

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



# ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA C-FICOCIANINA

---

Memoria Trabajo Fin de Grado

Lucía del Carmen Moreno García

Julio de 2016

*Facultad de Ciencias Experimentales  
Área de Química Física. Departamento de Química y Física*



# ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA C-FICOCIANINA

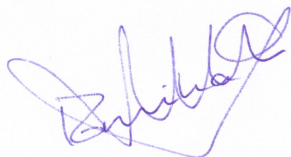
*Memoria del Trabajo Fin de Grado presentada por Lucía del Carmen Moreno García.*

Almería, Julio de 2016



Fdo.: Lucía del Carmen Moreno García

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

<b>I. Antecedentes bibliográficos</b>	<b>1</b>
1.1 Introducción	1
1.2 Ficobiliproteínas	1
1.3 Ficocianina	3
<b>II. Objetivos</b>	<b>5</b>
<b>III. Parte experimental</b>	<b>7</b>
3.1 Materiales	7
3.1.1 Reactivos	7
3.1.2 Instrumentación	7
3.2 Métodos	7
3.2.1 Cromatografía de exclusión molecular	7
3.2.2 Electroforesis	9
3.2.2.1 Fundamento de las separaciones electroforéticas	10
3.2.2.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Dodecil Sulfato Sódico (SDS-PAGE)	10
3.2.2.3 Reactivos	12
3.2.2.4 Procedimiento	13
3.2.2.5 Tinción de los geles de acrilamida	15
3.2.2.6 Secado de los geles de acrilamida	15
3.2.2.7 Cálculo de la masa molecular por electroforesis en presencia de SDS	15
3.2.3 Espectroscopía UV-visible	16
3.2.4 Espectroscopía de fluorescencia	19
<b>IV. Resultados y discusión</b>	<b>21</b>
4.1 Determinación de la masa molecular y pureza	21
4.2 Influencia del pH	23
4.3 Influencia de la temperatura	24
4.4 Influencia el tiempo de incubación	26
4.5 Influencia de la luz	28
4.6 Influencia de azida	30
<b>V. Conclusiones</b>	<b>39</b>
<b>VI. Bibliografía</b>	<b>41</b>



## I. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### 1.1 Introducción

Las características de un alimento hacen referencia a su textura, sabor y apariencia. Estos atributos influyen bastante a lo que la compra se refiere, ya que el hecho de aceptar o rechazar un producto está muy influenciado por su apariencia, fundamentalmente por su color. Es por ello, que hoy en día existen muchos colorantes como aditivos en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, así como en las investigaciones biomédicas y de diagnóstico clínico (Dasgupta, 2015).

Los colorantes se dividen en dos grandes grupos: naturales y sintéticos. El uso de estos últimos está ampliamente difundido en la industria alimentaria debido a que son solubles en agua, económicos, permiten la combinación de colores, son estables y fáciles de usar. Sin embargo, estos colorantes presentan un alto efecto tóxico, alergénico e incluso carcinógeno (Weesepeol et al, 2015), por lo que han obligado a la industria a buscar otras alternativas que mantengan el color de los alimentos. Por este motivo, actualmente están reemplazando los colorantes sintéticos por colorantes de origen natural. A pesar de las ventajas que presenta el uso de colorantes naturales, tanto la cantidad como la gama de colores son escasos en relación con las necesidades reales de los tipos de industrias que las requieren (Arad et al, 1992; Ruiz-Ruz et al, 2013).

Los colorantes naturales que se obtienen a partir de organismos vivos, se denominan biocolorantes, siendo muy escasos y la mayoría son poco estables a las condiciones de tratamiento térmico y conservación. Una de las fuentes más importantes son las algas, con un gran interés debido a su aplicación como fuente natural de pigmentos, lípidos, ácidos grasos, proteínas, polisacáridos y compuestos fenólicos. De ellas se pueden obtener pigmentos naturales, como los que se encuentran en las ficobiliproteínas (González-Ramírez et al, 2014).

El uso de cualquier colorante natural requiere un conocimiento detallado de su estabilidad, con el fin de optimizar la producción industrial, embalaje y almacenamiento de los productos coloreados (Jespersen et al, 2004).

### 1.2 Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas son macromoléculas biológicas cuya estructura está formada por un complejo de proteína y un grupo cromóforo. Estos cromóforos, denominados ficobilinas, están formados por un grupo prostético tetrapirrólico lineal, que en su estado funcional está enlazado covalentemente a residuos de cisteína específicos de la proteína. Estas macromoléculas presentan color, por lo que sus máximos de absorción se encuentran en la zona visible del espectro (Bermejo et al, 2003; Marín-Prida et al, 2015).

Existen varios tipos de ficobiliproteínas con una absorción y fluorescencia específica, que viene dada por la interacción entre las ficobilinas y las cadenas polipeptídicas (cadena  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) mediante enlaces covalentes. Las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  pueden formar agregados tales como dímeros, trímeros o hexámeros. El estado de agregación de la ficobiliproteína depende de la fuerza iónica, del pH, la temperatura, la presencia de agentes

desnaturalizantes, composición del tampón y concentración de la proteína (Saxena, 1988).

Según sus propiedades espectroscópicas, las ficobiliproteínas se dividen en cuatro grandes grupos (Tabla 1):

- **Ficoeritrinas (PE)**: con máximos de absorción entre 540-570 nm. Presentan un color rojo o naranja fluorescente. En este grupo se pueden encontrar dos tipos de ficobilinas, la ficoeritrobilina (PEB) y la ficourobilina (PUB). Tienen dos o tres ficobilinas en la subunidad  $\alpha$  y tres en la subunidad  $\beta$ .
- **Ficocianinas (PC)**: cuyos máximos de absorción se encuentran entre 610-620 nm. Se caracterizan por su color azul debido a la ficocianobilina (PCB), su cromóforo. Tienen un cromóforo en la subunidad  $\alpha$  y dos en la subunidad  $\beta$ . La R-Ficocianina es una ficocianina especial que además de PCB posee PEB.
- **Aloficocianinas (APC)**: sus máximos de absorción están entre 650-655 nm. Poseen un color púrpura y su cromóforo es la ficocianobilina (PCB). Tienen un PCB en la subunidad  $\alpha$  y otro en la subunidad  $\beta$ .
- **Ficoeritrocianinas (PEC)**: con máximos de absorción entre 570 y 595 nm. Solamente unas pocas cianobacterias presentan este grupo. Sus cromóforos son PCB y ficobiliviolina (PXB).

