

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

**Escuela Politécnica Superior y
Facultad de Ciencias Experimentales**



Área de Química Física

Departamento de Química y Física

**ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA B-FICOERITRINA
PROCEDENTE DEL ALGA ROJA *Porphyridium cruentum* EN
FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA, PARA SU UTILIZACIÓN
COMO COLORANTE NATURAL**

Memoria Trabajo Fin de Grado

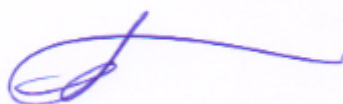
JOSÉ MANUEL SUÁREZ SIERRA

Septiembre 2014

**ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA B-FICOERITRINA
PROCEDENTE DEL ALGA ROJA *Porphyridium cruentum* EN
FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA, PARA SU UTILIZACIÓN
COMO COLORANTE NATURAL**

Memoria del Trabajo Fin de Grado presentada por José Manuel Suárez
Sierra.

Almería, Septiembre de 2014

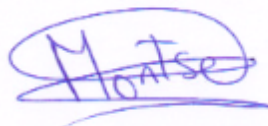


Fdo.: José Manuel Suárez Sierra

Directoras del Trabajo Fin de Grado



Dra. Emilia Ortiz Salmerón
Prof. Titular de Química Física
Universidad de Almería



Dra. Montserrat Andújar Sánchez
Prof. Titular de Química Física
Universidad de Almería

ÍNDICE

Indice	I
Abreviaturas	III
1.- Introducción	1
1.1.- Introducción	
1.2.- Biliproteínas	4
1.3.- B-ficoeritrina de <i>Porphyridium cruentum</i> (BPE)	7
2.- Objetivos y plan de trabajo	11
3.- Materiales y métodos	13
3.1.- Materiales	13
3.1.1.- Reactivos	13
3.1.2.- Instrumentación	13
3.2.- Métodos	14
3.2.1.- Espectroscopía UV-vis	14
3.2.2.- Espectroscopía de fluorescencia	18
3.2.3.- Electroforesis	19
3.2.3.1.- Reactivos	21
3.2.3.2.- Procedimiento	23
3.2.3.3.- Tinción de geles de electroforesis	24
3.2.3.4.- Secado de los geles de electroforesis	25
3.2.3.5.- Cálculo de la masa molecular	25
3.2.4.- Cromatografía de exclusión molecular	26
4.- Resultados y Discusión	29
4.1.- Concentración y purificación de la BPE	29
4.2.- Tratamiento térmico	32

4.2.1.- Esterilización lenta	32
4.2.1.1.- Ausencia de azúcares	34
4.2.1.2.- Presencia de azúcares	37
4.2.2.- Esterilización rápida	40
5.- Conclusiones	43
6.- Bibliografía	45

ABREVIATURAS

- A₂₈₀ – Absorbancia a 280 nm
A₄₉₈ – Absorbancia a 498 nm
A₅₄₀ – Absorbancia a 540 nm
A₅₆₅ – Absorbancia a 565 nm
APC – Aloficocianina
BPE – B-ficoeritrina
b-PE – b-ficoeritrina
CPE- C-ficoeritrina
 λ - Longitud de onda
 ϵ – Coeficiente de extinción molar
EU – Unión Europea
FDA - Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos
FPLC – Fast Protein Liquid Chromatography
Da– Dalton
mA – miliamperios
 μ L – microlitros
mL – mililitros
nm – nanómetros
PAGE – Electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS – Ficobilisoma
PC – Ficocianina
PCB – Ficocianobilina
PE – Ficoeritrina
PEB – Ficoeritrobulina
PEC – Ficoeritrocianina
PUB – Ficourobilina
PXB – Ficobioviolina
R_f – Movilidad relativa
RPC- R-ficocianina
RPE – R-Ficoeritrina
SDS– Dodecil sulfato sódico
TEMED–N,N,N',N'-tetrametilendiamida

UV – Ultravioleta

UV-vis– Ultravioleta-visible

1.-INTRODUCCIÓN

1.1.-- Introducción

Los elementos que definen las características de un alimento son principalmente su textura, sabor y apariencia. El atributo que más influye en el consumidor a la hora de aceptar o rechazar un alimento es su apariencia, fundamentalmente el color. Este es el motivo fundamental del uso de colorantes como aditivos en alimentos procesados. Entre los colorantes existentes, encontramos colorantes sintéticos y naturales.

Los colorantes sintéticos son clasificados de acuerdo a diferentes regulaciones a nivel internacional, aunque entre las más conocidas se encuentra la clasificación de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos, FDA ([http://www.fda.gov/ForIndustry/ColorAdditivesinSpecificProducts/InFood/ucm130054 .htm](http://www.fda.gov/ForIndustry/ColorAdditivesinSpecificProducts/InFood/ucm130054.htm)) y la clasificación europea (http://europa.eu/legislation_summaries/other/121068a_es.htm), en la cual además se pueden encontrar los diferentes efectos adversos ocasionados por cada tipo de colorantes generalmente relacionados con reacciones alérgicas o relacionadas con efectos cancerígenos (Ayyagari y col., 1995; Arad & Yaron, 1992). A pesar de todo lo anterior, su uso está ampliamente difundido en la industria de alimentos debido a que son:

- solubles en agua
- económicos
- permiten la combinación de colores
- estables
- fáciles de usar

En la siguiente tabla se muestran los principales colorantes sintéticos utilizados en la industria de alimentos, permitidos en Estados Unidos y en la Unión Europea:

Introducción

Tabla 1. Principales colorantes sintéticos utilizados en la industria alimentaria

Nombre	Color	Aprobado	Comentarios
FD&C Blue # 1	Azul Brillante	FDA, EU	Reacciones alérgicas
FD&C Blue # 2	Azul – rojizo	FDA, EU	Pobre solubilidad en agua
FD&C Green #	Verde mar	FDA, EU	Reacciones alérgicas
FD&C Red # 3	Rojo cereza	FDA, EU	Puede ser cancerígeno
Red # 5	Rojo sangre	EU	
Red # 6	Rojo - naranja	EU	
FD&C Red # 4	Rojo - naranja	FDA, EU	
FD&C Yellow # 1	Amarillo	FDA, EU	Reacciones alérgicas
FD&C Yellow # 2	Amarillo - naranja	FDA, EU	Reacciones alérgicas

Sin embargo en la actualidad los consumidores se han vuelto mucho más exigentes y han obligado a la industria a buscar otras alternativas que permitan mantener las características atractivas que provocan el color del alimento sin los efectos indeseables de los colorantes sintéticos. Por todo ello, existe una tendencia manifiesta a la utilización de colorantes naturales en diversos sectores industriales (alimentación, cosmética, farmacia, etc.) y a disminuir el uso de colorantes sintéticos, algunos de los cuales, como ya se ha comentado anteriormente, son potencialmente cancerígenos y buena parte de los mismos, generan reacciones alérgicas. Los colorantes naturales son considerados, en general, compuestos inocuos y las limitaciones en su utilización son menores que las de los colorantes sintéticos. Entre las ventajas que nos proporcionan los colorantes naturales podemos mencionar:

1. Funcionalidad

- Solubles en aceite (annato, caroteno, luteína, paprika, clorofilina)
- Diferentes tonalidades y aromaticidades de un mismo producto (annato, caroteno, carmín, luteína, betabel).
- No presentan migración de color.
- Algunas sustancias poseen propiedades funcionales (luteína, carotenos, antocianinas)

2. Estabilidad

- Ante fermentos lácticos: (carmín, carotenoides, cúrcuma, betabel).
- Temperatura de pasteurización: (caramelo, carmín, carotenos)

- Luz (carmín, caramelo, carotenos)

3. Requisitos legales

- Declaración en etiqueta 100% natural
- No colorantes artificiales
- No alergénicos.
- Productos naturales

Entre los colorantes naturales que proporcionan tonalidades rojas podemos mencionar:

- Carmín
- Betabel
- Antocianinas
- Extractos de vegetales
- Extractos de frutas

Entre los colorantes naturales con tonos verdes se encuentran:

- Clorofila
- Clorofilina
- Espinaca

Tonos azules como colorantes naturales se obtienen de los siguientes compuestos:

- Antocianinas
- Extractos de frutas

Los colorantes naturales que proporcionan tonos café/negro son:

- Carbón vegetal
- Extracto de malta
- Color caramelo

Sin embargo, deben tenerse en cuenta una serie de consideraciones para la buena aplicación de estos productos, entre las que podemos mencionar:

1. La legislación del mercado destino.
2. Color y el aspecto deseado del producto final.
3. Tipo de producto en el cual se aplicará el colorante.
4. Costo-beneficio de la aplicación de este tipo de colorantes.
5. Tipo de colorante a ser utilizado de acuerdo a su funcionalidad.
6. Tipo de presentación del producto

La principal limitación con la que nos encontramos al trabajar con estos productos es que el número de colorantes naturales y su gama de colores son escasos en relación con las necesidades reales de los tipos de industrias que las requieren (alimentación, cosmética, farmacia, etc.).

1.2.- Biliproteínas

Como ya se ha comentado, existe una gran demanda por parte de los consumidores de reemplazar los colorantes sintéticos por compuestos de origen natural, a la que los sectores industriales implicados deben dar respuesta (González-Ramírez y col, 2014). La principal ventaja que muestran los colorantes naturales frente a los sintéticos es que no son tóxicos ni cancerígenos y no generan reacciones alérgicas. Los compuestos naturales obtenidos a partir de organismos vivos, denominados biocolorantes, siguen presentando un uso muy restringido debido a su escasez y a que la mayoría son poco estables frente a las condiciones de tratamiento térmico y conservación.

En este sentido, las biliproteínas poseen diferentes colores muy intensos y atractivos que hacen que estas macromoléculas posean un elevado potencial de utilización como colorantes naturales en amplios sectores, pudiendo reemplazar a los tradicionales colorantes sintéticos (Akhilender y col., 1999). Las biliproteínas más abundantes en la naturaleza son las ficoeritrinas y las ficocianinas. Las ficoeritrinas poseen tonalidades rosas, rojas y anaranjadas, mientras que las ficocianinas poseen colores de la gama de los azules y morados. Por tanto, la gama y la intensidad de colores disponibles, así como la abundancia relativa de estas proteínas en los organismos de procedencia, hacen de estas macromoléculas excelentes candidatos para

Introducción

su empleo como colorantes, constituyendo una alternativa real para el incremento y diversificación de la oferta de colorantes naturales existentes en el mercado.

Las biliproteínas poseen grupos prostéticos tetrapirrólicos de cadena abierta (denominados bilinas), que en su estado funcional se encuentran enlazados covalentemente a residuos de cisteína específicos de la proteína. Se pueden clasificar en función de sus propiedades espectroscópicas en tres grupos: las ficocianinas, las aloficocianinas y las ficoeritrinas. Las propiedades espectroscópicas de las ficobiliproteínas dependen del tipo y el número de bilinas que contienen (Bermejo, Tobaruela, Talaver, Orte & Alvarez-Pez, 2003).

- Las **aloficocianinas** se caracterizan por su color azul con un toque verdoso y su cromóforo es la ficocianobilina (PCB). Poseen un PCB en la subunidad α y otro en la subunidad β .
- Las **ficoeritrinas** se caracterizan por su color rojizo y en estas podemos encontrar dos tipos de bilinas, la ficoeritrobilina (PEB) y la ficourobilina (PUB). Poseen dos o tres bilinas en la subunidad α y tres en la subunidad β .
- Las **ficocianinas** son biliproteínas azules cuyo cromóforo es la ficocianobilina (PCB). Poseen un cromóforo en la subunidad α y dos en la subunidad β . La R-ficocianina es una ficocianina especial que además de PCB posee PEB.

Sólo unas pocas cianobacterias presentan un cuarto grupo de biliproteína conocidas como las ficoeritrocianinas, cuyos cromóforos son PCB y ficobiliviolina (PXB) (Gantt, 1981; Glazer, 1981). En la Tabla 1.2 se muestran los máximos de absorción de las biliproteínas.

Introducción

Tabla 1.2: Máximos de absorción de las biliproteínas.

Biliproteína	λ_{\max} Absorción (nm)
Aloficocianina (APC)	650 (hombro a 620)
Ficocianina (PC)	610-620
Ficoeritrinas (PE)	
B-ficoeritrina (BPE)	498, 540, 565
b-ficoeritrina (BPE)	540, 565
C-ficoeritrina (CPE)	565
R-ficoeritrina (RPE)	495, 536, 564
Ficoeritrocianina (PEC)	568 (hombro a 585)

La estructura de los ficobilisomas está constituida por tres cilindros que conforman el núcleo central cerca de la membrana tilacoide y un conjunto de varillas que parten de este. Entre las biliproteínas que constituyen el ficobilisoma encontramos: las aloficocianinas (APC), cerca de la membrana tilacoidal, las ficocianinas (PC), en el centro, las ficoeritrinas (PE), en la periferia, y las ficoeritrocianinas (PEC).

