloficocianina total (mg) |
|-------|--------------|------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------|---------------------------|
| Crudo | 2 520        | 1,563                              | 3 938,760              | 0,522                                | 1 315,400              | 0,099                                   | 251,50                    |

y la parte restante, correspondiente a los carotenoides, descendió una vez que se inyectaron los reguladores de la elusión. De esta forma, se obtuvieron las primeras fracciones.

La franja azul intenso se desdobló en una azul oscura, relacionada con la presencia del hexámero de C-ficocianina, la cual descendió en tercer lugar y en otra de color azul más pálido, debido a la aloficocianina, que descendió posteriormente.

En el cromatograma (Fig. 2) obtenido por cromatografía de intercambio iónico, se observó una señal cromatográfica independiente que se relacionó con la fracción del hexámero de C-ficocianina, representado por la fracción  $F_1(\alpha\beta)_6$ , con un tiempo de retención de máxima absorbancia de 217 min y además, otra señal cromatográfica representada como fracción agregado, donde se encuentran la aloficocianina mayoritariamente y de manera minoritaria, agregados inseparables de ficocianina y aloficocianina según Mac Coll y col.<sup>13</sup> y Mac Coll y Berns.<sup>14</sup> También aparecieron otras señales cromatográficas, una correspondiente a proteínas no adsorbidas y cloro-

fila-a [Fig. 2(1)], otra a proteínas no adsorbidas y carotenoides [Fig. 2(2)] y otra perteneciente a proteínas fuertemente retenidas en la columna [Fig. 2(3)].

Las concentraciones de ficocianina y aloficocianina de las fracciones  $F_1(\alpha\beta)_6$  y agregado (Tabla 2), estimados por Beer y Eshel,<sup>27</sup> mostraron que la fracción  $F_1(\alpha\beta)_6$  sólo presentaba ficocianina, lo que se evidenció a través del barrido de 400 a 700 nm de longitud de onda de esta fracción (Fig. 3), en el cual apareció una sola señal a 620 nm correspondiente al hexámero de C-ficocianina.

Con respecto a la fracción agregado (Tabla 2), la concentración de aloficocianina fue mucho mayor que la concentración de ficocianina (Fig. 4), pues se observó una señal a una longitud de onda de 650 nm, debido a la presencia de aloficocianina y una meseta alrededor de los 620 nm, representada por la ficocianina que forma el agregado con la aloficocianina.

La actividad específica de la ficocianina en el crudo (Tabla 3) fue de 0,009 8, lo que evidenció la presencia de esta cromoproteína muy con-

taminada. La actividad específica de la ficocianina en la fracción  $F_1(\alpha\beta)_6$  (a tiempo cero) fue de 0,52, debido a la existencia de fragmentos de ácidos nucleicos, polifenoles y otros contaminantes de esta cianobacteria,<sup>34,35</sup> por lo tanto, una vez que esta fracción se comenzó a concentrar por ultrafiltración, se eliminaron los polifenoles y fragmentos de ácidos nucleicos presentes,<sup>34,35</sup> alcanzándose a los 120 min una actividad específica de 5,1, donde la ficocianina se encontraba libre de contaminantes.<sup>32</sup>

En el proceso de concentración de la fracciones  $F_1(\alpha\beta)_6$  y agregado, también fueron eliminadas en el líquido de salida del concentrador, la clorofila-a y las sales, como resultado del proceso de elusión por gradiente discontinuo de cloruro de sodio, que afecta la movilidad de las proteínas en la electroforesis, al producir los iones sodio un arqueado de banda catódico.<sup>36</sup> Por lo tanto, ambas fracciones después de dicho tratamiento, quedaron desalinizadas y equilibradas a pH 7,2.

El rendimiento de esta etapa de purificación fue del 85 %, o sea, que se recuperó en la fracción  $F_1(\alpha\beta)_6$  el