Esta clasificación está relacionada con el número y especies de ficobilinas que contienen en su estructura. El color y las características de absorción de estas ficobiliproteínas viene dado por el tipo de cromóforo unido a la proteína y la forma en la que estos se enlazan (Glazer, 1984).

*Tabla 1: Máximos de absorción y de emisión de las biliproteínas.*

<b>Ficobiliproteína</b>	<b><math>\lambda_{\max}</math> Absorción (nm)</b>	<b><math>\lambda_{\max}</math> Emisión (nm)</b>
Ficoeritrinas (PE)		
B-Ficoeritrina (BPE)	498, 543, 562	576
C-Ficoeritrina (CPE)	565	575-581
R-Ficoeritrina (RPE)	495, 536, 564	576
Ficocianina (PC)		
C-Ficocianina (C-PC)	615-620	630-642
R-Ficocianina (R-PC)	618, 555	642
Aloficocianina (APC)	650 (hombro a 620)	660
Ficoeritrocianinas (PEC)	568 (hombro a 585)	

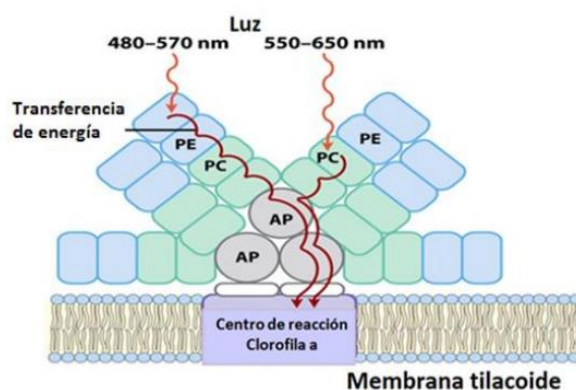
Las ficobiliproteínas se pueden encontrar en las cianobacterias, normalmente conocidas como algas verdes azuladas, en los cloroplastos de las algas rojas y en las criptofíceas, una clase de algas unicelulares eucariotas (Bermejo et al, 2003). En todos estos organismos actúa como accesorio fotosintético, es decir, absorben luz en un amplio intervalo de longitud de onda del espectro visible y transfieren la energía de excitación, mediante procesos no radiativos, hacia los centros de reacción situados en las membranas fotosintéticas donde se convierte en energía química (Glazer, 1984).

Tanto en el interior de las cianobacterias como en los cloroplastos de las algas rojas, las ficobiliproteínas forman agregados moleculares, denominados ficobilisomas. Estos se



encuentran en la superficie de las membranas tilacoidales y actúan como pigmentos antena que absorben la luz y canalizan la energía de excitación.

Su estructura está formada por un núcleo central constituido por tres cilindros. Cada uno de estos está comprendido por cuatro discos apilados y seis varillas radiales que parten del núcleo central, cada una de las cuales está compuesta por varios discos apilados. El 85 % de estos ficobilisomas están compuestos por ficobiliproteínas, las cuales se organizan en orden a su máxima absorción, es decir, ficoeritrinas en la periferia, ficocianinas en el centro y aloficocianinas muy cerca de los centros de reacción en la membrana tilacoidal. Por lo que, la ruta de transferencia de la energía dentro de la célula sigue este orden (Figura 1) (Bryant et al, 1979; Gantt, 1980).



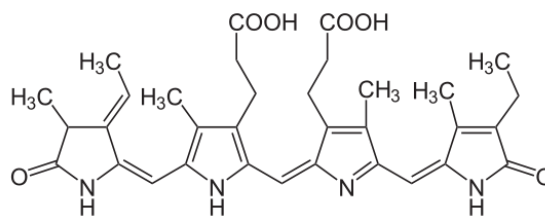
*Figura 1: Estructura de un ficobilisoma.*

### 1.3 Ficocianina

La ficocianina es uno de los cuatro grandes grupos en los que se dividen las ficobiliproteínas según sus propiedades espectroscópicas, como se ha mencionado anteriormente. Se encuentra como una mezcla compleja de monómeros, trímeros, hexámeros y otros oligómeros. Su masa molecular varía de 44 a 260 kDa (Chaiklahan et al, 2012). La masa molecular, la posición y la intensidad del máximo de absorción de la ficocianina dependen del estado de agregación, que se encuentra influenciado por parámetros tales como el pH de la disolución, la temperatura, la concentración de la proteína y el origen de alga de la que procede (Jespersen et al, 2004).

Se distinguen dos tipos de ficocianinas:

- **C-Ficocianina:** cuyo cromóforo se denomina ficocianobilina (PCB) ( $C_{33}H_{38}N_4O_6$ ), responsable del color azul que es característico de esta proteína. Este se encuentra tres veces en su estructura, uno de ellos unido a la cisteína 84 de la cadena  $\alpha$  y los otros dos a las cisteínas 84 y 155 de la cadena  $\beta$  (Marín-Prida et al, 2015). Tiene un máximo de absorción entre 615-620 nm (Gantt, 1980; Glazer, 1984). La ficocianobilina, tal y como se muestra en la Figura 2, es un compuesto prostético tetrapirrólico lineal unido covalentemente mediante enlaces tioéter a residuos específicos de cisteína, propios de la cadena polipeptídica de dicha proteína (Marín-Prida et al, 2015).



**Figura 2:** Estructura de la ficocianobilina (PCB).

- **R-Ficocianina:** es una ficocianina especial, ya que además de la ficocianobilina posee también la ficoeritrobilina (Gantt, 1980; Glazer, 1984).

Una de las principales fuentes de este tipo de ficobiliproteínas, son las cianobacterias, también conocidas como algas verdes azuladas, pudiendo constituir hasta el 20 % de su peso en seco. Es soluble en agua y se puede extraer fácilmente como un complejo proteína-pigmento. El control del pH y el de la fuerza iónica durante dicha extracción junto con los procesos de separación y purificación son cruciales para la estabilidad de la ficocianina. La degradación de la ficocianina depende del estado de agregación de la proteína, que está influenciada por parámetros tales como la luz, la temperatura, el pH y la concentración de proteínas (Chaiklahan et al, 2012).

