

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 197 820**

21 Número de solicitud: 200201398

51 Int. Cl.7: **C07K 14/405**

C07K 1/16

C07K 14/795

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **17.06.2002**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.01.2004**

Fecha de la concesión: **31.01.2005**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.03.2005**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.03.2005

73 Titular/es: **Universidad de Granada
Cuesta del Hospicio, s/n
18071 Granada, ES
Universidad de Jaén y
Universidad de Almería**

72 Inventor/es: **Bermejo Román, Ruperto;
Acien Fernández, Francisco Grabiél;
Ibáñez González, María José;
Álvarez Pez, José María y
Molina Grima, Emilio**

74 Agente: **Herrera Dávila, Álvaro**

54 Título: **Proceso para la obtención y purificación de B-ficoeritrina.**

57 Resumen:

Proceso para la obtención y purificación de B-ficoeritrina. Proceso en tres etapas para la obtención y purificación de la proteína B-ficoeritrina procedente de la microalga *Porphyridium cruentum* caracterizado por su alto rendimiento. La primera etapa consiste en una ruptura celular encaminada a liberar el material citoplasmático mediante un proceso de choque osmótico usando un tapón de ácido acético/acetato sódico. La segunda etapa utiliza un proceso cromatográfico en lecho expandido desarrollado en una columna de absorción rellena con un soporte absorbente iónico denominado Streamline-DEAE. Por último, la tercera etapa es un proceso adicional cromatográfico en columna de intercambio iónico de tipo clásico que utiliza como fase estacionaria un lecho de DEAE-celulosa DE-52.

ES 2 197 820 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Proceso para la obtención y purificación de B-ficoeritrina.

5 La presente invención se refiere a un proceso basado en las ventajosas propiedades de la cromatografía en lecho expandido para la purificación a elevado rendimiento de la proteína B-ficoeritrina procedente de la microalga marina *Porphyridium cruentum*.

10 La B-ficoeritrina es una macromolécula biológica perteneciente a la familia de las ficobiliproteínas con aplicaciones en diversos sectores industriales como consecuencia de sus extraordinarias propiedades espectrocópicas, tanto absorciométricas como fluorimétricas. En concreto, su elevado coeficiente de extinción molar a $\lambda = 540$ nm, le confiere un intenso color rosa brillante muy apropiado para su empleo como colorante natural, mientras, que su alto rendimiento cuántico de fluorescencia permite su detección con mayor sensibilidad que otros fluorocromos convencionales.

15 Las ficobiliproteínas son una familia de proteínas que poseen grupos prostéticos tetrapirrólicos, denominados bilinas, que en su estado funcional se encuentran enlazados covalentemente a los residuos cisteína de las cadenas de las apoproteínas. Estas proteínas se encuentran en unas algas verde-azuladas denominadas cianobacterias en, una clase de algas unicelulares biflageladas eucariotas denominadas algas
20 criptomonadales y en las algas rojas o rodofitas. En todos estos organismos las ficobiliproteínas actúan como pigmentos fotosintéticos accesorios y están organizadas formando parte de unas macroestructuras celulares denominadas ficobilisomas. Atendiendo a sus propiedades espectroscópicas de absorción se clasifican en tres grupos principales: ficoeritrinas (PEs, \square max -540-570 nm), ficocianinas (PCs \square max -610-620 nm) y aloficocianinas (APCs \square max -650-655 nm). A su vez, las principales clases de ficoeritrinas se diferencian igualmente en sus características absorciométricas: B-Pes \square max -546, 565 nm y un
25 hombro a 499 nm, R-Pes \square max -499, 568 nm y un hombro a 545 nm y C-Pes \square max -565 nm.

Debido a sus ventajosas propiedades espectrales, así como a su estabilidad y condiciones de solubilidad, las ficobiliproteínas se utilizan actualmente en multitud de aplicaciones, entre las que destacan
30 su uso como marcadores fluorescentes de células y macromoléculas en investigación biomédica y clínica y en diversas técnicas fluorimétricas. Otra aplicación de las ficobiliproteínas es su uso como colorantes naturales en alimentación y cosmética reemplazando a colorantes de tipo sintético que, en general, suelen ser tóxicos e incluso cancerígenos. Por último, se conoce también su importante valor terapéutico debido a su actividad inmunomoduladora y anticancerígena.