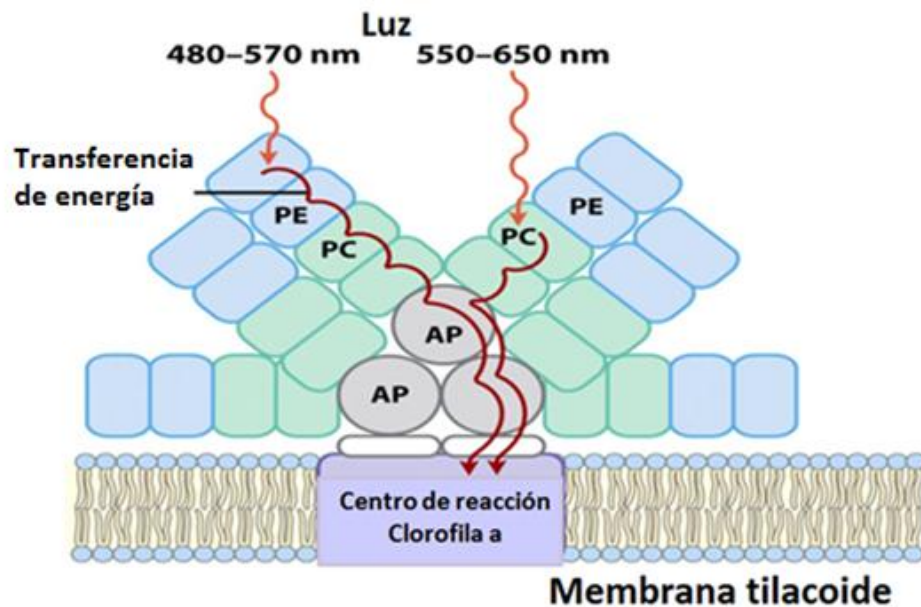


Figura 1.1 Imagen de los ficobilisomas con las abreviaturas del tipo de biliproteínas y su localización. Descripción gráfica de la absorción en cadena de la luz.

Las biliproteínas actúan como accesorios fotosíntéticos y absorben luz en un amplio intervalo de longitudes de onda en la parte visible del espectro, que más tarde

transfieren a la clorofila mediante procesos no radiactivos para que se transforme en energía química (Gantt, 1980; Glazer, 1976; Glazer & Wedemayer, 1995). La transferencia de energía dentro de los ficobilisomas se produce de forma secuencial desde la periferia hasta la clorofila al menos en los casos del alga roja *Porphyridium cruentum* y en el alga azul *Anacystis nidulans* (Figueruelo & Dávila 2004).

Los colorantes preparados a partir de las algas rojas y verdeazuladas pueden ser utilizados en cosméticos, como sombras de ojos, maquillaje para la cara, barras de labios, en forma de polvos o cremas (Arad & Yaron, 1992).

Otras aplicaciones destacables de las ficoeritrinas son la detección de insecticidas organofosforados gracias al desarrollo de biosensores sensibles, rápidos, compactos, portátiles y relativamente baratos (Ayyagari et al., 1995) y su utilización como marcadores fluorescentes de células y macromoléculas en técnicas de fluorescencia (Glazer, 1984).

1.3.- B-Ficoeritrina de *Porphyridium cruentum* (BPE)

El alga roja unicelular *Porphyridium cruentum* es una fuente de biliproteínas entre las que podemos encontrar en cantidades relativas aproximadas: aloficocianinas (APC) (5%), R-ficoeritrinas (R-PE) (11%), b-ficoeritrina (b-PE) (42%) y B-ficoeritrina (B-PE) (42%).

La B-ficoeritrina consta de dos subunidades polipeptídicas diferentes, α y β en una relación estequiométrica 1:1, al igual que ocurre con la C- y R-ficoeritrina. Además, la R- y B-ficoeritrina presentan una tercera subunidad, γ . Las masas moleculares de las cadenas polipeptídicas α y β se encuentran entre 17-20 kDa, mientras que la cadena γ tiene una masa molecular superior, 30 kDa. Estas proteínas están formadas por un complejo heterodimérico llamado monómero ($\alpha\beta$) en forma de trímero ($\alpha\beta$)₃ y en forma de hexámero ($\alpha\beta$)₆, en cuyo caso se encuentra formando un agregado con la subunidad γ .

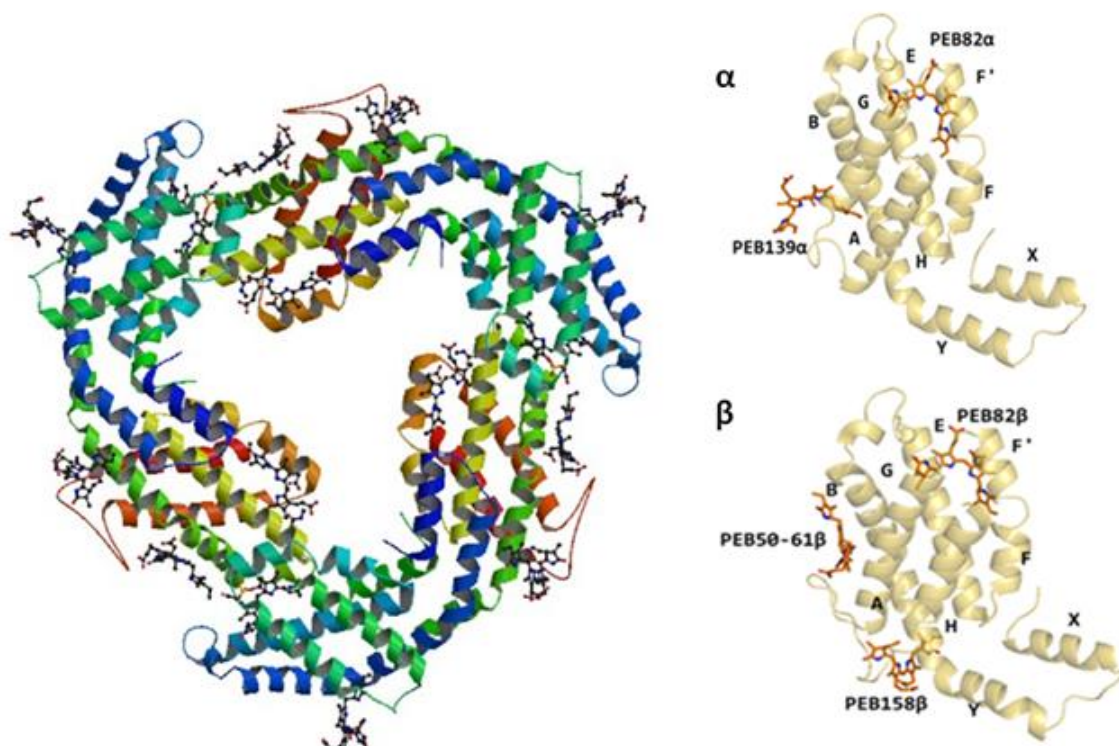


Figura 1.2. En el panel de la izquierda la estructura cristalina de la BPE de *P. Cruentum* a pH 5 (código PDB: 3V58) y en el panel de la derecha la representación de las subunidades α y β . (Cámara-Artigas et al., 2012).

Al tratarse de una ficoeritrina, los espectros de absorción son debidos a los grupos cromóforos; ficoeritrobilina (PEB), que presenta su máximo de absorción entre 540-565 nm, y ficourobilina (PUB), que da lugar a un hombro a 498 nm. La diferencia entre la b-PE y la B-PE se encuentra en que la B-PE presenta un hombro a 498 nm y en la b-PE el hombro no está presente (Glazer & Hixson, 1977; Ficner & Huber, 1993).

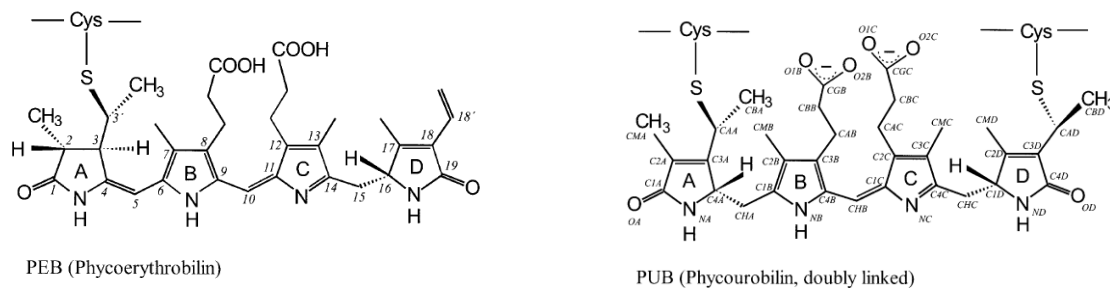


Figura 1.3.- Estructura de los bilinas PEB (ficoeritrobilina) y PUB (ficourobilina).

La B-ficoeritrina presenta dos ficoeritrobulinas (PEB) en la subunidad α y tres en la subunidad β , mientras que la subunidad γ presenta dos ficoeritrobulinas (PEB) y dos ficourobilinas (PUB). Comparando con la ficourobilina, la ficoeritrobilina tiene un

Introducción

enlace doble adicional entre los anillos A y B. La presencia de PUB en la subunidad γ aumenta el rango de luz visible que puede ser absorbida por las algas rojas. En la Tabla 1.3 se muestran los cromóforos y los máximos de absorción de cada una de las subunidades que constituyen la BPE.

Tabla 1.3.- Cromóforos y λ_{max} de absorción de cada una de las subunidades que constituyen la B-PE.

Subunidad BPE	Cromóforos	λ_{max} Absorción (nm)
Subunidad α	2 grupos PEB	540-565
Subunidad β	3 grupos PEB	540-565
Subunidad γ	2 grupos PEB	540-565
	2 grupos PUB	498

Para que estas proteínas se puedan utilizar como colorantes, han de mantenerse estables tras el proceso de esterilización. Este procedimiento es necesario para eliminar los microorganismos que puedan ser dañinos para el ser humano. Por tanto, el principal objetivo de este trabajo, es encontrar las condiciones adecuadas que eviten la pérdida de color durante estos procesos que implican elevadas temperaturas.

Para comprobar que son estables en dichas condiciones se evalúan las propiedades ópticas responsables del color de la proteína. Para dicha evaluación se estudia la variación de estas propiedades a diferentes temperaturas y tiempos de incubación en presencia y ausencia de azúcares. En la industria alimentaria, son comunes dos procesos de esterilización (Martelli, Folli, Visai, Daglia & Ferrari, 2014), que utilizaremos en nuestros estudios, analizando la idoneidad de cada uno de ellos.

- **Esterilización rápida.** Consiste en mantener el alimento a 100°C un corto periodo de tiempo (en torno a 1 min.)
- **Esterilización lenta.** Se incuba el alimento a 80°C durante un largo periodo de tiempo (entre 30 minutos y 1 hora).

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es estudiar la estabilidad de la BPE de *Porphyridium cruentum* en función de la temperatura y tiempo de incubación, en presencia y ausencia de diferentes azúcares, con objeto de poder ser utilizada como colorante natural en la industria alimentaria.

Plan de trabajo

Para poder conseguir el objetivo establecido, el plan de trabajo se ha centrado en las siguientes tareas:

- 1.- Eliminar impurezas de la muestra suministrada, y obtener la proteína con un alto grado de pureza.
- 2.- Concentrar y dializar la proteína.
- 3.- Incubar la proteína a diferentes temperaturas y tiempos de incubación en presencia y ausencia de azúcares.
- 4.- Estudiar la estabilidad de la proteína en todas las condiciones anteriores mediante espectroscopía UV-Vis, fluorescencia, electroforesis y FPLC.
- 5.- A partir de los datos obtenidos, establecer las mejores condiciones, para poder utilizar la proteína como colorante natural en el sector alimentario.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Materiales

3.1.1.- Reactivos.

- Cloruro sódico: MERCK
- Acrilamida/ Bis-acrilamida: SIGMA-ALDRICH
- Trizma: SIGMA
- N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina: - Ridel de-Haën
- Glicerol: PANREAC
- SDS: FLUKA
- B-mercaptoetanol: MERCK
- Azul de bromofenol: MERCK
- Glicina: MERCK
- Metanol: PANREAC
- Ácido acético: MERCK
- Persulfato amónico: SERVA
- Hidróxido sódico: PANREAC
- Ácido clorhídrico: PANREAC
- Fosfato sódico monobásico: MERCK
- Fosfato sódico dibásico: MERCK
- Glucosa: MERCK
- Sacarosa: MERCK
- Maltosa: MERCK

3.1.2. Instrumentación.

- Espectrofluorímetro, Marca Jasco Inc., modelo FP-6500

- Espectrofotómetro, Marca Perkin Elmer, modelo Lambda 25
- FPLC, Marca AKTA, modelo Prime Plus
- Centrífuga, Marca Heraeus, modelo habofuge 400 function line
- Equipo de electroforesis, Marca Mini-Protean Tetra Cell, modelo Bio-Rad
- Columna para FPLC, marca Superdex, modelo 75
- Colector de fracciones, Marca Amershan Biosciences, modelo Frac100
- pH metro, Marca Crison, modelo micro-pH 2000
- Balanza de precisión, Marca Mettler
- Filtros para disoluciones, Marca Milipore
- Concentradores, Marca Centriped-30

3.2. Métodos

3.2.1. Espectroscopía UV-visible

La Espectroscopía de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis) es una técnica instrumental muy utilizada, en la que se estudia la absorción por parte de la materia de las radiaciones comprendidas en las zonas UV y visible del espectro electromagnético. La absorción selectiva de radiación produce el espectro de absorción, que proporciona información fundamental para la determinación de la composición química, la estructura y las propiedades de la materia.

Las interacciones electromagnéticas con la materia provocan la absorción o emisión de energía a través de la transición de los electrones entre niveles cuánticos o discretos de energía, vibraciones de enlaces, rotaciones moleculares y transiciones de electrones entre orbitales atómicos y moléculas. Las energías implicadas en los tránsitos electrónicos corresponden a la absorción de fotones en la región visible (400-750 nm) y ultravioleta (200-400 nm) del espectro electromagnético.