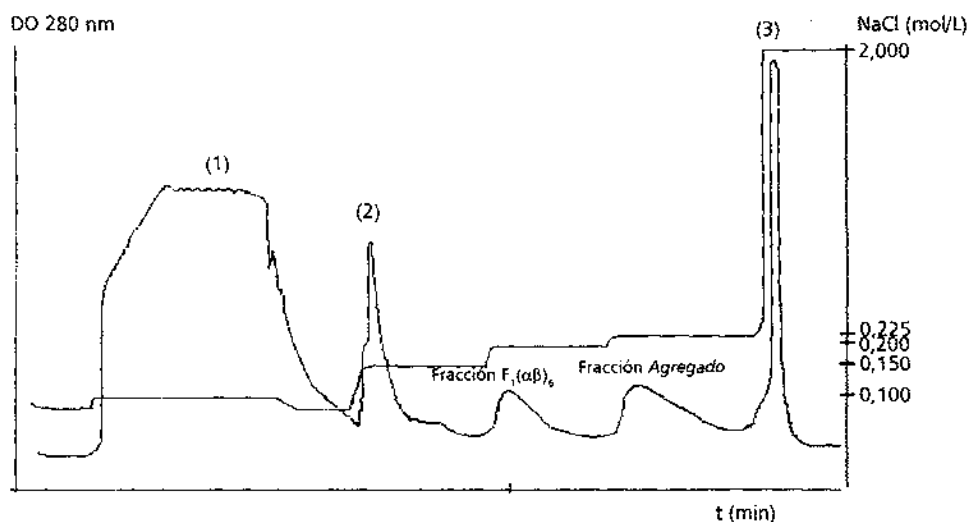


Fig. 2. Perfil de la cromatografía de intercambio aniónico con gel DEAE Sepharosa FF en una columna XK 26/20 con una altura de 10,0 cm. Se aplicaron 50 mL de muestra equilibrada a pH 7,2. La elusión se realizó con gradiente salino incrementado desde 0 hasta 2,0 mol/L, a un flujo de 5 mL/min.

Tabla 2. Fracciones colectadas durante la cromatografía de intercambio aniónico del crudo obtenido en el proceso de extracción por el método de congelación-descongelación a -20 °C según Cabranes,<sup>24</sup> en una columna XK 26/20 y con 50 mL de gel DEAE Sepharosa FF.

|                                  | Volumen<br>(mL) | Concentración<br>de proteínas<br>(mg/mL) | Proteínas<br>totales<br>(mg) | Concentración<br>de ficocianina<br>(mg/mL) | Ficocianina<br>total<br>(mg) | Concentración<br>de aloficocianina<br>(mg/mL) | Aloficocianina<br>total<br>(mg) |
|----------------------------------|-----------------|------------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------|
| Crudo                            | 50,000          | 1,563                                    | 78,150                       | 0,522                                      | 26,100                       | 0,099                                         | 4,990                           |
| Fracción<br>$F_1(\alpha\beta)_6$ | 114,000         | 0,249                                    | 28,420                       | 0,194                                      | 22,190                       | -0,005                                        | -                               |
| Fracción<br>agregado             | 96,000          | 0,100                                    | 9,630                        | 0,037                                      | 3,560                        | 0,044                                         | 4,240                           |

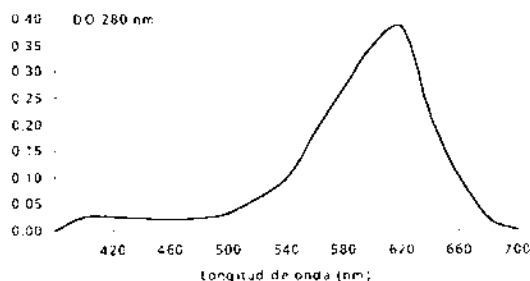


Fig. 3. Barrido de 400 a 700 nm de longitud de onda de la fracción  $F_1(\alpha\beta)_6$ , obtenida por cromatografía de intercambio aniónico con gel DEAE Sepharosa FF, en una columna XK 26/20, con una altura de 10,0 cm.

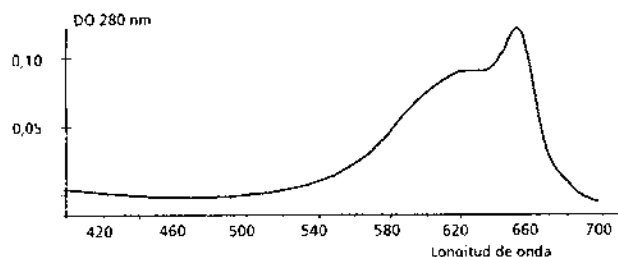


Fig. 4. Barrido de 400 a 700 nm de longitud de onda de la fracción agregado, obtenida por cromatografía de intercambio aniónico con gel DEAE Sepharosa FF, en una columna XK 26/20, con una altura de 10,0 cm.