35 Dentro de la familia de las ficobiliproteínas, la B-ficoeritrina es la mejor elección para el conjunto de aplicaciones citadas como consecuencia de sus características espectroscópicas más ventajosas, debido a su alto coeficiente de extinción molar al disponer de 32 cromóforos en su molécula. Además, los acoplamientos intermoleculares de los cromóforos le confieren un elevado rendimiento cuántico de fluorescencia, en una región espectral distinta a la región en que se presenta la auto-fluorescencia en las preparaciones
40 biológicas (motivada por la presencia de triptófano y otros pigmentos fluorescentes). En adición, posee un mayor desplazamiento de Stokes que la mayoría de los fluorocromos orgánicos comúnmente utilizados como marcadores fluorescentes. Todas estas ventajas hacen que la B-ficoeritrina se esté utilizando en la actualidad como marcador fluorescente conjugado a anticuerpos, lectinas, polisacáridos, DNA y otras macromoléculas y macroestructuras supramoleculares. También se usa en el diseño y caracterización de
45 elementos fotosensibles en biosensores. Otras utilidades, debidas a su intenso y único color rosa, son el empleo como colorante natural en preparaciones cosméticas, farmacéuticas y de la industria alimentaria.

Es habitual que los esquemas de purificación de proteínas, contengan frecuentemente un considerable número de etapas que, a su vez, se suelen dividir en subetapas que, usualmente, no son escalables. En el
50 estado de la técnica actual, la B-ficoeritrina se obtiene mediante metodologías que utilizan tratamientos previos que involucran ruptura celular usando ultrasonidos, congelación-descongelación, tratamiento con lisozima, etc., posterior precipitación con sulfato amónico y procesos de diálisis, seguidos de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración por gel o bien cromatografía de adsorción sobre hidroxiapatito. Todos estos procedimientos presentan algunos inconvenientes que hasta ahora han limitado la
55 obtención de cantidades elevadas de esta proteína, de entre los cuales cabe destacar:

- Poseen rendimientos globales bajos: porque la abundancia de etapas en los procesos de purificación conlleva una paralela y significativa pérdida del producto de interés al no optimizar cada una de las etapas utilizadas al objeto de minimizar esas pérdidas.

- Son económicamente muy costosos: porque involucran una gran cantidad de etapas y subetapas que repercuten negativamente en el coste global medio de producción.

- No son escalables: porque los procesos implicados en la obtención del producto no han sido estudiados nada más que a escala analítica de laboratorio y en la mayoría de los casos las etapas que se precisan no permiten su posterior escalado para pasar el proceso a nivel planta piloto o industrial.

- Pueden alterar la estructura nativa de la proteína: porque algunas de las etapas utilizadas en las comentadas metodologías utilizan sistemas físicos o químicos que influyen en la estructura de la proteína a purificar, sin que se haya estudiado la posible reversibilidad o irreversibilidad de los efectos producidos en la macromolécula por los mencionados tratamientos.

Por todo lo anterior, la presente invención aporta respecto al estado de la técnica actual en relación con el proceso de obtención de B-ficoeritrina de alta pureza, un mayor rendimiento del proceso, del orden del 66 % del contenido de la proteína en la biomasa de la microalga, y una reducción de costes de obtención. Además, a diferencia de los procesos propuesto por el estado de la técnica actual, las etapas en que se divide la purificación son fácilmente escalables.

Se describen a continuación las tres etapas para la obtención y purificación de la citada proteína; La primera etapa en el proceso de obtención es el pretratamiento inicial. En ella se mezclan la biomasa de microalga con tampón ácido acético/acetato sódico 1 M pH 5.5. Tras la correspondiente homogeneización, se produce la ruptura celular debido al choque osmótico originado por la elevada fuerza fónica del tampón utilizado, lo que permite la liberación del contenido intracelular del cual forman parte los ficobilisomas que son las macroestructuras que contienen las ficobiliproteínas. Estas constituyen el 2 % del peso seco del *Porphyridium cruentum* empleado.

A continuación; el homogeneizado se somete a un proceso de centrifugación que sedimenta las macroestructuras supramoleculares (como restos de paredes celulares) y proporciona un sobrenadante (extracto crudo) en el que se encuentran solubilizadas la mayor parte de los componentes del alga. En este extracto crudo, junto a otras macromoléculas y solutos moleculares, se encuentran las ficobiliproteínas características del alga, que son: B-ficoeritrina, R-ficocianina y aloficocianina.