Entre las diversas aplicaciones que presenta esta proteína destacan las siguientes:

- En diversos sectores industriales se utiliza como colorante tanto para alimentos como para cosméticos. Algunos ejemplos son la goma de mascar, los sorbetes de hielo, los refrescos, los dulces, la barra de labios y los delineadores de ojos.
- Como trazadores bioquímicos en inmunoensayo debido a sus propiedades fluorescentes.
- Se ha demostrado que tiene propiedades terapéuticas: esta proteína presenta capacidad anticancerígena, antioxidante y anti-inflamatoria (Chaiklahan et al, 2011).

El uso de esta proteína en alimentos y otras aplicaciones es limitado debido a su sensibilidad al tratamiento térmico, lo que conlleva a la modificación de su color azul característico. La azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) y ditiotreitól ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ ) son comúnmente utilizados como conservantes para el color de la ficocianina para fines analíticos, pero al ser tóxicos no se pueden utilizar en el ámbito alimenticio. Por otro lado, se encuentran los azúcares y alcoholes polivalentes que se han usado para estabilizar las proteínas, y están siendo utilizados ampliamente en la actualidad en la industria alimentaria, así como en formulaciones farmacéuticas, ya que estos sí son aptos para el consumo (Chaiklahan et al, 2012).

En este trabajo se realiza el estudio de la estabilidad de la C-Ficocianina en función de varios parámetros como son: pH, temperatura, tiempo de incubación y presencia o ausencia de luz y/o azida. Para ello utilizaremos las técnicas de espectrofotometría ultravioleta-visible y fluorescencia. Se determinará también el estado de agregación de la proteína en condiciones desnaturalizantes y nativas mediante electroforesis y cromatografía de exclusión molecular respectivamente, así como la determinación del grado de pureza de la misma. Esta proteína ha sido suministrada por el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería.

## II. OBJETIVOS

### OBJETIVOS

Los objetivos de forma general, que se pretenden alcanzar en el presente Trabajo Fin de Grado corresponden al inicio en las tareas propias de un laboratorio de Química, entre las que se incluyen:

- Búsqueda bibliográfica
- Preparación de disoluciones
- Diseño de experimentos
- Inicio en la utilización de diversas técnicas propias del laboratorio de Química Física: cromatografía, electroforesis, medidas UV-visible y fluorescencia, entre otras.
- Análisis de resultados

De forma más específica, los objetivos son:

- Caracterización Químico Física de la C-Ficocianina mediante técnicas cromatográficas y electroforéticas.
- Realización de un estudio exhaustivo mediante medidas de UV-visible y fluorescencia de la estabilidad de la C-Ficocianina en función de los siguientes factores:
  - pH
  - Temperatura
  - Tiempo de incubación
  - Presencia y ausencia de luz
  - Presencia y ausencia de azida



### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Materiales

##### 3.1.1 Reactivos

- Ácido clorhídrico, PANREAC
- Acrilamida/ Bis-acrilamida, SIGMA-ALDRICH
- Azul de bromofenol, MERCK
- B-mercaptoetanol, MERCK
- CHES, SIGMA
- Dodecil sulfato sódico (SDS), FLUKA
- Fosfato sódico dibásico, MERCK
- Fosfato sódico monobásico, MERCK
- Gel de sílice, Sephacryl S-300
- Glicerol, PANREAC
- Glicina, MERCK
- Hidróxido sódico, PANREAC
- N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina (TEMED), -Ridel de-Haën
- Persulfato amónico, SERVA
- Tris (Tris –hidroximetil-amino-metano) (TRIZMA), SIGMA

##### 3.1.2 Instrumentación

- Balanza de precisión, Mettler
- Centrifuga, Heraeus, modelo habofuge 400 function line
- Colector de fracciones, Amershan Biosciences, modelo Frac100
- Columna para cromatografía de exclusión molecular, Pharmacia
- Concentradores, Centriped-30
- Equipo de electroforesis, Mini-Protean Tetra Cell, Bio-Rad
- Espectrofluorímetro, Jasco Inc., modelo FP-6500
- Espectrofotómetro, Perkin Elmer, modelo Lambda 25
- pH metro, Crison, modelo micro-pH 2000

#### 3.2 Métodos

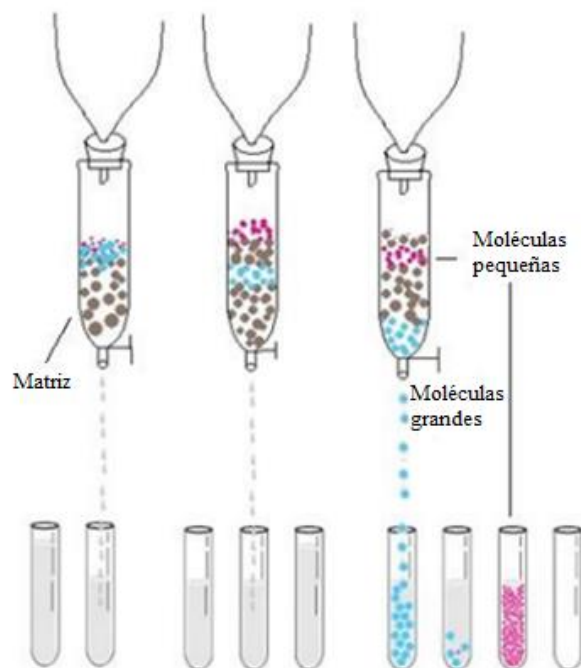
##### 3.2.1 Cromatografía de exclusión molecular

El término cromatografía está referido a un grupo de técnicas de separación en las que los componentes de una mezcla se distribuyen entre dos fases, una estacionaria y una móvil.

Cuando la fase móvil utilizada es líquida, generalmente tampones acuosos, a este tipo de cromatografía se la conoce como “cromatografía líquida”. Dentro de la cromatografía líquida hay varios tipos que se clasifican según su principio de

separación. En nuestro caso, se ha llevado a cabo la cromatografía de exclusión molecular donde la separación se realiza en base al tamaño de las moléculas.