Tabla 3. Actividad específica de la fracción  $F_1(\alpha\beta)_6$  colectada durante la cromatografía de intercambio aniónico y de sus concentrados obtenidos con membranas de nitrato de celulosa del tipo YM-100.

|                                      | Fracción $F_1(\alpha\beta)_6$ |       | Concentrados |       |      |
|--------------------------------------|-------------------------------|-------|--------------|-------|------|
| Tiempo de concentración (min)        | 0                             | 30    | 60           | 90    | 120  |
| Concentración de ficocianina (mg/mL) | 0,194                         | 0,252 | 0,425        | 0,821 | 1,05 |
| Actividad específica                 | 0,52                          | 1,8   | 2,2          | 4,7   | 5,1  |

Actividad específica del crudo es de 0,009 8.

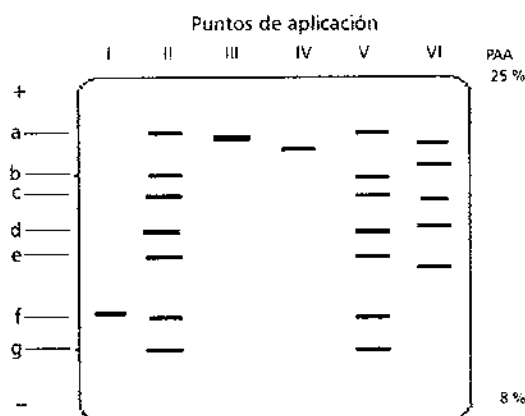


Fig. 5. Representación de la electroforesis nativa realizada a las fracciones  $F_1(\alpha\beta)_6$  y agregado obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico y a las fracciones  $\alpha$  y  $\beta$  obtenidas por filtración en gel. Se trabajó en sistema automatizado PhastSystem (Pharmacia) con Phastgel de un 8 a un 25 % de poliácridamida. Puntos de aplicación: I. Fracción  $F_1(\alpha\beta)_6$ , II, V. Patrones (a: citocromo, b: quimotripsinógeno, c: ovoalbúmina, d: BSA, e: aldolasa, f: catalasa, g: ferritina). III. Fracción  $\alpha$ . IV. Fracción  $\beta$ . VI. Fracción agregado.

85 % del contenido total de ficocianina existente en el volumen de muestra inyectado a la columna XK 26/20 por cromatografía de intercambio aniónico.

#### Control de calidad del proceso cromatográfico de purificación del hexámero de C-ficocianina mediante electroforesis

La electroforesis realizada (Fig. 5) mostró para la fracción  $F_1(\alpha\beta)_6$ , una sola y fina banda, correspondiente al hexámero de C-ficocianina, lo que demostró la pureza de este pigmento-proteína en dicha fracción. En la línea perteneciente a la fracción agregado, se encontraron varias bandas debido a la presencia de agregados moleculares de ficocianina y aloficocianina (monómeros-trímeros, dímeros-trímeros y dímeros-hexámeros), así como de otras combinaciones de ellas.

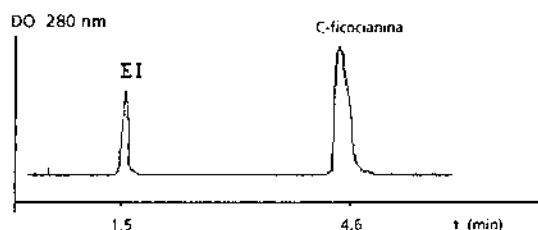
#### Control de calidad del proceso cromatográfico de purificación del hexámero de C-ficocianina mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión

El cromatograma (Fig. 6) presentó una sola y simétrica señal para el hexámero de C-ficocianina, con un tiempo de retención promedio de 4,6 min. El resultado de esta cromatografía, confirmó la pureza de la molécula hexamérica de C-ficocianina, observada en la electroforesis (8 a 25 % de poliácridamida).

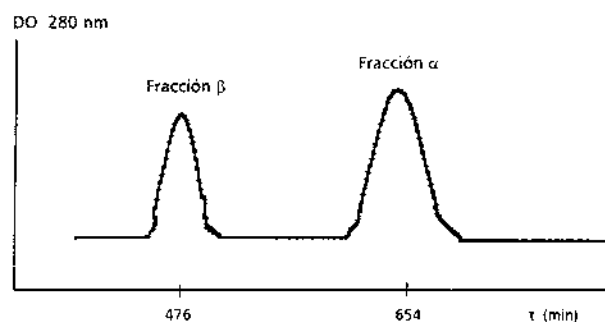
#### Separación y purificación de las subunidades $\alpha$ y $\beta$ del hexámero de C-ficocianina

En el proceso de partición se observaron dos bandas de color azul pálido bien separadas. La banda inferior correspondió a la subunidad  $\beta$ , la cual fue recuperada e indicada como fracción  $\beta$  (Fig. 7) y la banda superior correspondió a la subunidad  $\alpha$ , obteniéndose como última fracción y representada como fracción  $\alpha$ . El tiempo de retención promedio de las subunidades  $\beta$  y  $\alpha$  fue de 476 y 654 min respectivamente. Se determinó para las fracciones  $\alpha$  y  $\beta$  una cantidad de proteínas totales de 2,15 y 2,65 mg respectivamente.