La segunda etapa de esta metodología consiste en la utilización de una columna cromatográfica de adsorción en lecho expandido constituida por Streamline-DEAE como fase adsorbente. Es la etapa más importante de la invención ya que permite eliminar otras complicadas etapas de anteriores metodologías. Se han estudiado y optimizado las características y condiciones que deben tener tanto la columna de lecho expandido, como la fase móvil utilizada y la muestra a cromatografiar. Los resultados muestran que utilizando una fase móvil compuesta por tampón acético/acetato 50 mM pH 5.5, tras la aplicación de la muestra a la columna, se adsorbe preferencialmente la B-ficoeritrina, mientras que, la práctica totalidad del resto de componentes existentes en el extracto crudo procedente del tratamiento inicial, no son retenidos en la fase adsorbente. Tras la aplicación de la muestra, se lleva a cabo la elución de las proteínas adsorbidas dejando sedimentar el lecho expandido, de tal forma que se trabaja en formato empaquetado o clásico. En la elución se utiliza una fase móvil compuesta por tampón de acetato 250 mM. En estas condiciones se consigue la separación de la práctica totalidad de la B-ficoeritrina retenida, junto a una pequeña cantidad de R-ficocianina. El porcentaje de recuperación en esta segunda etapa o rendimiento medio de la misma, depende directamente de la viscosidad de la muestra que se aplica a la columna de lecho expandido y de la cantidad de proteína cargada en la fase de aplicación (es decir, de la relación mg B-ficoeritrina/ml de adsorbente). La Tabla 1 muestra la influencia de estos parámetros en el porcentaje total de recuperación logrado en esta segunda etapa.

TABLA 1

Viscosidad ($\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$) (extracto crudo)	Rendimiento medio (%) recuperación	B-ficoeritrina cargada (mg)	Ratio (mg B-PEI ml adsorbente)
0.00117	54.3	492	8.65
0.00110	63.8	238	3.22
0.00104	72.0	122	1.65
0.00102	80.0	65	0.88

Estos resultados evidencian que ha de utilizarse una viscosidad en la muestra que evite la formación de canales preferentes en el lecho expandido, lo que contribuiría a una distribución desigual de la muestra en el lecho cromatográfico produciendo una pérdida en el rendimiento del proceso.

5 Las muestras eluidas de la columna, se recogen y analizan mediante espectroscopia de absorción y electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida y en presencia de lauril sulfato sódico (SDS-PAGE). Estas técnicas analíticas muestran que las fracciones recogidas corresponden a disoluciones concentradas de B-ficoeritrina, con pequeñas impurezas de R-ficocianina, que no ha sido eliminada totalmente en el proceso cromatográfico en lecho expandido.

10 La tercera etapa de esta metodología consiste en la utilización de una columna cromatográfica de intercambio iónico que utiliza como fase estacionaria al cambiador aniónico DEAE-celulosa, funcionando en formato empaquetado. La muestra procedente de la segunda etapa se aplica a la cabeza de la columna y, seguidamente, se desarrolla utilizando un gradiente discontinuo de fase móvil. Inicialmente, se trata
15 con tampón aceticolacetato 50 mM pH 5.5, que permite la retención de B-ficoeritrina en el soporte sólido mientras que, la R-ficocianina que contiene la muestra, no es retenida y eluye en el frente de fase móvil recogándose a la salida de la columna. A continuación se aumenta la fuerza iónica de la fase móvil hasta 250 mM. Con ello se provoca la elución de la B-ficoeritrina enlazada inicialmente y permite la obtención de una disolución constituida por la proteína pura, como demuestran los análisis espectroscópico y electroforético. Además, el análisis adicional, por anisotropía de emisión en estado estacionario, muestra
20 que la proteína conserva la estructura hexamérica, tal y como se encuentra en su forma nativa, en los ficobilisomas del organismo de procedencia.

A continuación se hace una descripción de realización concreta del proceso para la obtención y purificación de b-ficoeritrina, con el único objetivo de incluir un ejemplo de aclaración en la aplicación de las
25 novedades aportadas con la invención.