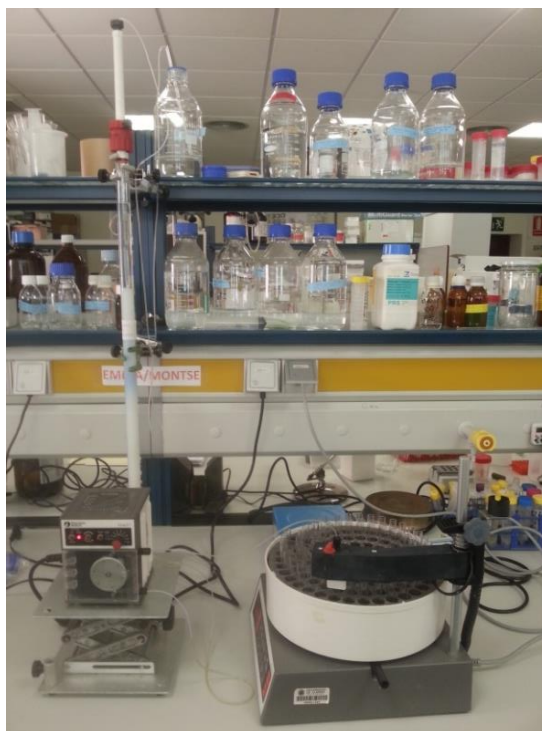
La cromatografía de exclusión molecular es una técnica muy valiosa que se aplica particularmente a especies de elevada masa molecular. Las matrices para este tipo de cromatografías están constituidas por pequeñas partículas de sílice que contienen una red de poros uniforme en los que puede difundir las moléculas del disolvente, lo que caracteriza a la fase estacionaria. Las moléculas que tienen diámetros menores que los poros son atrapadas eficazmente en ellos y así eliminadas temporalmente del flujo de la fase móvil. Las moléculas más grandes que el tamaño medio de poros son excluidas y de esta forma son las primeras que eluyen. Entre estos dos extremos, están las moléculas de tamaño intermedio cuya penetración media en los poros depende de su diámetro. En definitiva, las moléculas eluyen en orden decreciente a su 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).



**Figura 3:** Esquema general de la cromatografía de exclusión molecular.

En cromatografía de exclusión molecular se encuentran dos tipos de relleno, partículas poliméricas y partículas de sílice cuyos diámetros oscilan de 5 a 10  $\mu\text{m}$ . Los de sílice son los más comunes en la cromatografía de líquidos. Estos tienen la ventaja de una gran rigidez, lo que facilita el relleno y permite el empleo de presiones más elevadas; una mayor estabilidad, lo que permite el uso de una gran variedad de disolventes; una equilibración más rápida al cambiar el disolvente; y una buena estabilidad a elevadas temperaturas (Skoog et al, 2001). En este trabajo, la columna que se ha utilizado para llevar a cabo este tipo de cromatografía es la columna Sephacryl S-300 a temperatura ambiente, cuyo montaje se puede observar en la Figura 4. El primer paso es eliminar

todas las posibles burbujas de aire que pueda tener la columna. Después se procede a equilibrar la columna pasando tampón fosfato sódico pH 7 (50 mM) en el que se va a eluir la proteína. A continuación, se introduce en la columna aproximadamente 1 ml de proteína concentrada y se van recolectando fracciones de 3 ml. Finalmente se miden las absorbancias a 280 nm, 618 nm y 650 nm, obteniéndose el correspondiente perfil cromatográfico.



*Figura 4: Montaje de la columna Sephadex S-300.*

Como se ha mencionado anteriormente, se ha empleado el Sephadex S-300 como soporte para esta cromatografía. El Sephadex es un medio de filtración en gel altamente versátil que ofrece una amplia gama de capacidades de fraccionamiento. Su matriz es un copolímero entrecruzado de alil dextrano y N, N'-metilembisacrilamida. El Sephadex S-300 es uno de los cinco tipos de Sephadex que permite separar moléculas con masas moleculares entre  $1 \cdot 10^4$  Da- $1,5 \cdot 10^6$  Da. Es estable en un intervalo de pH entre 3 y 12, en tampón fosfato 50 mM y es resistente a la mayoría de los compuestos utilizados en cromatografía de líquidos exceptuando hidrocarburos, hidrocarburos aromáticos y clorados. Pueden almacenarse en etanol al 20 % en un intervalo de temperaturas de 4 °C a 30 °C.

### 3.2.2 Electroforesis

La electroforesis es un método de separación que se basa en la diferente velocidad de migración de las especies cargadas a través de un campo eléctrico (Skoog et al, 2001). La capacidad de esta migración es debida a que la carga neta que presentan todas las proteínas a cualquier pH es distinto al de su punto isoeléctrico (pI), por lo cual, al aplicar un campo eléctrico a la disolución, las moléculas de soluto con carga neta

positiva se desplazan hacia el cátodo y las moléculas con carga neta negativa se desplazan hacia el ánodo (Laemmli, 1970).

Esta técnica presenta la capacidad de separar e identificar macromoléculas de interés tanto en la industria biotecnológica como en la investigación biológica y bioquímica, ya que las técnicas electroforéticas permiten la determinación de la masa molecular de las especies. Durante muchos años la electroforesis ha sido un ingenioso método de separación de proteínas (enzimas, hormonas, anticuerpos) y ácidos nucleicos (ADN, ARN) (Skoog et al, 2001).

### 3.2.2.1 Fundamento de las separaciones electroforéticas

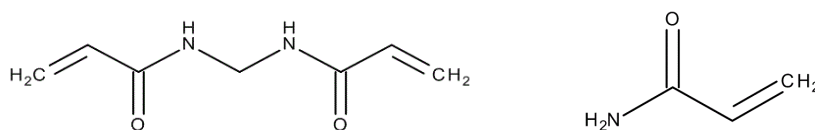
La velocidad de migración de un ión depende de la fuerza ejercida por el campo eléctrico y la fuerza de rozamiento que ejerce el entorno sobre la partícula. Cuando se activa el campo eléctrico, la molécula se acelera rápidamente hasta alcanzar una velocidad en la que estas fuerzas se equilibran, moviéndose posteriormente a esa velocidad de forma constante (Lehninger et al, 2015).