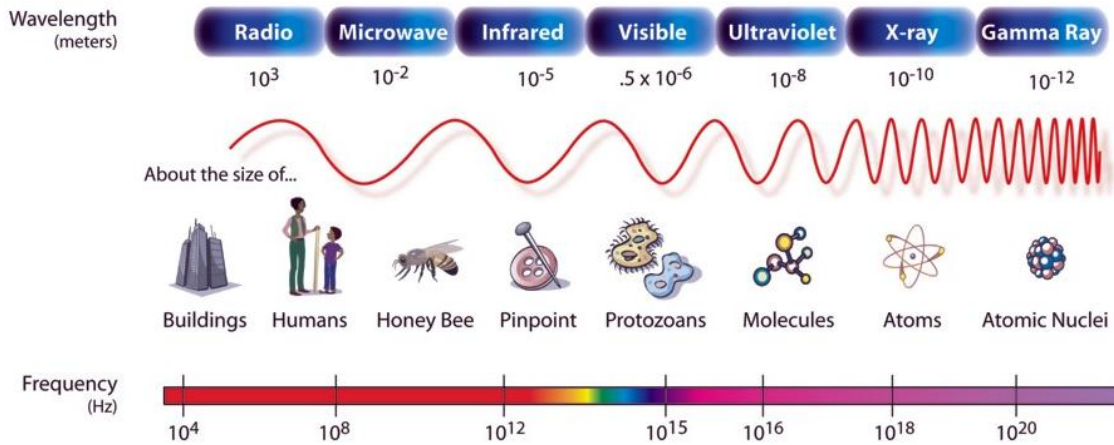


Figura 3.1.- Espectro electromagnético.

Los espectrofotómetros son los equipos encargados de registrar estas interacciones y generar espectros que permiten el estudio de la longitud de onda y la intensidad de la radiación absorbida o emitida por la muestra analizada. El espectro de absorción es propio de cada especie, ya que la diferencia de energía entre los distintos niveles de energía para cada especie es característica de la misma.

Los componentes clave de un espectrofotómetro son:

- Una fuente de luz: Dos son las fuentes más utilizadas. La primera, la lámpara de arco de deuterio, produce un buen continuo de intensidad en la región del UV, y ofrece una intensidad muy útil en la región del visible. La segunda, la lámpara halógena de wolframio, ofrece una buena intensidad en parte del espectro UV y sobre el rango visible completo.
- Un dispositivo de dispersión: Selecciona una longitud de onda particular de la radiación de la fuente.
- Compartimento de muestra.
- Un detector: Convierte la señal de luz en una señal eléctrica. Debe ofrecer una respuesta lineal en un amplio rango, con bajo ruido y alta sensibilidad. Un espectrofotómetro puede estar formado por uno o más detectores.

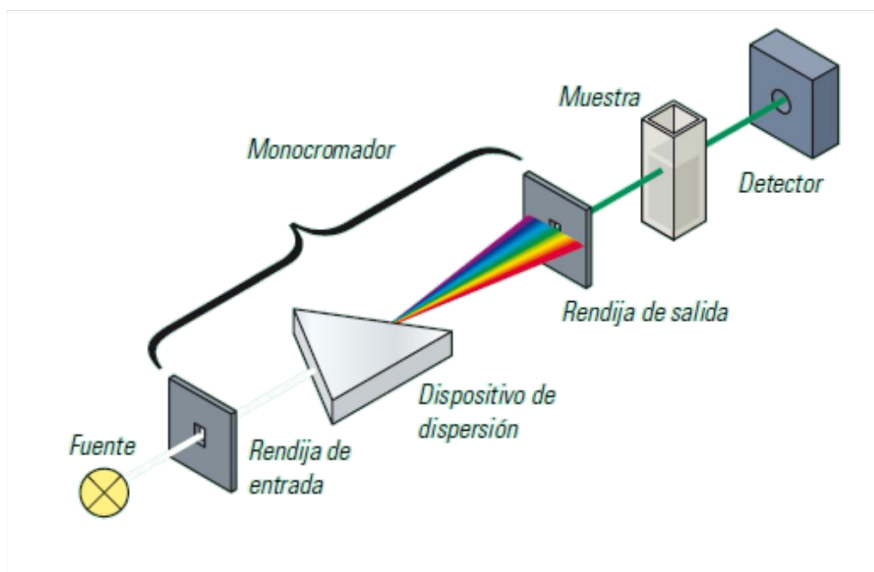


Figura 3.2.- Esquema de un espectrofotómetro convencional.

La medida de la absorción de la luz mediante un espectrofotómetro se utiliza para detectar e identificar moléculas y para medir su concentración en disolución. La luz incidente absorbida por una disolución a una longitud de onda determinada está relacionada con el espesor de la capa absorbente y con la concentración de la especie absorbente. Estas dos relaciones están combinadas en la ley de Lambert-Beer.

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

A = Absorbancia
 ε = coeficiente de absorción molar
 b = ancho de la cubeta
 c = concentración

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

A = Absorbancia
 I_0 = intensidad de la luz incidente
 I = intensidad de la luz transmitida

El espectro de los aminoácidos es determinado por la naturaleza de sus cadenas laterales, ya que los aminoácidos no absorben luz en la región del visible y, por ello, la mayoría de las proteínas son incoloras. Sin embargo, en el caso de la BPE se encuentran presentes una serie de cromóforos que le confieren su color rojo característico. Los cromóforos se pueden encontrar a 498 nm, 540 nm y 565 nm.

Un perfil típico de un espectro de esta proteína se encuentra en la figura 3.3 donde se representa la absorbancia frente a la longitud de onda.

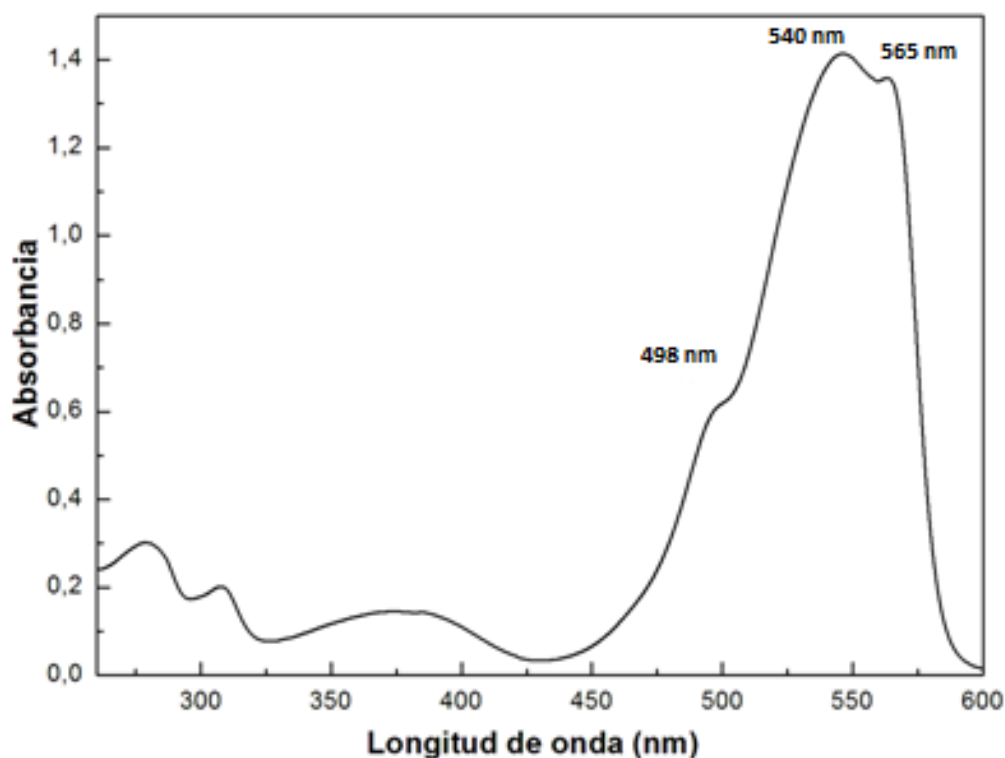


Figura 3.3.- Espectro ultravioleta visible de la BPE de *Porphyridium cruentum*. El tampón utilizado fue fosfato sódico 0.02 M a pH 7. Para la obtención del espectro se han utilizado cubetas de cuarzo de un centímetro de paso de luz.

A partir de su valor de absorbancia a 540 nm se puede conocer su concentración, ya que existe una relación directa entre la absorción y la concentración de la muestra. Para ello se aplican las siguientes ecuaciones (Bennett & Bogorad, 1973; Bryant, Guglielmi, Tandeu de Marsac, Castets & Cohen-Bazire, 1979; Bermejo Román, Alvarez-Pez, Ación Fernández & Molina Grima, 2002)

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

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

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

A la hora de escoger la muestra a analizar se mide la pureza. La pureza de las muestras se determina estudiando la relación entre la absorbancia a 540 nm y a 280 nm. Una relación mayor a 4 es indicativo de una elevada pureza.

3.2.2. Espectroscopía de fluorescencia.

La energía de la luz absorbida en un proceso de absorción promueve los electrones de la molécula desde un nivel de energía a otro de energía superior (o estado excitado). Esta energía absorbida se pierde mediante diversos mecanismos, en forma de energía térmica debido a la colisión con otras moléculas o mediante transferencia de esa energía mediante resonancia. En algunos casos se produce el fenómeno de la fluorescencia. La fluorescencia de emisión se observa gracias a la emisión de energía radiante que se produce cuando los electrones pasan de un estado excitado a su estado inicial. Cuando una molécula absorbe luz y excita los electrones a un estado de energía mayor, estos tienden a volver a su estado inicial, sin embargo, la energía emitida es inferior (mayor longitud de onda) a la energía absorbida. La espectroscopía de fluorescencia se ve afectada por una gran cantidad de factores ambientales, que hacen de la fluorescencia una técnica más sensible. En el análisis de macromoléculas esta técnica puede aportar información acerca de la conformación, los lugares de enlace, las interacciones con el disolvente, el grado de flexibilidad, las distancias intermoleculares y del coeficiente de difusión rotacional.

Las proteínas absorben luz en la región del ultravioleta cercano (250-350 nm) debido a que contienen aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, la tirosina y el triptófano. De los tres, es el triptófano el que contiene un coeficiente de extinción mayor y la fenilalanina el menor. Sin embargo, debido a la elevada cantidad de tirosina en la estructura de las proteínas, la contribución de la tirosina y el triptófano en el espectro de absorción es parecida. En las proteínas que contienen los tres tipos de aminoácidos generalmente se observa solamente la fluorescencia del triptófano, debido a que las longitudes de onda de emisión de la fenilalanina se solapan con las longitudes de onda de absorción de la tirosina. A su vez, las longitudes de onda de emisión de la tirosina se solapan con las de absorción del triptófano.

Al igual que el resto de las macromoléculas, las proteínas son muy sensibles a los cambios en el entorno. Muestra de ello son las variaciones en la intensidad de emisión (que se traducen tanto en aumentos como en disminuciones) de los distintos fluoróforos cuando se producen cambios en el entorno. Por ejemplo, en procesos de

desnaturalización, debidos a cambios en el pH, la temperatura o a la presencia de agentes desnaturalizantes como la urea o el cloruro de guanidinio, el entorno que rodea a los fluoróforos es muy distinto al del estado nativo. De esta forma, residuos que en el estado nativo se encuentran protegidos del disolvente pueden encontrarse expuestos provocando cambios en su fluorescencia. El producto del coeficiente de extinción molar por el rendimiento cuántico de fluorescencia aporta una medida de la sensibilidad relativa de los distintos residuos frente a los cambios en el entorno, siendo el triptófano el de mayor sensibilidad y la fenilalanina la que tiene un valor más bajo.

3.2.3. Electroforesis.

La electroforesis es una técnica utilizada para separar e identificar proteínas, basada en el desplazamiento de las proteínas cargadas a través de un campo eléctrico. Es muy útil como método analítico, ya que permite visualizar las proteínas además de separarlas, lo que permite determinar la pureza de una mezcla. También permite la determinación de otras propiedades como su punto isoelectrico y la masa molecular aproximada.

La electroforesis de proteínas se lleva a cabo en geles formados por el polímero entrecruzado poliacrilamida. El gel actúa como tamiz molecular retrasando el desplazamiento de las proteínas en función de la relación carga/masa, aunque también puede verse afectado por la forma de las proteínas. En todos los casos los geles han sido preparados en láminas.

El gel de poliacrilamida se genera como producto de la polimerización del monómero acrilamida, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ y un agente entrecruzador, N-N'-metilenbisacrilamida, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$. La descomposición de uno de los compuestos utilizados en la técnica electroforética, persulfato amónico, genera una serie de radicales libres de oxígeno que inicia la polimerización de la acrilamida catalizada por la tetrametilendiamina (TEMED) dando lugar a una red tridimensional.

Anteriormente se ha mencionado la capacidad de la técnica para visualizarlas además de separarlas. Para ello se utiliza un colorante conocido como azul de bromofenol, que se fija a las proteínas pero no al gel.

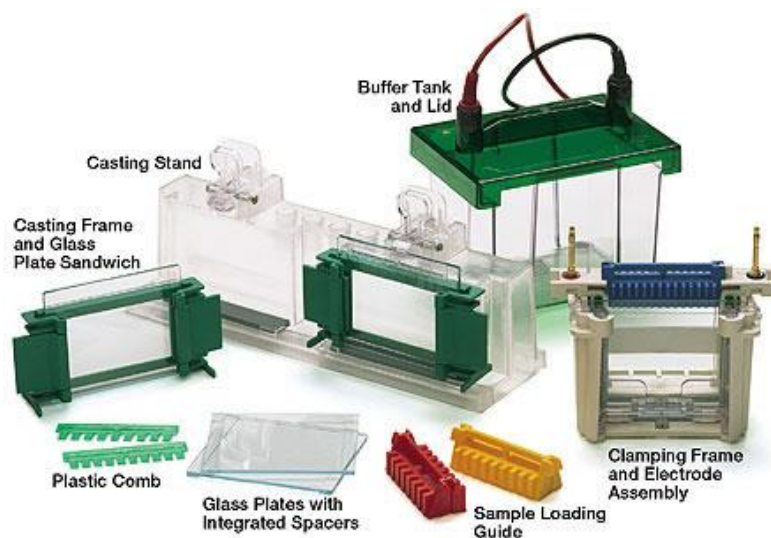


Figura 3.6.- Equipo de electroforesis.