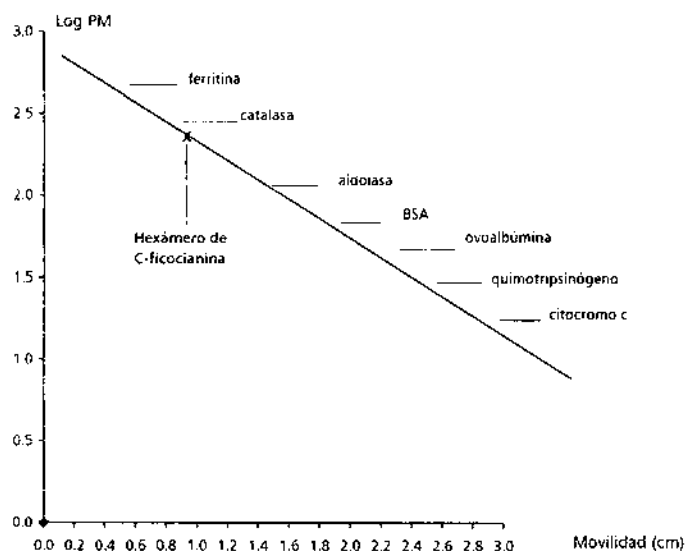
La electroforesis (Fig. 5) mostró para la fracción  $\alpha$ , una sola y delgada banda debido a la presencia de la subunidad  $\alpha$  pura del hexámero de C-ficocianina. De igual forma, para la fracción  $\beta$ , se observó una única y fina banda, correspondiente a la subunidad  $\beta$ , también pura, de dicho hexámero.



**Fig. 6.** Perfil de la Cromatografía Líquida de Alta Presión utilizando una columna de filtración en gel del tipo TSK-G3000SW de (4,6 x 300) mm, con una altura de 30 cm. Se aplicaron 50  $\mu$ L de muestra equilibrada a pH 8,6 y a un flujo de 0,8 mL/min. El estándar interno correspondió a la proteína fibronectina con un peso molecular de 440 kDa.



**Fig. 7.** Perfil de la cromatografía en filtración en gel. Se utilizó como gel Superdex-75 y una columna XK 26/100 con una altura de 90 cm. Se aplicaron 11 mL de muestra equilibrada a pH 3,6 y a un flujo de 0,55 mL/min.



**Fig. 8.** Representación gráfica de la curva patrón, realizada para la estimación del peso molecular del hexámero de C-ficocianina, según la metodología de Ferguson modificada por Hames y Rickwood.<sup>32</sup>

### Determinación del peso molecular del hexámero de C-ficocianina y sus subunidades

La curva de calibración de los patrones de proteínas utilizados para la estimación del peso molecular<sup>32</sup> (Fig. 8), permitió estimar un peso molecular para el hexámero de 229 kDa y para las subunidades alfa y beta de 17,92 y 19,85 kDa respectivamente (Fig. 9).

### CONCLUSIONES

El método de extracción por congelación-descongelación para el aislamiento de la C-ficocianina de *Spirulina platensis*, resulta eficiente en la extracción de ficocianina de la biomasa húmeda.

La electroforesis (8 a 25 % de poliacrilamida) y la Cromatografía Líquida de Alta Presión, de la fracción  $F_1(\alpha\beta)_6$ , evidencian la pureza de la

molécula de C-ficocianina y la selectividad del proceso de purificación por cromatografía de intercambio aniónico.

El método de separación y purificación de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del hexámero de C-ficocianina fue exitoso.

Se logró estimar el peso molecular para el hexámero de C-ficocianina de *Spirulina platensis* (229 kDa), así como para sus subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (17,92 y 19,85 kDa) respectivamente.

### AGRADECIMIENTOS

A José Marcial Lagomasino Rodríguez por sus consejos e ideas, a Amaury Alvarez Cruz por su colaboración en la realización y procesamiento de las figuras.