La velocidad de migración de una especie dada depende de su carga y también de su tamaño, por ello, las separaciones se basan en las diferencias en la relación carga-tamaño entre los diferentes analitos presentes en la muestra. Cuanto mayor es esta relación, más rápido migra un ión en el seno del campo eléctrico. Es decir, cuanto mayor sea la carga, mayor será la movilidad y cuanto menor sea el ión (a igualdad de cargas), mayor será su movilidad (Skoog et al, 2001).

### 3.2.2.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Dodecil Sulfato Sódico (SDS-PAGE)

La electroforesis de proteínas se lleva a cabo en geles formados por el polímero entrecruzado poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés "*polyacrylamide gel electrophoresis*"). 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.

Los geles de poliacrilamida se forman por la copolimerización de monómeros de acrilamida, con un agente entrecruzador, N-N'- metilenbisacrilamida, cuyas estructuras se muestran en la Figura 5, para formar una red tridimensional (Figura 6). La polimerización de gel se inicia mediante radicales libres obtenidos por descomposición del persulfato amónico, uno de los compuestos utilizados en las técnicas electroforéticas, reacción catalizada por el TEMED. Los tamaños de los poros de la matriz del gel dependen tanto del porcentaje del monómero como el del agente entrecruzador.



**Figura 5:** Estructura de la acrilamida y la NN-metilenbisacrilamida.



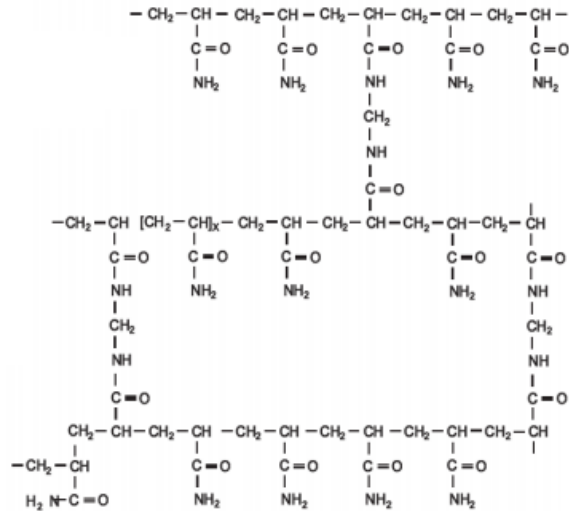


Figura 6: Estructura química del gel de poliacrilamida.

El método más utilizado para la electroforesis en gel de poliacrilamida es el de Laemmli, (Laemmli, 1970) utilizando la técnica de electroforesis discontinua, que permite una mayor resolución en la separación de las bandas de proteína. En esta electroforesis se utilizan dos tipos de geles, el gel apilador, de mayor diámetro de poro, y el gel separador, de menor diámetro, que presenta una mayor resistencia al desplazamiento de los componentes a través del gel. La función del gel apilador es 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, en el cual se lleva a cabo la separación de las proteínas en función de su masa molecular. El gel apilador tiene un bajo porcentaje de acrilamida para que la exclusión molecular sea mínima y el pH es diferente al del gel separador. Al aumentar la concentración de acrilamida el tamaño del poro efectivo disminuye. El gel apilador se sitúa sobre el separador dentro de unas placas de vidrio, como se puede observar la Figura 7.

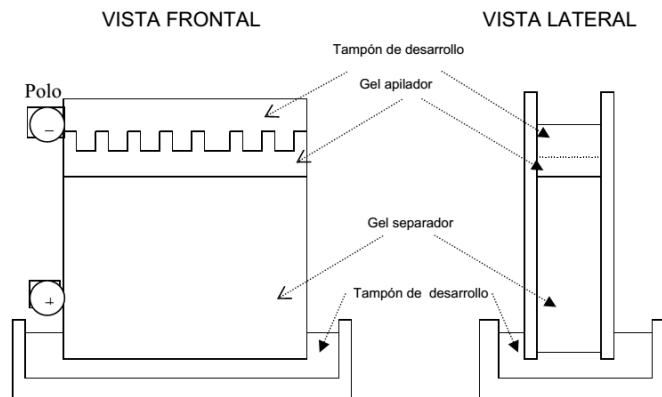
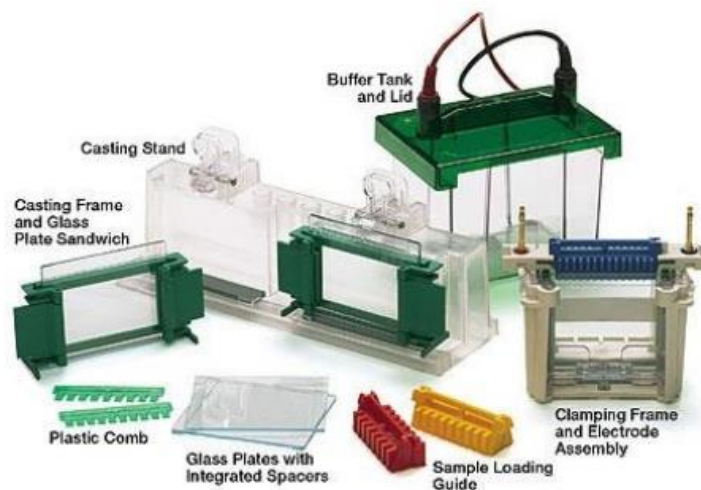


Figura 7: Vistas lateral y frontal de un montaje de electroforesis en lámina vertical. El paso de corriente eléctrica a través del gel desde el polo negativo hacia el polo positivo obliga a las proteínas a recorrerlo en este sentido, separándose unas de otras según su mayor o menor dificultad para penetrar por el entramado del gel separador.