En todos los casos se ha utilizado la electroforesis discontinua (Ornstein 1964) que permite una mayor resolución en la separación de las bandas de proteína. En esta electroforesis se utilizan dos tipos de geles, el apilador, de mayor diámetro de poro, y el separador, de menor diámetro, que presenta una mayor resistencia al desplazamiento de los componentes a través del gel. El gel apilador tiene como función acumular ordenadamente los distintos componentes de la muestra en la interfase entre los dos geles, lo que aumenta sensiblemente la resolución en el segundo gel. El apilador tiene un bajo porcentaje de acrilamida para que la exclusión molecular sea mínima y el pH es diferente al del gel separador.

3.2.3.1.- Reactivos

A continuación se muestra una tabla de los distintos reactivos utilizados para formar los geles de poliacrilamida.

Materiales y métodos

Tabla 3.1.- Reactivos utilizados en la electroforesis.

Disolución	Componentes	Almacenamiento
<i>Disolución A</i>	Acrilamida al 29,2 % (p/v) y Bis-acrilamida al 0,8 % (p/v).	4°C
<i>Tampón del gel separador</i>	Tris 1,5 M ajustado a pH 8,8 con HCl	4°C.
<i>Tampón del gel apilador</i>	Tris 0,5 M ajustado a pH 6,8 con HCl	4°C.
<i>SDS 10%.</i>		Temperatura ambiente
<i>Persulfato amónico al 10% (p/v)</i>		No se almacena. Se prepara justo en el momento.
<i>TEMED</i>	N,N,N',N'-Tetrametilendiamina	Temperatura ambiente
<i>Tampón de disolución de la muestra</i>	1 mL de tampón del gel apilador. 0,8 mL de glicerol. 1,6 mL de SDS. 0,4 mL de β-mercaptoetanol. 0,2 mL de azul de bromofenol al 0,05% (p/v). 4 mL de agua destilada.	Temperatura ambiente
<i>Tampón de desarrollo</i>	Tris 0,125 M, Glicina 1 M y SDS al 0,5% a pH 8,3. Se diluye un volumen de esta disolución en 4 volúmenes de agua destilada para cada electroforesis.	Temperatura ambiente
<i>Disolución para desteñir geles</i>	400 mL de metanol (40%) 100 mL de Acético (10%) 500 mL de agua destilada (50%)	Temperatura ambiente
<i>Disolución para teñir geles</i>	400 mL de metanol (40%) 100 mL de Acético (10%) 1 gramo de Brilliant Blue (0,1%) 500 mL de agua destilada (50%)	Temperatura ambiente
<i>Disolución para secar geles</i>	400 mL de metanol (40%) 100 mL de glicerol (10%) 500 mL de agua destilada (50%)	Temperatura ambiente

3.2.3.2.- Procedimiento

En primer lugar se prepara el gel separador mezclando volúmenes de las disoluciones expuestas en la Tabla 3.1. Se pueden preparar geles de electroforesis con distinto porcentaje de acrilamida en función del tamaño de la proteína que se quiera analizar cómo se puede ver en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2.- Volúmenes en μL de las disoluciones preparadas, necesarios para hacer un gel separador de acrilamida (a los porcentajes indicados) con SDS en una lámina de 1x102x72 mm.

% Acrilamida	6	7	8	10	12.5	15	16
H ₂ O	5300	5000	4600	4000	3300	3300	4100
Disolución A	2.040	2500	2700	3400	4120	5100	3300
Tampón del gel separador	2.500	2500	2500	2500	2500	2500	2500
SDS 10%.	100	100	100	100	100	100	100
Persulfato amónico al 10% (p/v)	50	50	50	50	50	50	50
TEMED	4	4	4	4	4	4	4

El porcentaje de acrilamida escogido para realizar la electroforesis es del 16%. El volumen total utilizado para preparar el gel separador es de 5 mL aproximadamente. Una vez adicionado el TEMED, la disolución se homogeniza y se rellena el espacio entre las placas (alcanzando una altura aproximada de 5 cm). Después se cubre con un poco de agua destilada para asegurar la linealidad de la interfase entre los dos geles.

Una vez haya gelificado el gel separador, se retira el agua que lo cubre con papel de filtro y se prepara el gel apilador al 4% de acrilamida.

Tabla 3.3.- Volúmenes en μL de las disoluciones preparadas, necesarios para hacer un gel apilador de acrilamida (a los porcentajes indicados) con SDS en una lámina de $1 \times 102 \times 72$ mm.

Volumen	5	10
H ₂ O	3050	6100
Disolución A	650	1300
Tampón del gel apilador	1250	2500
SDS 10%.	100	100
Persulfato amónico al 10% (p/v)	50	50
TEMED	4	4

El espacio entre las placas restante se rellena con el gel apilador y se colocan los peines para formar las calles por las que se correrán las muestras.

Al gelificar el gel apilador, se retira el peine. La muestra de proteína se diluye hasta la mitad de su concentración en el tampón de disolución de la muestra (para que el pH de la muestra sea el adecuado). Se calienta a 95°C durante 5 minutos y se aplica un volumen entre 10 y 20 μL en cada uno de los pocillos.

Para el desarrollo del gel apilador se añade tampón de desarrollo y se aplica una intensidad de corriente de 20 mA por lámina (para unas dimensiones de $1 \times 102 \times 72$ mm de espesor, anchura y altura respectivamente). La electroforesis finaliza cuando la muestra llega al final del gel.

3.2.3.3.- Tinción de los geles de electroforesis

Finalizada la electroforesis, las proteínas separadas en los geles se visualizan tiñéndolos con Coomassie Brilliant Blue R-250. En primer lugar, el gel se agita durante 30 minutos en la disolución para desteñir haciendo que las proteínas se fijen al gel. Pasado ese tiempo, el gel se agita durante 1 hora en la disolución para teñir. Por último, el gel se agita en la disolución para desteñir hasta que se ha eliminado la tinción de fondo y se distinguen con claridad las proteínas que forman la muestra.

3.2.3.4.- Secado de los geles de electroforesis

Tras desteñir el gel hasta eliminar la tinción de fondo, este se introduce en la disolución para secar durante 30 minutos, el proceso es más rápido si cuenta con agitación. Una vez seco, se cubre con papel celofán mojado por ambos lados y se coloca sobre un cristal. El gel se sujeta con pinzas al cristal y se seca a temperatura ambiente o a 37 grados.

3.2.3.5.- Cálculo de la masa molecular

La masa molecular de las subunidades de una proteína se determina mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. La determinación de masas moleculares de polipéptidos por electroforesis en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS) en geles de poliacrilamida (PAGE) fue introducida empíricamente por Shapiro (1967). Se basa en que todos los polipéptidos unen la misma cantidad de SDS por unidad de peso de forma que la relación carga/masa es constante. Cuando son sometidas a dicha técnica, que actúa como tamiz, se demuestra empíricamente que existe una relación lineal entre la movilidad relativa (R_f) de estos polipéptidos el logaritmo de su masa molecular.

Para calcular la masa de las subunidades de la proteína basta con medir la movilidad relativa de las bandas que presenta y, con ayuda de una recta patrón, obtenida a partir de las medidas de R_f de una serie de proteínas de masa molecular conocida, deducimos su masa molecular.

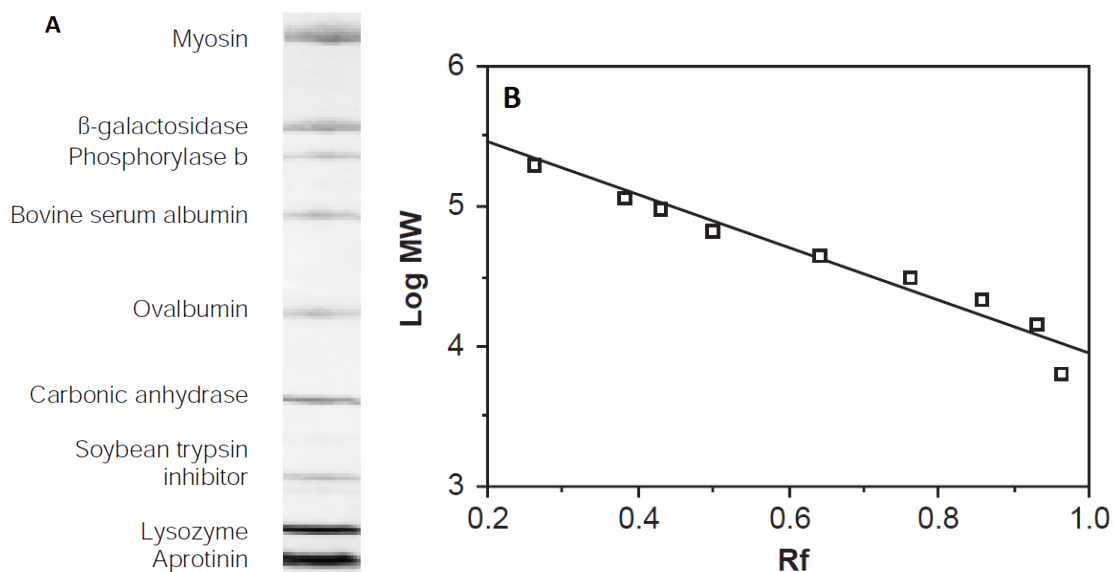


Figura 3.7.- A) Patrón de electroforesis SDS-PAGE Standards Broad Range. Las proteínas utilizadas como patrón son: Miosina (200.000 Da), β -galactosidasa (116.250 Da), Fosforilasa b (97.400 Da), Albúmina de suero bovino (66.200 Da), Ovalbúmina (45.000 Da), Anhidrasa carbónica (31.000 Da), Inhibidor de tripsina (21.500 Da), Lisozima (14.400 Da) y Aprotinina (6.500 Da). B) Recta patrón del logaritmo de la masa molecular frente a la movilidad relativa (R_f).

3.2.4. Cromatografía de exclusión molecular

El término cromatografía está referido a un grupo de técnicas de separación caracterizadas por una distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases, una estacionaria y una móvil. La fase estacionaria consiste en una serie de partículas esféricas empaquetadas dentro de una columna a través de la cual fluye una fase móvil. La mezcla de proteínas se introduce junto a la fase móvil en la columna y se deja pasar a través de ella y son consecuentemente detectados y recogidos a diferentes tiempos al final de ésta. En todos los experimentos realizados, la fase móvil utilizada es líquida, generalmente tampones acuosos, es decir, se ha realizado “cromatografía líquida”.

Debido a que todas las proteínas interaccionan con un gran número de fases sólidas, por lo general, de forma selectiva, el uso de técnicas cromatográficas permite discriminar entre diferentes tipos de proteínas. Por tanto, el uso de las técnicas cromatográficas es muy frecuente en la purificación de proteínas, consiguiendo con ellas un incremento en la pureza de la proteína.

Para la separación de proteínas, son varias las técnicas de cromatografía líquida utilizadas, diferenciándose principalmente en la fase estacionaria.

En nuestro caso se ha usado la cromatografía de exclusión molecular. Este tipo de cromatografía se utiliza para separar proteínas en función de su masa molecular, así como para el intercambio de tampones en los que se encuentran disueltas las proteínas.

El proceso de separación utiliza una matriz como fase estacionaria compuesta por unas partículas esféricas con un tamaño de poro determinado, empaquetadas en la columna y rodeadas por disolvente. La fase móvil es aquella que transporta la muestra de interés (cuyo volumen debe ser menor al 5% del volumen total de la columna), compuesta por moléculas de distinto tamaño (superior, inferior o igual al tamaño del poro). De esta forma las moléculas que tengan un tamaño menor difundirán dentro de los poros, tardando más tiempo en atravesar la columna. Sin embargo, las moléculas con un tamaño mayor no podrán difundir dentro de los poros y su recorrido será menor, haciendo que abandonen la columna antes. Por lo tanto, las moléculas eluyen en orden decreciente del tamaño. No todas las proteínas se comportan de la misma forma, debido a que la velocidad de elución de las proteínas en este tipo de cromatografía no sólo depende del tamaño de la proteína sino también de la forma.

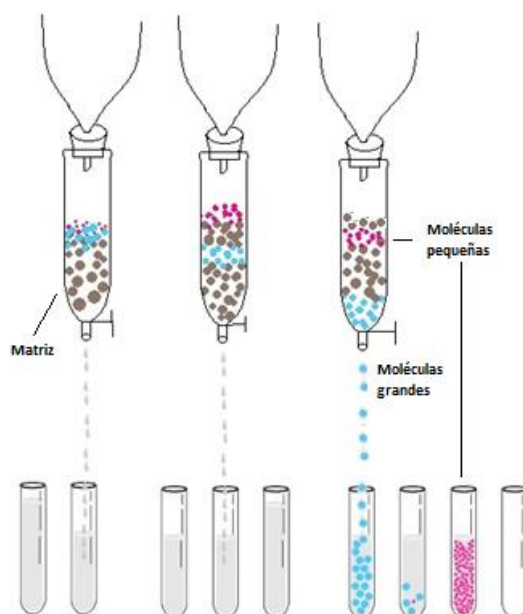


Figura 3.8. Esquema general de la cromatografía de exclusión molecular.

En la purificación de la BPE se ha empleado como soporte el Superdex 75. Es estable en el intervalo de pH entre 3 y 12, en disoluciones de ácido acético 1M, urea 8M, cloruro de guanidinio 6 M y una mezcla de isopropanol (30%) y etanol (70%). Son resistentes a los compuestos utilizados en la cromatografía de líquidos, excepto

hidrocarburos lineales, aromáticos y clorados. Se almacena en etanol al 20% en un intervalo de temperaturas de 4 a 30°C.