### BIBLIOGRAFIA

1. Glazer A.N., Fang S. Chromophore Content of Blue-Green Algae Phycobiliproteins. *J. Biol. Chem.*, 248, 659, 1973.
2. Glazer A.N. Phycobiliproteins. *Meth. Enzymol.*, 167, 291, 1988.
3. Glazer A.N. Phycobiliproteins-a family of valuable, widely used fluorophores. *Journal of Applied Phycology*, 6, 105, 1994.
4. Bernard C., Eitenne A.L., Thomas J.C. Synthesis and binding of phycoerythrin and its associated linkers to the phycobilisome in *Rhodospirillum rubrum* (Rhodospirillum). Compared effects of high light and translation inhibitors. *J. Phycol.*, 32, 265, 1996.
5. Algarra P., Thomas J.C., Mousseau A. Phycobilisome heterogeneity in the red alga *Porphyra umbilicalis*. *Plant. Physiol.*, 92, 675, 1990.
6. Findlay J.B.C., Evans W.H. Biological Membranes: A Practical Approach. IRL-Press at Oxford University Press., Oxford, 1987.
7. Tsikos I., Reiss H.D., Orfanidis S., Orologas N. Ultrastructure and supramolecular organization of photosynthetic membranes of some marine red algae. *New-Phytol.*, 133, 543, 1996.
8. Grossman A.R., Apt K.E. Characterization and transcript analysis of the major phycobiliprotein subunit genes from *Aglaothamnion neglectum* (Rhodophyta). *Plant. Mol. Biol.*, 21, 27, 1993.
9. Glazer A.N. Light Guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *J. Biol. Chem.*, 264, 1, 1989.
10. Glazer A.N. Photosynthetic accessory proteins with bilin prosthetic groups. In: *The Biochemistry of Plants. Photosynthesis*. Hatch M.D. and Broadman N.K. (Ed), Academic Press., New York, 8, 51, 1981.
11. Glazer A.N., Apell G.S., Hixon C.S., Bryant D.A., Rinion S., Brown D.M. Biliproteins of Cyanobacteria and Rhodophyta: Homologous family of

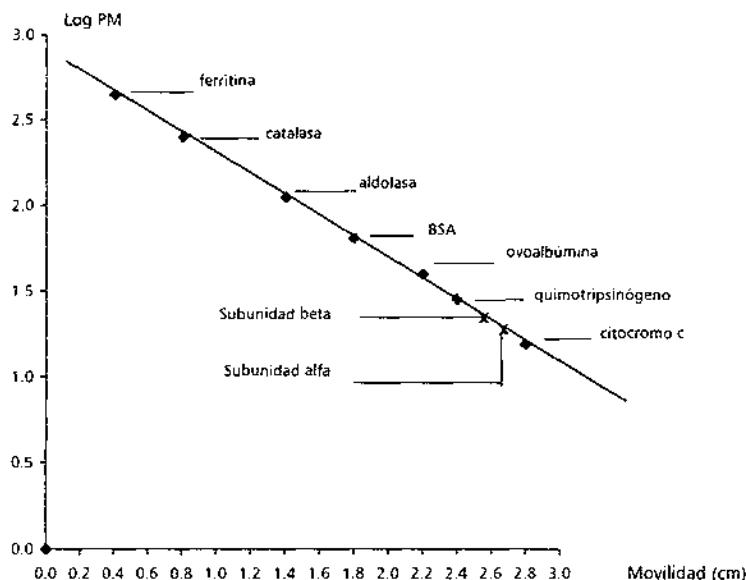


Fig. 9. Representación gráfica de la curva patrón, realizada para la estimación del peso molecular de las subunidades alfa y beta del hexámero de C-ficocianina, según la metodología de Ferguson modificada por Hames y Rickwood.<sup>32</sup>