Esta electroforesis se realiza en condiciones desnaturizantes, utilizando para este efecto el SDS. Debido a la presencia de este detergente aniónico se forman complejos proteína/SDS cargados negativamente, donde la cadena proteica es distendida. Dado que la relación final carga/masa queda constante para las distintas proteínas, estas van a ser separadas en el gel separador principalmente en base a sus diferencias de masa molecular, presentando la proteína una mayor movilidad cuanto menor tamaño tenga. Como se ha mencionado anteriormente, además de la capacidad para separar las proteínas, también se encuentra la de visualizarlas y para esto se utiliza un colorante conocido como azul de bromofenol, que se fija a las proteínas, pero no al gel. El equipo completo que se emplea para desarrollar la electroforesis se muestra en la Figura 8.



*Figura 8: Equipo de electroforesis.*

### 3.2.2.3 Reactivos

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

**Tabla 2:** Reactivos utilizados en la electroforesis.

Disolución	Componentes	Almacenamiento
Disolución A	Acrilamida al 29,2 % (p/v) y Bis-acrilamida al 0,8 % (p/v)	4 °C
Disolución B: Tampón del gel separador	Tris (Tris-hidroximetil-amino-metano) 1,5 M ajustado a pH 8,8 con HCl	4 °C
Disolución C: Tampón del gel apilador	Tris (Tris-hidroximetil-amino-metano) 0,5 M ajustado a pH 6,8 con HCl	4 °C
Disolución D: SDS 10 %		Temperatura ambiente
Disolución E: Persulfato amónico al 10 % (p/v)		No se almacena ya que se prepara justo en el momento de utilizarlo
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina	Temperatura ambiente
Disolución F: Tampón de carga	1 ml de disolución C, 0,8 ml de glicerol, 1,6 ml de disolución D, 0,4 ml de $\beta$ -mercaptoetanol, 0,2 ml de azul de bromofenol al 0,05 % (p/v) y agua destilada hasta 8 ml	Temperatura ambiente
Disolución G: Tampón de desarrollo	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
Disolución para desteñir geles	40 % de metanol y 7 % de ácido acético en 1 l de agua destilada.	Temperatura ambiente
Disolución para teñir geles	0,1 % de Brilliant Blue en disolución para teñir geles en 250 ml de agua destilada.	Temperatura ambiente
Disolución para secar geles	40 % de metanol, 10 % de glicerol en 500 ml de agua destilada.	Temperatura ambiente

### 3.2.2.4 Procedimiento

En primer lugar, se prepara el gel separador mezclando volúmenes de las disoluciones de la Tabla 2. Se pueden preparar geles de electroforesis con distinto porcentaje de acrilamida en función del tamaño de la proteína que se quiera analizar, como viene especificado en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Volúmenes en  $\mu$ l de las disoluciones preparadas anteriormente, 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 <sub>2</sub> O	5300	5000	4600	4100	3300	3300	2100
Disolución A	2,040	2500	2700	3300	4120	5100	5300
Disolución B	2,500	2500	2500	2500	2500	2500	2500
Disolución D	100	100	100	100	100	100	100
Disolución E	50	50	50	50	50	50	50
TEMED	4	4	4	5	4	4	5

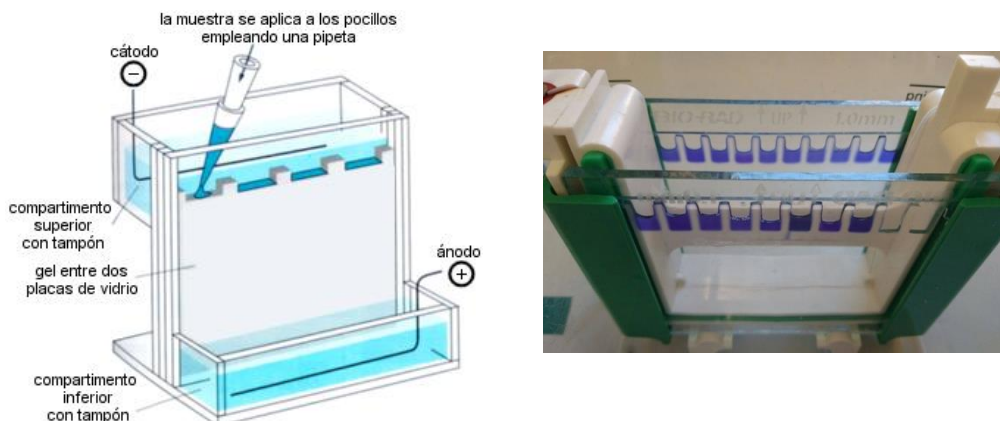
El porcentaje de acrilamida seleccionado para realizar esta electroforesis es del 10 %. Después de la preparación de este gel se limpian muy bien las placas de vidrio, cuyos bordes son engrasados con una fina capa de silicona con el objetivo de evitar pérdidas. Seguidamente se montan dichas placas asegurándolas perfectamente y se añade una pequeña cantidad de agua mediante una pipeta Pasteur para comprobar que están herméticamente cerradas. A continuación, se añade el gel separador en el espacio entre las dos placas hasta una altura de 5 cm aproximadamente y se cubre con un poco de agua destilada con el fin de que no se forme menisco en la superficie del gel, es decir, para asegurar la linealidad de la interfase entre los dos geles. Cuando el gel separador ha gelificado, se retira el agua de la superficie con ayuda de un papel de filtro y se prepara el gel apilador al 4 % de acrilamida (Tabla 4).

**Tabla 4:** Volúmenes en  $\mu\text{l}$  de las disoluciones preparadas anteriormente, necesarios para hacer un gel apilador de acrilamida (al porcentaje indicado) con SDS en una lámina de  $1 \times 102 \times 72$  mm.

% Acrilamida	4
H <sub>2</sub> O	2700
Disolución A	1000
Disolución C	1250
Disolución D	50
Disolución E	25
TEMED	5

Una vez preparado el gel apilador se añade encima del gel separador, ocupando aproximadamente una altura de 2 cm y finalmente se coloca el peine para formar calles, por donde correrán las muestras.