Al ser una columna preempaquetada comercialmente, se siguen las instrucciones correspondientes aportadas por GE Healthcare. Según se indica, el primer paso es eliminar todas las posibles burbujas de aire que pueda tener la columna. Después se procede a equilibrar la columna pasando cinco volúmenes del tampón en el que se va a eluir la proteína. Cargamos un máximo de 5 ml de proteína concentrada. Se recolectan fracciones de 4 mL. Se miden las absorbancias a 280 nm, obteniéndose el correspondiente perfil cromatográfico. En la figura 3.9 se muestra el montaje utilizado para la realizar la cromatografía de exclusión molecular.



Figura 3.9. FPLC.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- Concentración y purificación de la BPE.

Para iniciar el trabajo de investigación propuesto es necesario que la proteína BPE de *Porphyridium Cruentum* se encuentre en la concentración y pureza adecuadas para realizar los experimentos. La proteína fue suministrada por la Profesora María Jose Ibañez del Grupo de Investigación “Biotecnología de microalgas marinas (BIO173)” siguiendo el procedimiento descrito por Ibañez-González (2013) de la Universidad de Almería y se encontraba en tampón ácido acético 50 mM y pH 5,5. Sin embargo los experimentos se van a realizar en tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 150 mM pH 7. Por ello es necesario, en primer lugar dializarla para proceder al cambio de tampón. Una vez dializada se concentra en Centriped-30 hasta alcanzar una concentración de 1,97 mg/mL

Posteriormente la muestra de proteína dializada y concentrada se pasa por cromatografía de exclusión molecular (FPLC) con el fin de eliminar las impurezas que puedan estar presentes en la muestra original. El perfil cromatográfico obtenido se muestra en la figura 4.1, donde se indica la absorbancia a 280 nm de cada una de las fracciones, así como el grado de pureza de las mismas.

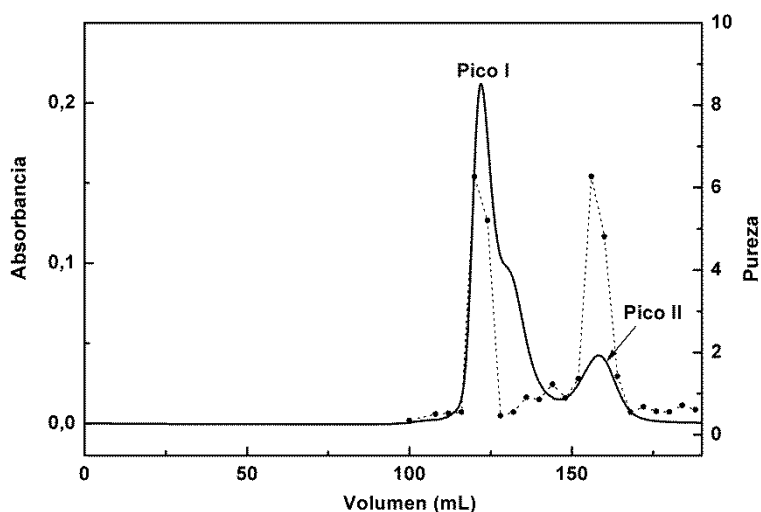


Figura 4.1. Perfil cromatográfico de las fracciones tras pasar por FPLC en función de la absorbancia y la pureza de la fracción.

Para determinar el grado de pureza se utiliza la siguiente relación:

$$\text{Pureza} = \frac{\text{Absorbancia a } 540\text{nm}}{\text{Absorbancia a } 280\text{ nm}}$$

Para que el grado de pureza sea aceptable para los experimentos que se van a llevar a cabo es necesario que esta relación sea mayor que 4, lo cual es indicativo de un alto grado de pureza. Como se puede observar en la figura 4.1 las fracciones que tienen una pureza adecuada son las correspondientes al Pico I y Pico II.

Con objeto de seleccionar la muestra adecuada para realizar nuestros experimentos, se han realizado espectros y electroforesis en condiciones desnaturizantes de cada uno de ellos, tal y como se muestra en la figura 4.2.

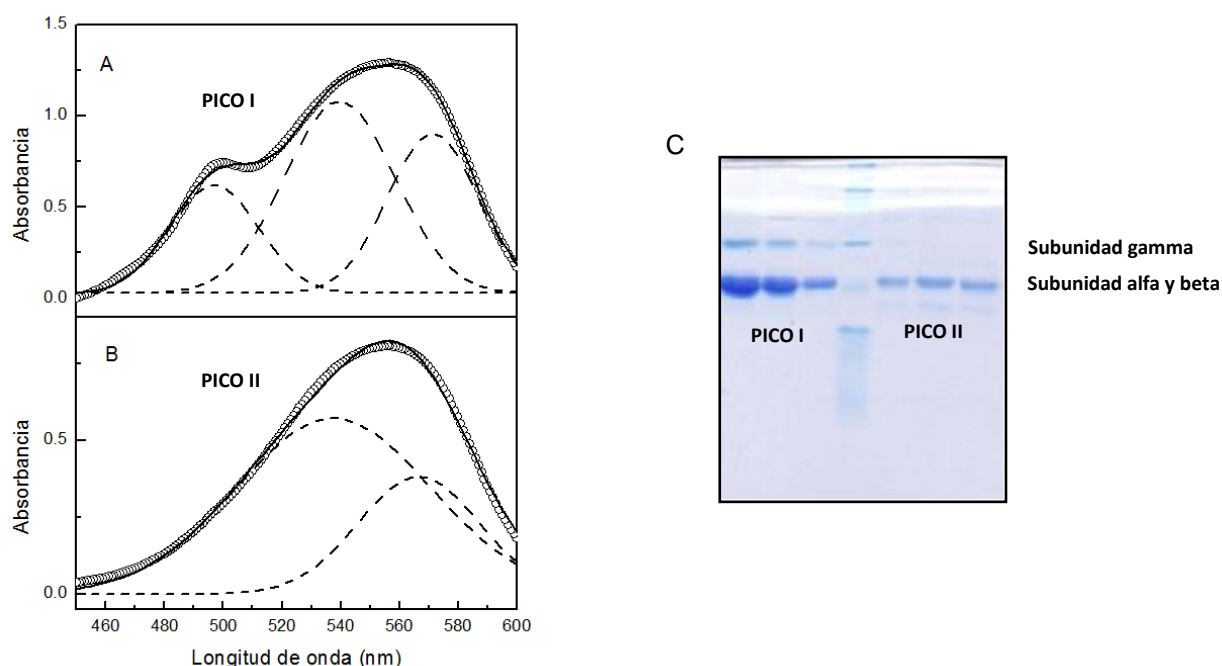


Figura 4.2.- A) Espectro de absorción del primer pico del perfil cromatográfico de BPE incluyendo su deconvolución en tres picos. B) Espectro de absorción del segundo pico del perfil cromatográfico de BPE incluyendo su deconvolución en dos picos. C) Gel de electroforesis de BPE. Las muestras de las calles 1, 2 y 3 pertenecen al primer pico del perfil cromatográfico, la muestra de la calle 4 corresponde a los patrones Miosina (200.000 Da), β -galactosidasa (116.250 Da), Fosforilasa b (97.400 Da), Albúmina de suero bovino (66.200 Da), Ovalbúmina (45.000 Da), Anhidrasa carbónica (31.000 Da), Inhibidor de tripsina (21.500 Da), Lisozima (14.400 Da) y Aprotinina (6.500 Da), mientras que las muestras de las calles 5, 6 y 7 pertenecen al segundo pico del perfil.

En la figura 4.2 A y B se muestra la deconvolución de los espectros, observándose que el del Pico I presenta tres componentes diferentes a diferentes longitudes de onda: un pico con un máximo a 540 nm y otro a 565 nm, típico de la BPE que contiene PEB, y un hombro a 498 nm correspondiente al cromóforo PUB, confirmando la presencia de la subunidad γ . La deconvolución del espectro del Pico II sólo presenta dos componentes, un pico con un máximo a 540 nm y otro a 565 nm, característicos del cromóforo PEB y confirmando la presencia del monómero $\alpha\beta$ y la ausencia de la subunidad γ . La electroforesis al 16% en poliacrilamida y en condiciones desnaturalizantes (Figura 4.2 C) se utiliza para confirmar los resultados mostrados en los espectros. Teniendo en cuenta estos resultados, podemos decir que el primer pico corresponde a la proteína completa que contiene las tres subunidades y el segundo de los picos contiene el monómero $\alpha\beta$ y no la subunidad γ . Por tanto, seleccionamos el Pico I para realizar los experimentos objeto de nuestro estudio.

Por último, se pincha este pico en FPLC para comprobar su masa molecular y el alto grado de pureza una vez separado del Pico II. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.3, donde se incluyen un kit de proteínas con masas moleculares conocidas.

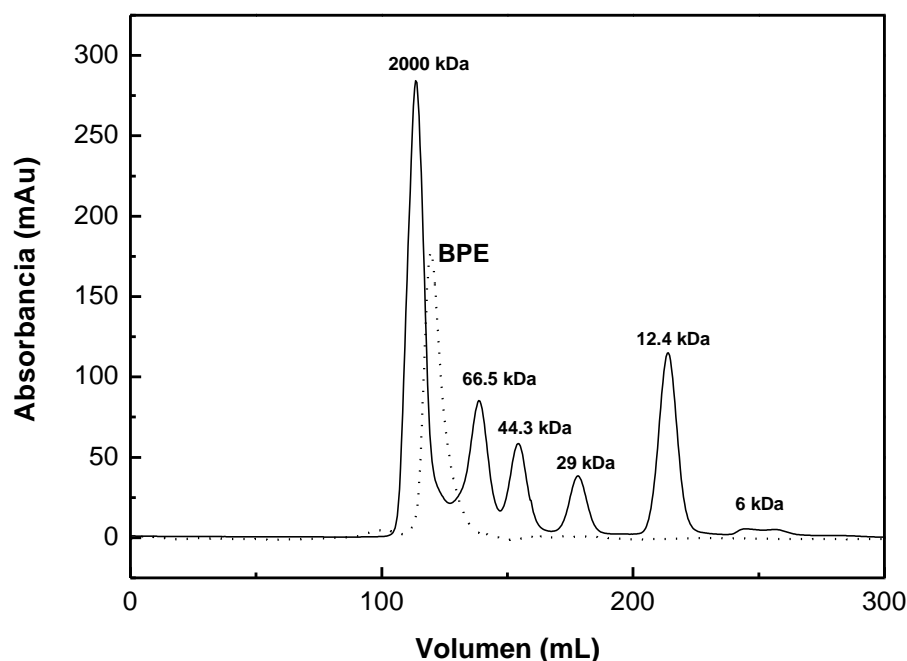


Figura 4.3. Patrón del perfil cromatográfico de la BPE en tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 150 mM pH 7: Blue Dextran (2000 kDa), albúmina de suero bovino (66,5 kDa), ovalbumina (44.3 kDa), anhidrasa carbonica (29 kDa), citocromo c (12,4 kDa), Abl-SH3 (6 kDa)

Los resultados obtenidos muestran que la proteína está completamente pura, como se puede apreciar en la figura 4.3 ya que aparece un solo pico de masa molecular de 272 kDa, correspondiente a la BPE completa (González-Ramírez et al., 2014).

Finalmente se cambió el tampón de fosfato sódico 50 mM, NaCl 150 mM pH 7 por el tampón fosfato sódico 50 mM pH 7 mediante diálisis.

4.2.- Tratamiento térmico.

Teniendo en cuenta que, como ya se ha comentado anteriormente, la BPE puede utilizarse como colorante alimentario, y que para ello es necesario llevar a cabo distintos procedimientos de esterilización, se va a estudiar el comportamiento de la proteína incubándola a distintas temperaturas e intervalos de tiempo, en presencia y ausencia de diferentes azúcares.

Para realizar estos experimentos, la proteína con una concentración de 0,1 mg/mL en tampón fosfato sódico 50 mM a pH 7, se ha incubado a las temperaturas de 25, 40, 60, 80 y 100 °C, sola y en presencia de azúcares. Los azúcares utilizados son: sacarosa, glucosa y maltosa a una concentración de 10 mg/mL. Se han realizado medidas a 5, 30 y 60 minutos después de la incubación para las temperaturas de 25-80°C. En el caso de 100°C donde se llevará a cabo una esterilización rápida la medida se tomó a los 60 segundos.

El estudio del comportamiento de la proteína en estas condiciones se ha realizado mediante espectrofotometría UV- visible y fluorescencia, electroforesis y FPLC.

4.2.1.- Esterilización lenta

En la figura 4.4 se muestra el esquema de trabajo utilizado para realizar los experimentos relativos a la esterilización lenta. Para ello se preparan 800 µL de la muestra de BPE de *Porphyridium Cruentum* a una concentración de 0,5 mg/mL en tampón fosfato sódico 50 mM a pH 7 sola o con los azúcares sacarosa, glucosa o

maltosa a una concentración de 10 mg/mL, incubándolos a 25, 40, 60 y 80°C. Se ha escogido este pH ya que estudios previos realizados en nuestro laboratorio (González-Ramírez et al., 2014) demuestran que la proteína es estable en el intervalo de pH entre 4 y 8, de forma análoga a lo que ocurre con otras proteínas de esta misma familia (Munier et al., 2014, Chaiklahan, Chirasuwan & Bunnag, 2012). Posteriormente sacamos alícuotas de 120 µL de muestra a los tiempos de incubación de 5, 30 y 60 minutos y las dejamos durante una hora a 25°C. Transcurrido este tiempo, de los 120 µL cogemos 100 µL y le añadimos tampón hasta un volumen final de 1 mL, utilizando esta muestra para medir el espectro UV-Visible y de fluorescencia (previa dilución hasta 3 mL). Cogemos otra muestra de 10 µL que utilizaremos para hacer una electroforesis. Finalmente, una vez transcurridos los 60 minutos de incubación a cada temperatura tomamos el resto de muestra (aproximadamente unos 400 µL) y lo pinchamos en FPLC obteniéndose el cromatograma correspondiente.