Primera etapa

30 Se utilizaron partidas de la microalga congelada para su almacenamiento y transporte. La biomasa, tras su descongelación, se resuspendió en tampón ácido acético/acetato sódico 1 M pH 5.5, utilizando una razón de 0.8 litros de tampón por cada kilogramo de biomasa húmeda. Tras una hora de agitación mecánica, para conseguir la ruptura celular por choque osmótico, el homogeneizado resultante se centrifugó a 2.500 g durante 5 minutos, obteniéndose un sobrenadante (extracto crudo) y un sedimento que
35 fue desechado. Al extracto crudo, se añadió ácido sódico, como conservante, hasta una concentración del 0.01 % y se guardó a 4°C hasta su posterior utilización. La determinación de la cantidad de B-ficoeritrina contenida en el extracto crudo dió un valor del 92 % de recuperación.

Segunda etapa

40 Se equilibró con un litro de tampón aceticolacetato 50 mM pH 5.5, una columna de vidrio de 2.5 cm de diámetro y 50 cm de altura conteniendo 74 ml de cambiador iónico Streamline-DEAE, lo que generó una altura de lecho empaquetado de unos 15 cm. El lecho se expandió con un progresivo aumento del caudal de fase móvil impulsado con una bomba peristáltica, desde un valor inicial de 8 cm³/min hasta
45 uno final de 16.4 cm³/min. Dividiendo la velocidad de flujo entre la sección transversal de la columna (4.9 cm²) se obtiene una velocidad de flujo por sección entre 98 y 200 cm×h⁻¹. Llegado a este punto, el lecho alcanzó una altura estable de 30 cm equivalente al doble de la altura inicial de lecho empaquetado.

El extracto crudo procedente del tratamiento inicial se diluyó hasta una viscosidad de 1.02 mPoiseuilles, con una relación mg de B-ficoeritrina/ml de adsorbente igual a 0.88. A continuación, 2.200 ml de esta disolución tamponada con aceticolacetato 50 mM pH 5.5, se bombearon a través de la columna de lecho expandido a una velocidad de 200 cm/h. Después de la aplicación de la muestra, la columna se lavó con 900 ml del mismo tampón utilizado en la aplicación de la muestra a la misma velocidad de flujo e igual grado de expansión en el lecho cromatográfico. Con ello se consiguió que la pérdida de B-ficoeritrina
50 en las fases de aplicación y lavado, fuese prácticamente inapreciable.

A continuación se procedió a la elución en formato de lecho clásico. lo que se logró cortando el flujo de fase móvil y dejando sedimentar el lecho expandido hasta la configuración empaquetada. La B-ficoeritrina adsorbida en el lecho expandido se eluyó utilizando tampón acético/acetato 250 mM pH 5.5
60 y una velocidad de flujo de 86 cm/h. Las fracciones recogidas fueron de color rosa intenso. El análisis mediante espectroscopia de absorción UV-Visible y electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) demostró la presencia mayoritaria de B-ficoeritrina junto a una pequeña cantidad de R-ficocianina. El porcentaje

ES 2 197 820 B1

de recuperación en esta etapa fue del 80 % expresado como porcentaje de cantidad total de B-ficoeritrina en el eluato por cantidad de proteína cargada en la columna.

5 En resumen, esta etapa de cromatografía en lecho expandido incluye: un proceso de equilibración (30 minutos), otro de aplicación de la muestra (130 minutos), un tercero de lavado de la columna (50 min) y finalmente la elución en formato empaquetado (60 min), lo que constituye un total de 4.5 horas de operación.

Tercera etapa

10

Los resultados de la segunda etapa demuestran que la purificación hasta homogeneidad de B-ficoeritrina precisa de una etapa adicional que se concreta en la necesidad del empleo de cromatografía de intercambio aniónico en lecho estacionario de DEAE-celulosa DE-52. La disolución obtenida en la anterior etapa se aplicó a una columna de vidrio de 9 cm de diámetro interno y 15 cm de altura equilibrada con tampón acetilacetato 50 mM pH 5.5. Seguidamente, la columna se desarrolló con 1.000 ml de tampón acetilacetato 250 mM, lo que permitió obtener un eluato de B-ficoeritrina, visualizado como una intensa banda rosa. A continuación se procedió al lavado de la columna con tampón acético/acetato 350 mM pH 5.5. En todas las fases de este proceso cromatográfico, la velocidad de flujo se mantuvo constante e igual a 1.300 ml×h-1. Las fracciones recogidas se analizaron mediante espectroscopia de absorción y de fluorescencia, así como mediante electroforesis. Los resultados son consistentes con los mencionados en la bibliografía para disoluciones puras de B-ficoeritrina. El rendimiento de esta etapa cromatográfica fue del 90 %.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Proceso de obtención y purificación de B-ficoeritrina, mediante la ruptura celular por choque osmótico, utilizando cromatografía de adsorción en lecho expandido.