Al gelificar el gel apilador, se retira el peine. Se pone como mínimo, el mismo volumen de muestra de proteína que de tampón de carga, para que el pH de la muestra sea el adecuado, además de teñirla para poder seguir su camino. Se calienta a 100 °C durante 10 minutos y se aplica un volumen de 10  $\mu\text{l}$  en cada uno de los pocillos. Para el movimiento de los electrones en función de la carga eléctrica, se añade tampón de desarrollo y se aplica una corriente de 200 V, 120 A y 20 W (para unas dimensiones de  $1 \times 102 \times 72$  mm de espesor, anchura y altura respectivamente). Se va formando una única banda en el gel apilador y a medida que va bajando al gel separador se va desglosando en varias bandas. Al cabo de 1 hora aproximadamente, la muestra llega al final del gel, lo que quiere decir que la electroforesis ha terminado (Figura 9).



**Figura 9:** Esquema del montaje de una placa para la electroforesis.

### 3.2.2.5 Tinción de los geles de acrilamida

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas separadas en los geles de acrilamida se visualizan mediante su tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250. El primer paso a seguir es introducir el gel en una disolución de fijación de proteínas donde se agita durante 30 minutos, haciendo que las proteínas se fijen al gel. Se retira esta disolución, y se adiciona la disolución de teñir, agitando durante una hora. Por último, el gel se agita en la disolución para desteñir hasta que se ha eliminado la tinción de fondo y se distinguen con bastante claridad las proteínas que forman la muestra.

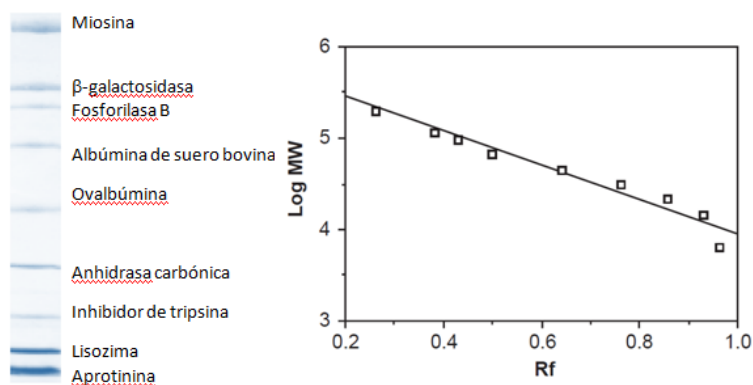
### 3.2.2.6 Secado de los geles de acrilamida

Tras desteñir el gel, este se introduce en la disolución para secar durante 30 minutos donde se está agitando para que el proceso sea más rápido. Una vez seco, se coloca entre dos láminas de papel celofán mojado y bien sujeto por pinzas a un cristal, dejándolo secar a temperatura ambiente.

### 3.2.2.7 Cálculo de la masa molecular por electroforesis en presencia de SDS

La determinación de masas moleculares de las subunidades de una proteína por electroforesis en presencia de SDS en geles de poliacrilamida (PAGE) fue introducida por primera vez, empíricamente por Shapiro en 1967 (Shapiro et al, 1967). Se basa en que todos los polipéptidos unen la misma cantidad de SDS por unidad de peso (una proporción aproximada de 1,4 g SDS/g proteína) de forma que la relación carga/masa es constante y la estructura resultante es una varilla cuya carga global (negativa y debida fundamentalmente a la cabeza polar del SDS) es proporcional a la longitud. Cuando las mismas 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 y 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, podemos determinar su masa molecular (Figura 10).



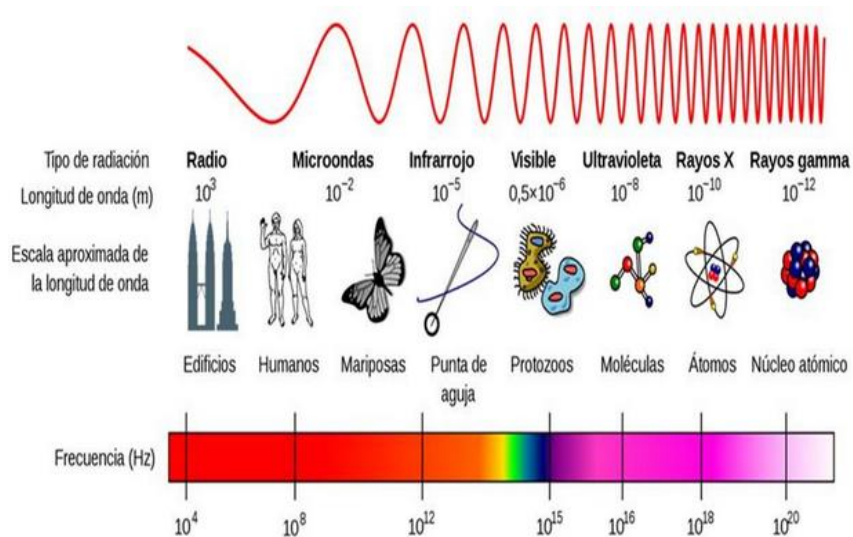
**Figura 10:** En la izquierda se muestra el patrón de electroforesis SDS-PAGE Standards Broad Range. Las proteínas utilizadas como patrón son: Miosina (200.000 Da),  $\beta$ -galactosidasa (116.250 Da), Fosforilasa b (97.400 Da), Albúmina de suero bovino (66.200 Da), Ovalbúmina (45.000 Da), Anhidrasa carbónica (31.000 Da), Inhibidor de tripsina (21.500 Da), Lisozima (14.400 Da) y Aprotinina (6.500 Da). A la derecha se encuentra representada la recta patrón del logaritmo de la masa molecular frente a la movilidad relativa ( $R_f$ ).

### 3.2.3 Espectroscopía UV-visible

Se denomina espectroscopía o espectrofotometría a la medida de la absorción y emisión de luz de los materiales. La espectroscopía de absorción ultravioleta-visible (UV-vis) es una de las técnicas instrumentales más útiles y utilizadas. El fundamento de esta espectroscopía se basa en la capacidad que tiene la materia para absorber radiaciones comprendidas en las zonas UV y visible del espectro electromagnético, la cual depende de la estructura electrónica de la especie absorbente (átomos, moléculas, iones o complejos) (Figura 11).

Esta absorción aparece cuando se hace incidir un haz de luz ultravioleta o visible sobre la molécula absorbente aumentando así su energía hasta la energía ( $h\nu$ ) del fotón incidente, lo cual produce una transición electrónica desde un estado energéticamente menor a otro mayor. Después de esto, emite un fotón con la misma cantidad de energía absorbida. La unión de todas las transiciones se representa por medio de un conjunto de bandas denominado espectro de absorción, que proporciona información fundamental para la determinación de la composición química, la estructura y las propiedades de la materia. Este 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.