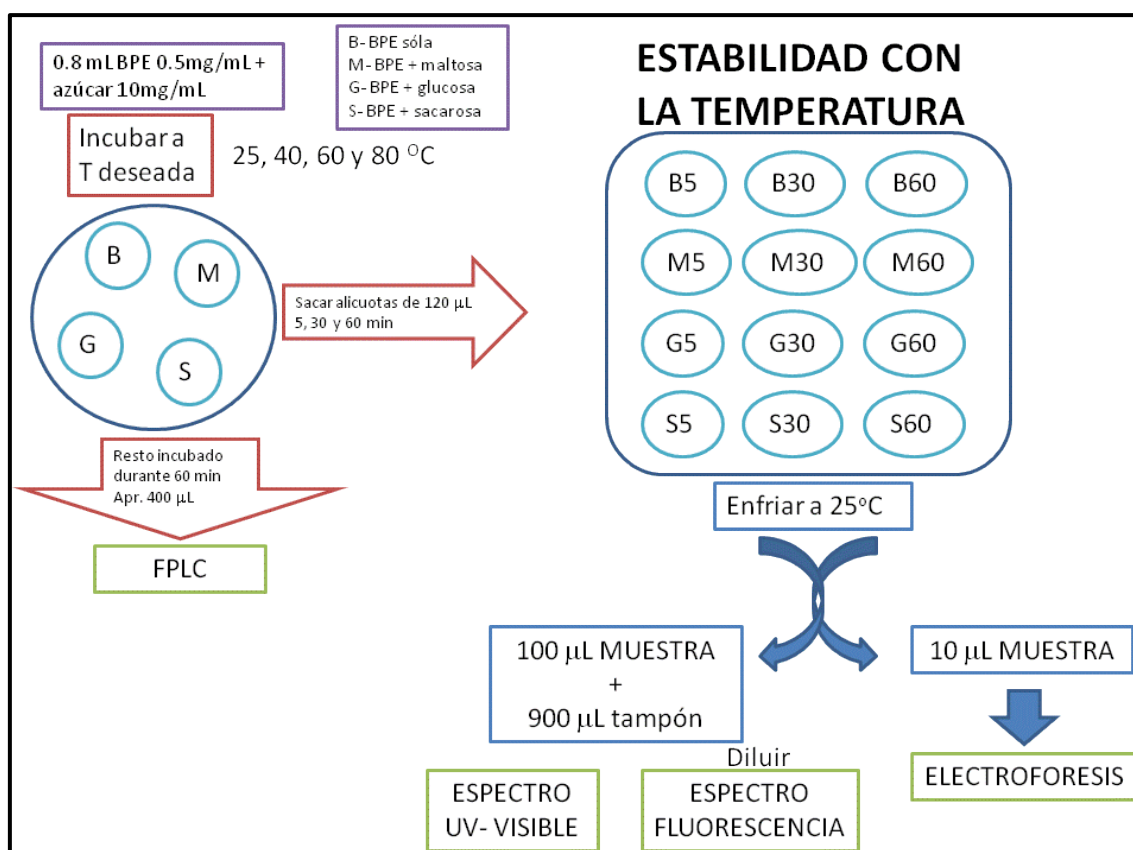


Figura 4.4. Esquema de trabajo para el tratamiento térmico correspondiente a una esterilización lenta

4.2.1.1.- Ausencia de azúcares.

En la figura 4.5 se muestran los espectros de absorbancia y fluorescencia previos a la incubación

Los resultados obtenidos mediante espectroscopía UV-visible y fluorescencia se muestran en la figura 4.6. En la figura 4.6.A se recogen los datos de pérdida de absorbancia a las tres longitudes de onda (498, 540 y 565 nm) donde los cromóforos PUB y PEB presentan sus máximos de absorción. De igual modo en la figura 4.6.B se presentan los resultados de fluorescencia excitando a estas longitudes de onda, recogiendo el valor de la intensidad de fluorescencia a 578 nm, utilizando unas rendijas para la emisión y excitación de 3 nm para ambos casos

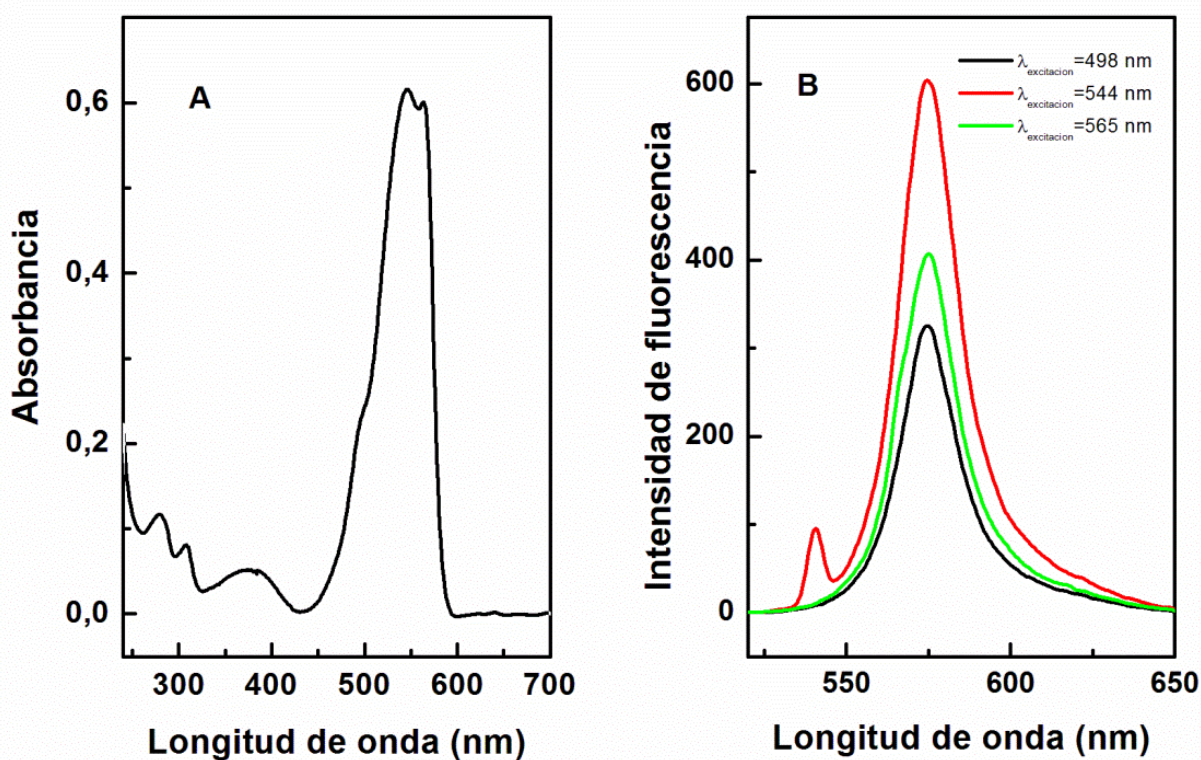


Figura 4.5. A) Espectro UV-visible de BPE de *Porphyridium Cruentum*. B) Espectros de fluorescencia de BPE de *Porphyridium Cruentum* excitando a 498, 540 y 565 nm.

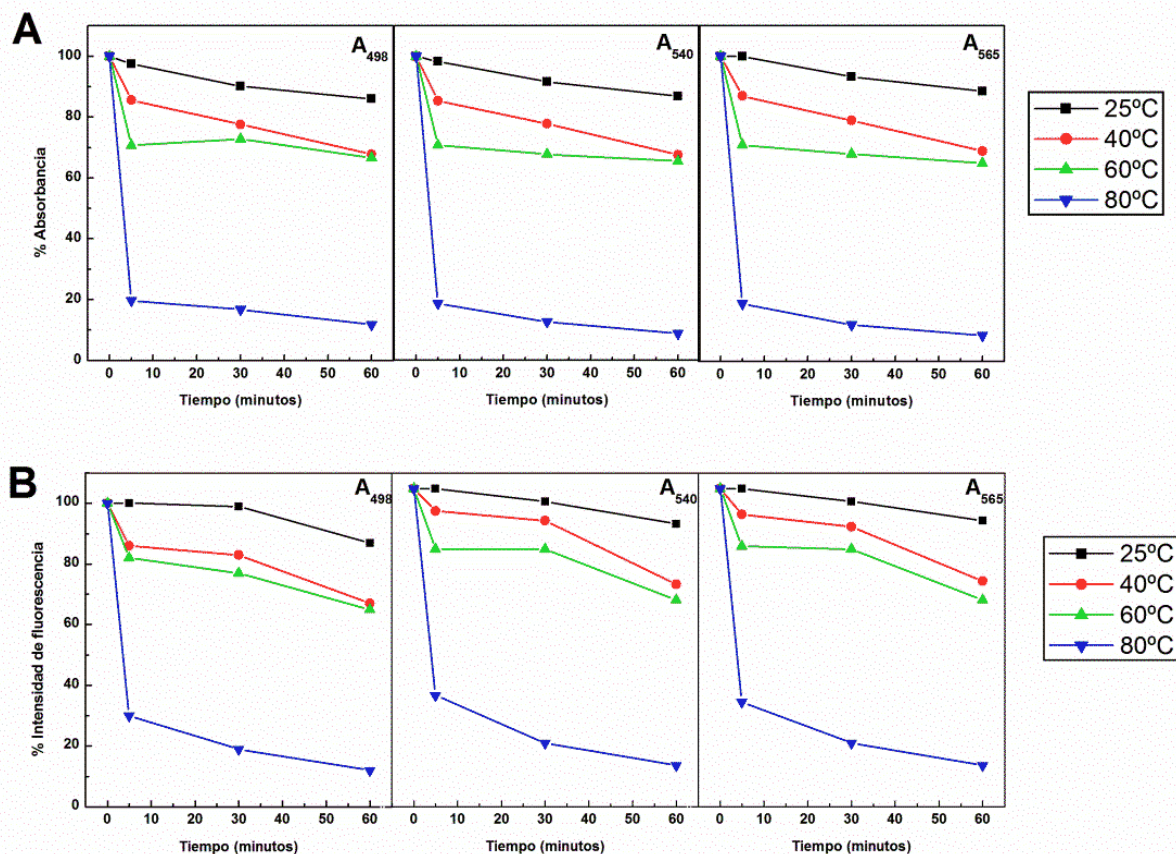


Figura 4.6. Variación de la absorbancia e intensidad de fluorescencia en función del tiempo y temperatura de incubación para la BPE de *Porphyridium Cruentum*. A) Pérdida de absorbancia para las longitudes de onda 498, 540 y 565. B) Pérdida de la intensidad de fluorescencia excitando a 498, 540 y 565 nm y recogiendo la emisión a 578 nm.

Los resultados obtenidos muestran que la pérdida de absorbancia e intensidad de fluorescencia es inferior al 30% para temperaturas inferiores a 60°C. Sin embargo a temperaturas superiores, la proteína presenta una pérdida superior al 80% en los primeros 5 minutos de incubación, precipitando la muestra (figura 4.7). A temperatura ambiente, la proteína se mantiene estable durante el tiempo de incubación, con pérdidas de sus propiedades ópticas inferiores al 10%, corroborando resultados previos (González Ramirez et al., 2014), en los que la proteína permanece estable al menos durante 20 días en presencia y ausencia de luz.

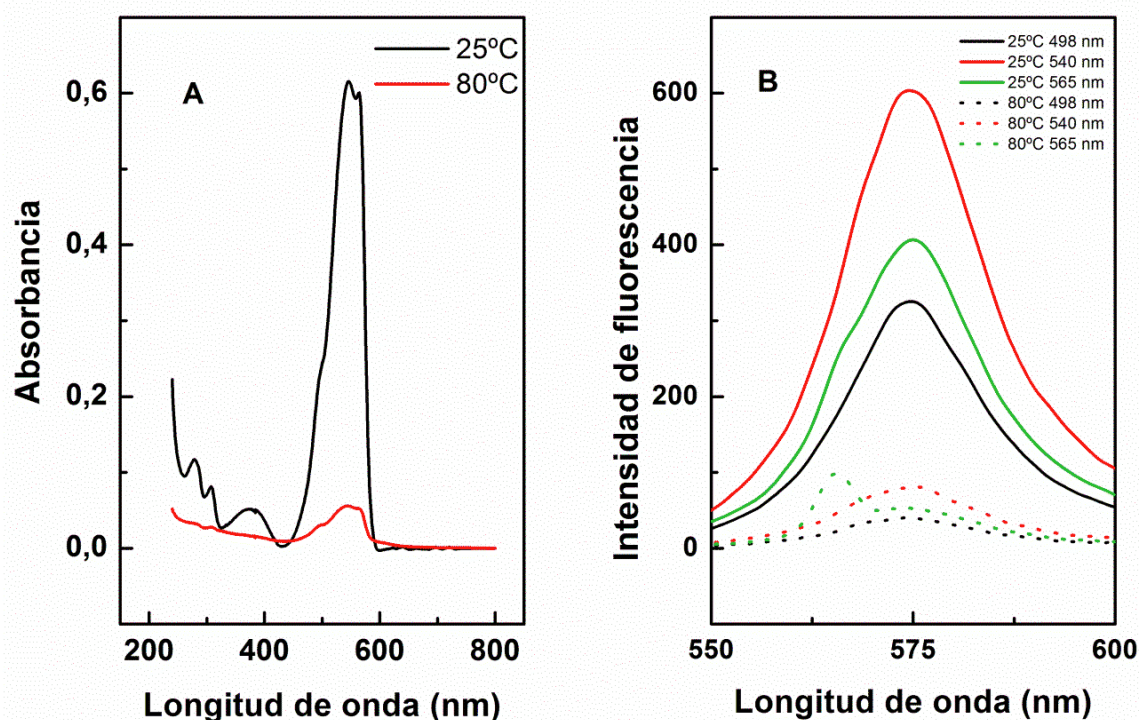


Figura 4.7. A) Espectro UV-visible de BPE de *Porphyridium Cruentum* antes y después de la incubación a 80°C. B) Espectros de fluorescencia de BPE de *Porphyridium Cruentum* excitando a 498, 540 y 565 nm antes y después de la incubación a 80°C.