5

2. Proceso de obtención y purificación de B-ficoeritrina según reivindicación 1, en la que después de la ruptura celular mediante cromatografía de adsorción en lecho expandido se emplea cromatografía de intercambio iónico en lecho empaquetado clásico.

10

3. Proceso de obtención y purificación de B-ficoeritrina según reivindicación 1, **caracterizado** por la obtención de disoluciones concentradas de B-ficoeritrina con ligeras impurezas de R-ficocianina y otras proteínas.

15

4. Proceso de purificación de B-ficoeritrina según reivindicaciones 1 y 3, **caracterizado** por utilizar una primera etapa de ruptura celular mediante choque osmótico, usando para ello tampón acético/acetato 1 M pH 5.5 y la correspondiente mezcla y homogeneización mecánica durante 1 hora y posterior centrifugación a 25.000 g durante 10 minutos, a temperatura ambiente.

20

5. Proceso de purificación de B-ficoeritrina según reivindicaciones 1 y 3, **caracterizado** por utilizar una segunda etapa consistente en la utilización de una columna cromatográfica de lecho expandido de 2.5 cm de diámetro interno y 50 cm de altura, desarrollada utilizando fase móvil constituida por tampón acético/acetato 50 mM pH 5.5, en las fases de aplicación de la muestra y lavado de la columna y tampón acético/acetato 250 mM en la fase de desorción.

25

6. Proceso de purificación de B-ficoeritrina mediante cromatografía en lecho expandido según reivindicaciones 1, 3 y 5, **caracterizado** por la utilización de una velocidad de flujo de fase móvil de 200 cm h⁻¹, en las fases de aplicación de la muestra y lavado de la columna y de 86 cm h⁻¹ en la fase de elución de la muestra mediante cromatografía en lecho expandido.

30

7. Proceso de purificación de B-ficoeritrina según reivindicaciones 1 y 3, **caracterizado** por utilizar una tercera etapa consistente en la utilización de una columna cromatográfica de intercambio iónico en lecho empaquetado clásico, de 15 cm de diámetro interno y 30 cm de altura, desarrollada utilizando fase móvil constituida por tampón acético/acetato 50 mM pH 5.5, en las fases de equilibrado y aplicación de la muestra y tampón acético/acetato 250 mM en la fase de elución.

35

8. Proceso de purificación de B-ficoeritrina según reivindicaciones 1, 3 y 7, **caracterizado** por el empleo de una velocidad de flujo de fase móvil de 1.300 ml×h⁻¹ en las fases de aplicación, elución y lavado de la columna.

40

45

50

55

60



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 197 820

② Nº de solicitud: 200201398

③ Fecha de presentación de la solicitud: 17.06.2002

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C07K 14/405, 1/16, 14/795

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BERMEJO ROMÁN, R. et al.: Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga Porphyridium cruentum", J. Biotechnol., (2002), Vol. 93, nº 1, páginas 73-85, 31.01.2002, ISSN:0168-1656, todo el documento.	1-8
A	TCHERUOV, A. et al.: "Method for B-phycoerythrin purification from Porphyridium cruentum", Biotechnol. Techniques, (1993), Vol. 7, nº 12, páginas 853-858, ISSN:0951-208X.	1-8
A	BERMEJO ROMÁN, R. et al.: Chromatographic purification and characterization of B-phycoerythrin from Porphyridium cruentum. Semipreparative high-performance liquid chromatographic separation and characterization of its subunits", J. Chromatography A, (2001), Vol. 917, nº 1-2, páginas 135-145, todo el documento.	1-8
A	SHAOHONG, W. et al.: "Separation and purification of B-phycoerythrin in Porphyridium cruentum", Zhongguo Haiyang Yaowu, (2001), Vol. 20, nº 3, páginas 33-35, ISSN:1002-3461, (resumen) HCAPLUS [en línea]. Columbus, OH (USA), [recuperado el 28.10.2003], Nº de acceso: 2001:624890, DN: 136:290656.	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

31.10.2003

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1