- photosynthetic accessory pigments. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **73**, 428, 1976.
12. Wilbanks S.M., Glazer A.N. Rod structure of a phycoerythrin II containing phycobilisome. Organization and sequence of the gene cluster encoding the major phycobiliprotein rod components in the genome of marine *Synechococcus* sp. WH8020. *J. Biol. Chem.*, **268**, 1226, 1993.
  13. Mac Coll R., Csatorday K., Berns D.S., Traeger E. Chromophore interactions in allophycocyanin. *Biochemistry*, **19**, 2817, 1980.
  14. Mac Coll R., Berns D.S. Biliproteins: Some relationship among aggregation states, spectra, and excitation-energy transfer. *Isr. J. Chem.*, **21**, 296, 1981.
  15. Tandeau de Marsac N. Chromatic adaptation by cyanobacteria. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Chapter 13, Vol. 7B, Bogoard L. and Vasil J.K. (Ed.), Academic Press Inc., New York, USA, 1991.
  16. Tandeau de Marsac N., Howard J. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: New steps towards molecular mechanisms. *Microbial. Rev.*, **104**, 119, 1993.
  17. Ortega Calvo J.J., Mazuelos C., Hermosin B., Jiménez C. Chemical composition of *Spirulina* and eucaryotic algae products marketed in Spain. *J. Appl. Phycol.*, **5**, 425, 1993.
  18. Kulkarni S.U., Baderker S.S., Oswald J., Kaniat M.Y. Fluorescent phycocyanin from *Spirulina platensis*. Phycocyanin as a fluorescent marker in immunoassays. *Lab. Med. Int.*, junio, 44-47, 1996.
  19. Hooghe J.R., Orms D. Use of the fluorescence activated cell sorter (FACS) for *in vitro* assays of developmental toxicity. *Toxicol. in vitro*, **9**, 349, 1995.
  20. Pattanapanyasat K., Pengruangrojanchai V., Thepthai C., Suwanagool S., Wasi C. Flow cytometric three color determination of CD4 T-lymphocytes on blood specimens from AIDS patients who have a large number of contaminating non-lymphocytes. *Asian-Pac. J. Allergy. Immunol.*, **12**, 105, 1994.
  21. Neilan B.A., Wilton A.N., Jacobs D. A universal procedure for primer labeling of amplicons. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2938, 1997.
  22. Rivas J., Mozo L., Zamorano J., Gayo A., Torre-Alonso J.C., Rodríguez A., Gutiérrez C. Upregulated expression of IL-4 receptors and increased levels of IL-4 in Rheumatoid arthritis patients. *J. Autoimmunity*, **8**, 587, 1995.
  23. Xu X., Mardell C., Xian C. J., Zola H., Read L. C. Expression of functional insulin-like growth factor-1 receptor on lymphoid cell subsets of rats. *Immunology*, **85**, 394, 1995.
  24. Cabranes Y. Aislamiento, purificación y caracterización parcial de la C-Ficocianina-620 obtenida a partir de la *Spirulina platensis*. Trabajo de Diploma, Facultad de Biología. Universidad de la Habana, junio, 1998.
  25. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248, 1976.
  26. Macart M., Gerbaut L. Evaluation of an improved coomassie dye binding method for urinary protein assay. *Clin. Chim. Acta*, **141**, 77, 1984.
  27. Beer S., Eshel A. Determining phycoerythrin and phycocyanin concentration in aqueous crude extracts of red algae. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.*, **36**, 785, 1985.
  28. Lagomasino J.M. Cromatografía de Intercambio Iónico. Informe técnico No. 3, Departamento Química de las Proteínas, Laboratorios BETERA, Ciudad de La Habana, 1991.
  29. Lagomasino J.M., Alvarez A.M., Lagomasino J.A. Contaminantes naturales en ficobiliproteínas de cianobacterias. Informe técnico CB(SP)04. Departamento Química de las Proteínas, Laboratorios BETERA, Ciudad de La Habana, marzo, 1995.
  30. Asryants R.A., Duzsenkova I.V., Magradova N.K. Determination of sepharosa bound protein with Coomassie Brilliant Blue G 250. *Anal. Biochem.*, **151**, 571, 1985.
  31. Pharmacia. PhastSystem. User Manual. Tryckkontakt Press, Uppsala, 1989.
  32. Hames B.D., Rickwood D. Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach. IRL-Press, Oxford, 1987.
  33. Glazer A.N., Hixon C.S. Subunit structure and chromophore composition of *Rhodospirillum rubrum* phycoerythrin. *J. Biol. Chem.*, **252**, 32, 1977.
  34. Johnstone A., Thorpe R. Immunochromatography in Practice. Segunda Edición. Year Book Medical Publishers, Chicago, 1987.
  35. Hong Y.K., Kim S. D., Polne-Fuller M., Gribor A. DNA extraction conditions from *Porphyra perforata* using lithium chloride. *J. Appl. Phycol.*, **7**, 101, 1995.
  36. Görg A. Facts and artifacts in electrophoresis. *Biochem. Soc. Transact.*, **21**, 130, 1993.