La variación de las propiedades ópticas estudiadas de la proteína (absorbancia y fluorescencia), ponen de manifiesto que la pérdida de los cromóforos presentes en las subunidades α , β y γ se produce de forma simultánea, ya que el comportamiento a todas las longitudes de onda es similar.

Los cromatogramas obtenidos, mediante FPLC, la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (figura 4.8), y espectros de UV-visible y fluorescencia (figura 4.6) demuestran que la proteína mantiene su estructura cuaternaria con sus correspondientes cromóforos hasta los 60°C. A partir de esta temperatura la proteína precipita perdiendo todo el color y por tanto no siendo válida para nuestro objetivo.

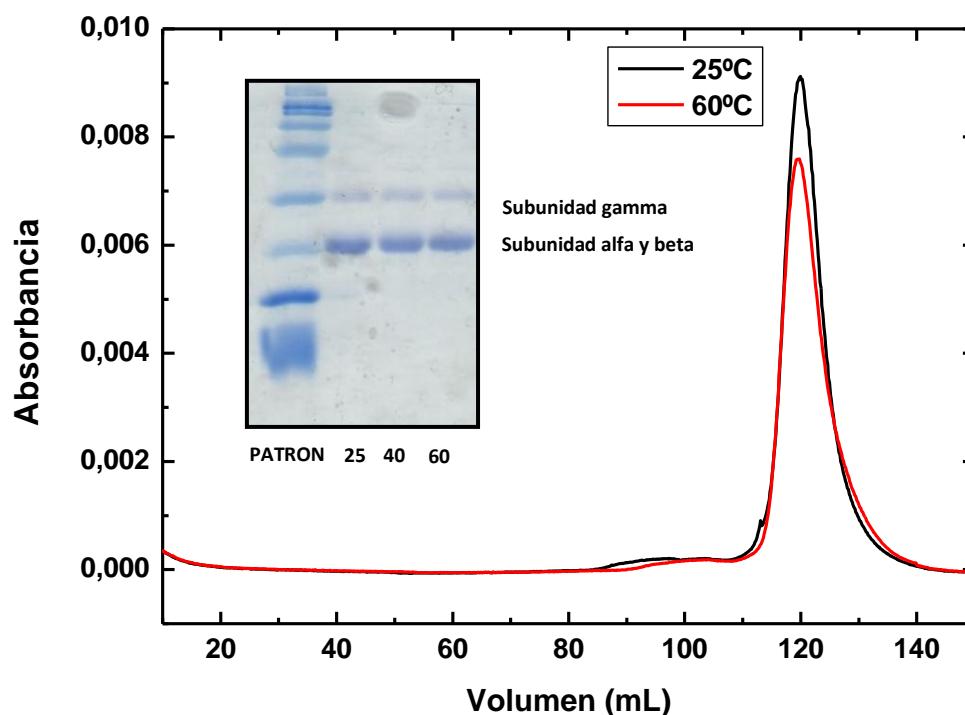


Figura 4.8. Cromatograma y gel de electroforesis de la muestra incubada a 60 °C durante 60 minutos. En el cromatograma se muestran los picos de la muestra antes de la esterilización lenta (indicada como 25°C) y una vez realizado este proceso (60°C). En la electroforesis se muestra la banda correspondiente al patrón y a la muestra tratada a 25, 40 y 60°C, señalando las bandas correspondientes a las subunidades alfa, beta y gamma. El patrón consta de las siguientes proteínas: Miosina (200.000 Da), β -galactosidasa (116.250 Da), Fosforilasa b (97.400 Da), Albúmina de suero bovino (66.200 Da), Ovalbúmina (45.000 Da), Anhidrasa carbónica (31.000 Da), Inhibidor de tripsina (21.500 Da), Lisozima (14.400 Da) y Aprotinina (6.500 Da),

4.2.1.2.- Presencia de azúcares

Estudios similares han sido realizados en presencia de los azúcares maltosa, sacarosa y glucosa, obteniéndose los resultados que se muestran en las figura 4.9 y 4.10.

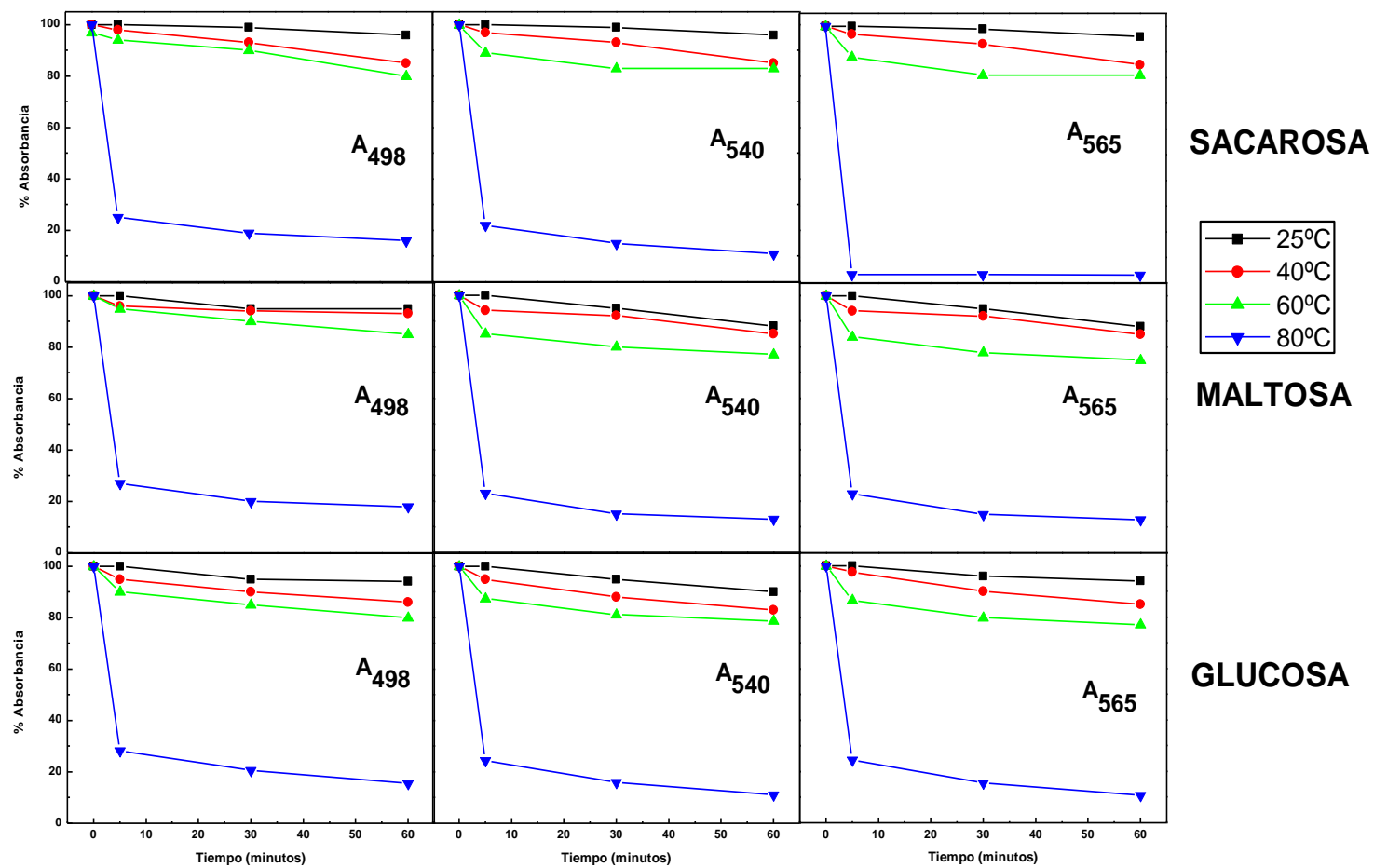


Figura 4.9. Variación de la absorbancia en función del tiempo y temperatura de incubación para la BPE de *Porphyridium Cruentum* para las longitudes de onda 498, 540 y 565 en presencia de maltosa, sacarosa y glucosa.

Resultados y discusión

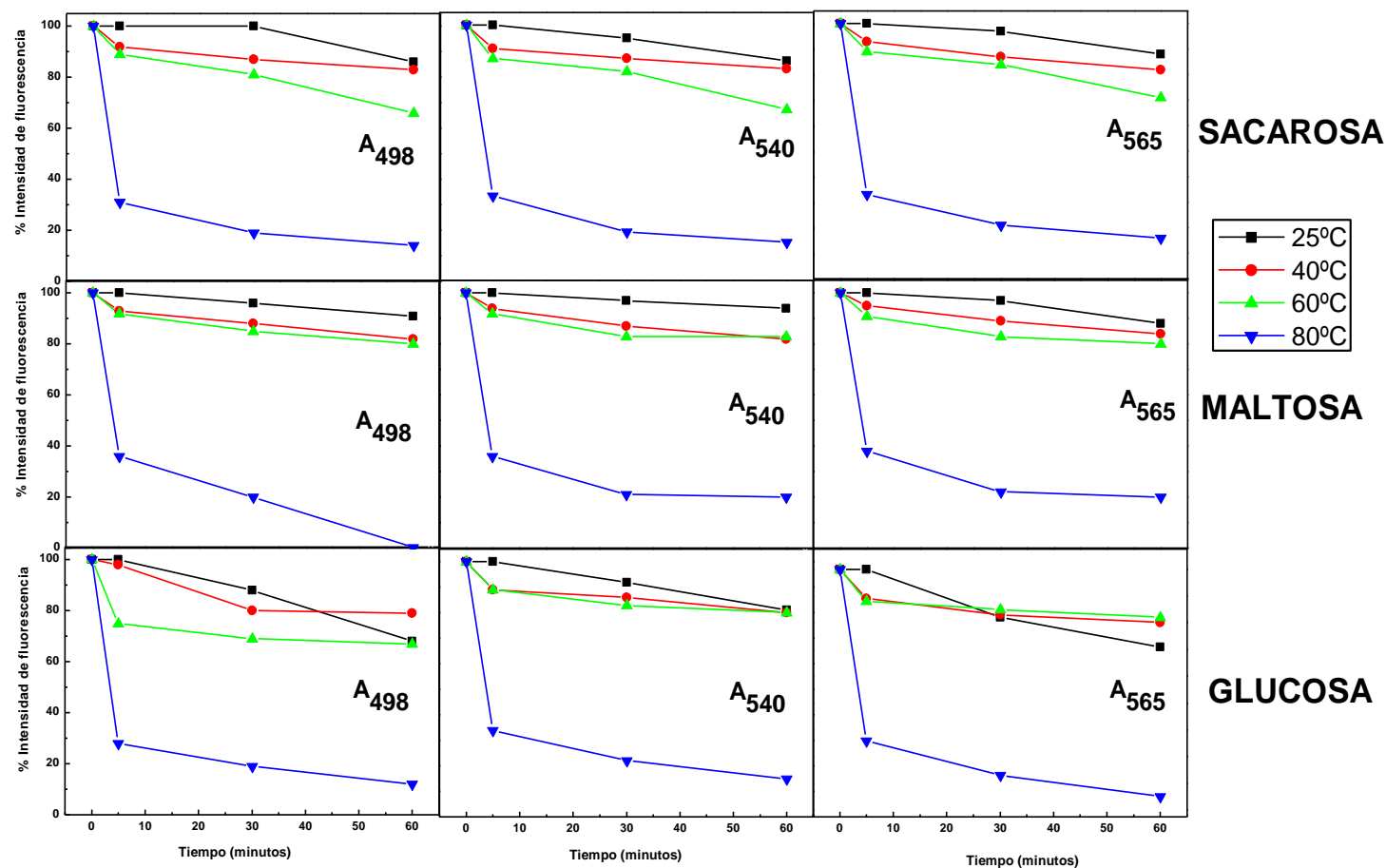


Figura 4.10. Pérdida de la intensidad de fluorescencia excitando a 498, 540 y 565 nm y recogiendo la emisión a 578 nm en función del tiempo y temperatura de incubación para la BPE de *Porphyridium Cruentum* en presencia de maltosa, sacarosa y glucosa.

La presencia de azúcares no afecta a su estabilidad, presentando un comportamiento similar en el intervalo de temperaturas y tiempo de incubación estudiado, para todos los azúcares.

4.2.2.- Esterilización rápida

El otro protocolo utilizado en la industria alimentaria, conocido como proceso de esterilización rápida, es el empleado en esta parte del trabajo. En la figura 4.11 se muestra el protocolo utilizado para realizar los experimentos relativos a la esterilización rápida en los que se parte de 500 μL de la muestra de BPE de *Porphyridium Cruentum* a una concentración de 0,5 mg/mL en tampón fosfato sódico 50 mM a pH 7 sola o con los azúcares sacarosa, glucosa o maltosa a una concentración de 10mg/mL, incubándolos a 100°C durante 60 segundos. Se sacan alícuotas de 120 μL de muestra una vez transcurrido el tiempo y las dejamos durante una hora a 25°C. Posteriormente, de los 120 μL tomamos 100 μL y hacemos una dilución 1:10 para realizar las medidas de UV-Visible y de fluorescencia (previa dilución). Por último tomamos otra muestra de 10 μL para hacer una electroforesis. El resto de muestra, lo pinchamos en FPLC.

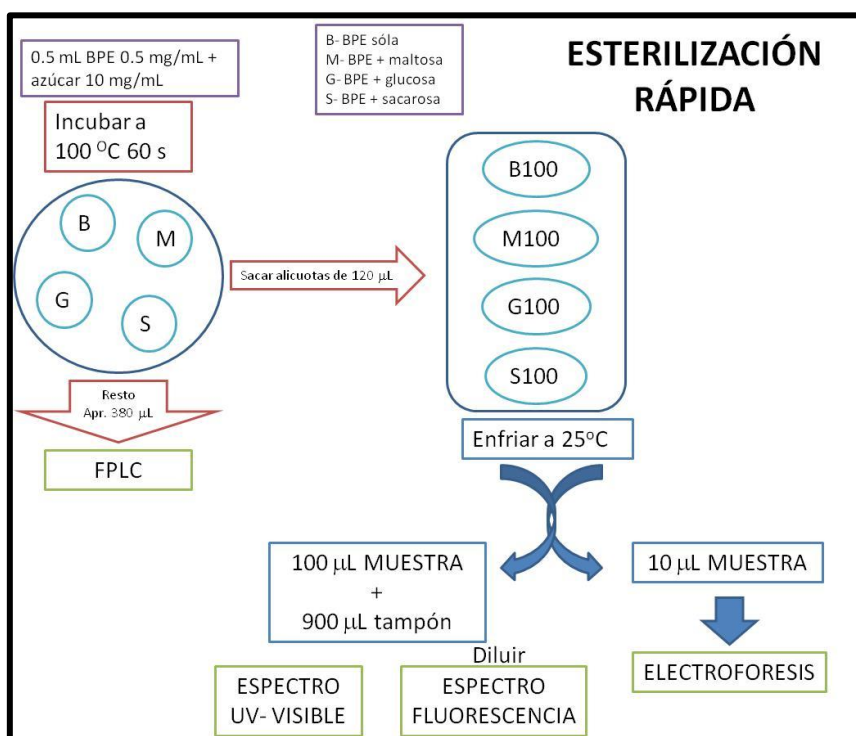


Figura 4.11. Esquema de trabajo para el tratamiento térmico correspondiente a una esterilización rápida

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos en presencia y ausencia de azúcares se muestran en la tabla 4.1

Tabla 4.1. Porcentaje de absorbancia y de intensidad de fluorescencia de la proteína sometida a calentamiento a 100 °C durante 1 minuto respecto de la proteína sin ser sometida a tratamiento térmico.

	λ (nm)	Sola	Glucosa	Sacarosa	Maltosa
% Absorbancia	498	94	97	99	98
	540	90	93	93	93
	565	90	92	92	92
	λ_{exc} (nm)	Sola	Glucosa	Sacarosa	Maltosa
% Intensidad fluorescencia	498	97	92	98	95
	540	99	98	92	95
	565	99	99	96	99

Por último tras la incubación a 100°C durante 60 segundos, la cantidad de muestra sobrante después de la realización de estas medidas (unos 400µL aproximadamente) se pinchan en el FPLC con el fin de comprobar si existe variación en el estado de agregación de la proteína. El cromatograma obtenido en este caso se muestra en la figura 4.12.

Los resultados obtenidos muestran que la proteína se mantiene estable en el proceso de esterilización rápida, tal y como puede apreciarse en la tabla 4.1 donde la pérdida de las propiedades ópticas no resulta superior al 10% en ninguna de las condiciones estudiadas. Además en la electroforesis (figura 4.12) no se aprecia ningún cambio respecto a la muestra original. Por otro lado, y tal como se observa en la figura 4.12 la estructura cuaternaria de la proteína permanece inalterada en este proceso, solapándose el pico antes y después de la esterilización. Respecto a la presencia de azúcares es importante indicar que estos no afectan a la estabilidad de la proteína, con lo que su utilización dependerá exclusivamente de las necesidades a la hora de elaborar el producto en el que se utilizará la BPE como colorante alimentario y no de la estabilidad de esta proteína.

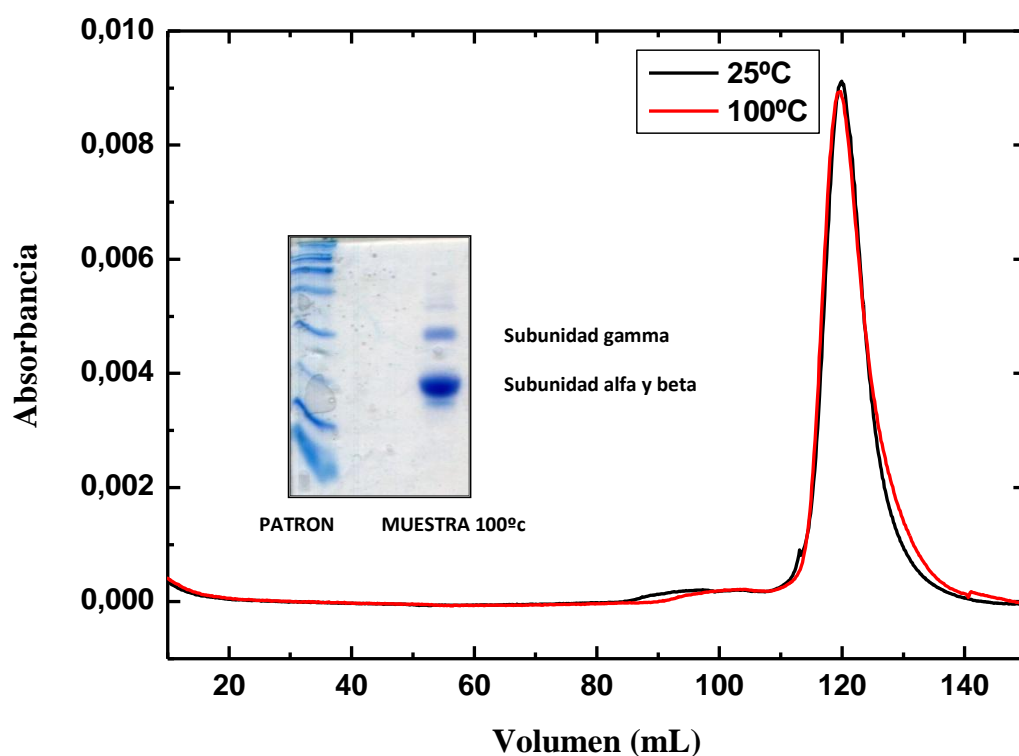


Figura 4.12. Cromatograma y gel de electroforesis de la muestra incubada a 100°C durante 60 segundos. En el cromatograma se muestran los picos de la muestra antes de la esterilización rápida (indicada como 25°C) y una vez realizado este proceso (100°C). En la electroforesis se muestra la banda correspondiente al patrón y a la muestra tratada a 100°C, señalando las bandas correspondientes a las subunidades alfa, beta y gamma. El patrón consta de las siguientes proteínas: Miosina (200.000 Da), β -galactosidasa (116.250 Da), Fosforilasa b (97.400 Da), Albúmina de suero bovino (66.200 Da), Ovalbúmina (45.000 Da), Anhidrasa carbónica (31.000 Da), Inhibidor de tripsina (21.500 Da), Lisozima (14.400 Da) y Aprotinina (6.500 Da),

5. CONCLUSIONES

La variación de las propiedades ópticas durante el proceso de esterilización (rápida o lenta) puede seguirse por cualquiera de las longitudes de onda utilizadas (565, 540, 498nm) ya que el comportamiento a todas ellas es similar.

En el proceso de esterilización lenta, la proteína mantiene su estructura cuaternaria con sus correspondientes cromóforos hasta los 60°C. A partir de esta temperatura la proteína precipita perdiendo todo el color.

La presencia de azúcares no afecta a la estabilidad de la BPE de *Porphyridium Cruentum*, presentando un comportamiento similar en el intervalo de temperaturas y tiempo de incubación estudiado, para todos los azúcares.

La proteína se mantiene estable en el proceso de esterilización rápida, tanto en lo que respecta a sus propiedades ópticas como a la variación en su estado de agregación.

Para poder utilizar la BPE de *Porphyridium Cruentum* como colorante en la industria alimentaria será necesario utilizar el proceso de esterilización rápida, en presencia o ausencia de azúcares, ya que en la esterilización lenta la proteína se desnaturaliza a partir de 80°C y 5 minutos de incubación.

6. BIBLIOGRAFÍA

Akhilender N. K., Sarada, R., Manoj, G., Khan, M.Y., Mahadeva, M., Viswanatha, S., Narasimha, K., Ravishankar, G.A. & Srinivas, L. (1999). "Toxicity assessment of hycocyanin: A blue colorant from blue green alga *Spirulina platensis*". *Food Biotechnology*. **13**, 51.

Ayyagari MS, Pande R, Kamtekar S, Gao H, Marx KA, Kumar J, et al. (1995). "Molecular assembly of proteins and conjugated polymers: Toward development of biosensors." *Biotechnology and Bioengineering*. **45**,116

Arad, S. & Yaron, A. (1992). "Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics". *Trends in Food Science and Technology*. **3**, 92.

Bennet, A. & Bogorad, L. (1973) "Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga". *The Journal of Cell and Biology*. **58**, 419.

Bermejo Román, R., Álvarez-Pez, J. M., Acién Fernández, F. G. & Molina Grima, E. (2002). "Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*." *Journal of Biotechnology*. **93**, 73

Bermejo, R., Tobaruela, D.J., Talaver, E.M., Orte, A & Alvarez-Pez, J. M (2003). "Fluorescent behavior of B-phycoerythrin in microemulsions of aerosol OT/water/isooctane." *Journal of Colloid and Interface Science*. **263**, 616

Bryant, D.A., Guglielmi, G., Tandeau de Marsac, N., Castets, A.M. & Cohen-Bazire, G. (1979) "The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model." *Archives of Microbiology*. **123**, 113.

Camara-Artigas, A., Bacarizo, J., Andujar-Sánchez, M., Ortiz-Salmerón, E., Mesa-Valle, C., Cuadri, C., Martín-García, Jose M., Martínez-Rodríguez, S., Mazzuca-Sobczuk, T. Ibañez, María J. & Allen, James P. (2012). "pH-dependent structural conformations of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*". *FEBS Journal*, **279**, 3680

Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Bunnag, B. (2012) "Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina sp.*: Influence of temperature, pH and preservatives". *Process Biochemistry*. **47**, 659.

Ficner, R. & Huber, R. (1993). "Refined crystal structure of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* at 0.23-nm resolution and localization of the gamma subunit". *European Journal of Biochemistry*. **218**, 103.

Figueruelo & Dávila, M. (2004). *Química física del medio ambiente y de los procesos medioambientales*. Barcelona: Editorial Reverté.

Gantt, E. (1980). "Structure and function of phycobilisomes: light harvesting pigment complexes in red and blue-green algae." *International Review of Cytology*. **66**, 45.

Gantt, E. (1981). "Phycobilisomes". *Annual Review of Plant Physiology*. **32**, 327–347

Glazer, A. A. & Hixson, C. S. (1977). "Subunit structure and chromophore composition of rhodophytan phycoerythrins. *Porphyridium cruentum* B-phycoerythrin and b-phycoerythrin." *Journal of Biological Chemistry*. **252**, 32.

Glazer, A.N., (1976). "Phycocyanins, structure and function." *Journal of Photochemistry and Photobiology Review*. **1**, 71.

Glazer, A.N., (1981). "Photosynthetic Accessory Proteins with Bilin Prosthetic Groups. The Biochemistry of Plant." En M.D. Hatch & N.K. Boardman (eds.). *The biochemistry of Plants* (pp 51) New York: Academic Press.

Glazer, A. N. (1984). "Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer". *Biochimica et Biophysica Acta*, **768**, 29.

Glazer, A.N. & Wedemayer, G.J. (1995). "Cryptomonad phycobiliproteins an evolutionary perspective". *Photosynthesis Research*. **46**, 93.

González-Ramírez, E., Andújar-Sánchez, M., Ortiz-Salmerón, E., Bacarizo, J., Cuadri, C., Mazzuca-Sobczuk, T., Ibáñez, M.J., Cámara-Artigas, A., Martínez-Rodríguez, S. (2014) "Thermal and pH Stability of the B-Phycoerythrin from the Red Algae *Porphyridium cruentum*". *Food Biophysics*. **9**,184.

Ibáñez-Gonzalez, M.J., Mazzuca-Sobczuk, T., Molina-Grima, E. (2013) Procedimiento de purificación de biomoléculas que utiliza cromatografía de adsorción en lecho expandido. Patent ES2383866, B1.

Martelli, G., Folli, C., Visai, L., Daglia, M. & Ferrari, D. (2014). "Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications". *Process Biochemistry*. **49**, 154.

Munier, M., Jubeau, S., Wijaya, A., Morançais, M., Dumay, J., Marchal, L., Jaouen, P., Fleurence, J. (2014) "Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium Cruentum*". *Food Chemistry*. **150**, 400.

Ornstein, L. (1964) "Disc electrophoresis-I. Background and theory". *Annals of the New York Academy of sciences*. **121**, 321.

Shapiro, A., Viñuela, E., Maizel, J.V. (1967) "Molecular Weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-poliacrylamide gels". *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **28**, 815.

Páginas Web

Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos, FDA
<http://www.fda.gov/ForIndustry/ColorAdditives/ColorAdditivesinSpecificProducts/InFood/ucm130054.htm>.

Clasificación europea de colorantes autorizados
http://europa.eu/legislation_summaries/other/l21068a_es.htm