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.

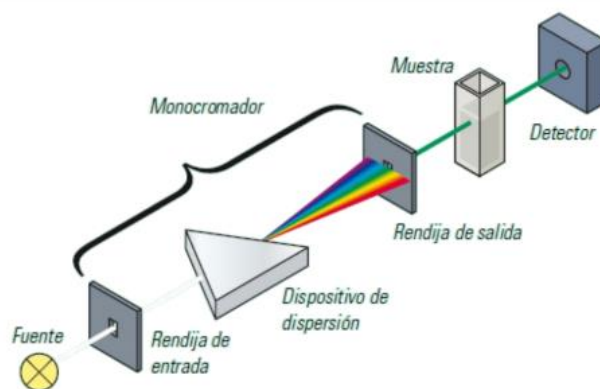


*Figura 11: Espectro electromagnético.*

Los espectrofotómetros son los equipos encargados de generar espectros que permiten el estudio de la longitud de onda y la intensidad de la radiación absorbida o emitida por la muestra analizada.

Los componentes de un espectrofotómetro, como se puede observar en la Figura 12 son:

- Una fuente de energía radiante (luz): las fuentes más utilizadas son la lámpara de arco de deuterio y la lámpara halógena de wolframio.
- Un monocromador o filtro: proporciona un haz de radiación paralelo y lo dirige al detector a través de la muestra.
- Compartimento de muestra: donde se encuentra un recipiente transparente (cubetas o tubos) que contiene la muestra. Pueden ser de vidrio, cuarzo o plástico transparente. Para medir en UV se deben usar las de cuarzo o sílice fundido, porque el vidrio no transmite la radiación UV.
- Un detector: convierte la señal de luz en una señal eléctrica. Un espectrofotómetro puede estar formado por uno o más detectores.
- Un registrador o sistema de lectura de datos.



**Figura 12:** Componentes 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 (Ecuación 1 y 2):

$$A = \epsilon bc \quad \text{Ecuación 1}$$

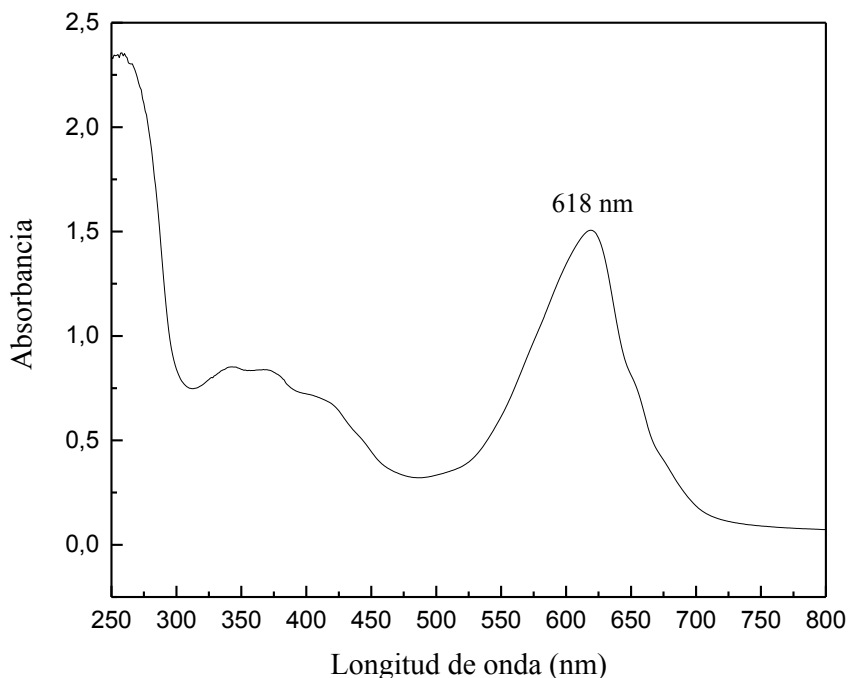
Donde A es la absorbancia;  $\epsilon$  es el coeficiente de absorción molar, específica de cada cromóforo; b el ancho de la cubeta; c la concentración.

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $I_0$  es la intensidad de la luz incidente; I la intensidad de la luz transmitida.

La mayoría de las proteínas son incoloras ya que los aminoácidos no absorben luz en la región del visible, por lo cual el espectro de los aminoácidos es determinado por la naturaleza de sus cadenas laterales. Sin embargo, en el caso de la C-Ficocianina se encuentran presentes una serie de cromóforos que le aportan su color azul característico, dando un espectro característico con máximos de absorción a 618 nm.

Un perfil típico de un espectro de esta proteína se encuentra en la Figura 13 donde se representa la absorbancia frente a la longitud de onda.



**Figura 13:** Espectro UV-visible de la C-Ficocianina. El tampón utilizado fue fosfato sódico 50 mM 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 618 nm se puede conocer su concentración, ya que existe una relación directa entre la absorción y la concentración de la muestra, mediante la Ecuación 3, 4 y 5 (Bennet et al, 1973; Bryant et al, 1979; Bermejo et al, 2003):

$$[CPC] = \frac{A_{618} - 0,474 \cdot A_{652}}{5,34} \text{ (mg/ml)} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$[APC] = \frac{A_{652} - 0,208 \cdot A_{618}}{5,09} \text{ (mg/ml)} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$[CPC_T] = [CPC] + [APC] \text{ (mg/ml)} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde [CPC] es la concentración de C-Ficocianina, [APC] la concentración de aloficocianina y [CPC<sub>T</sub>] la concentración total de C-Ficocianina presente en la muestra.



Por otro lado, podemos determinar la pureza de la proteína determinando la relación entre la absorbancia a 618 nm y a 280 nm ( $A_{618}/A_{280}$ ). En el ámbito alimenticio se considera que la proteína está totalmente pura cuando esta relación es superior a 0,7, mientras que en el ámbito analítico sólo basta con un valor de 0,4 (Chaiklahan et al, 2011).

### **3.2.4 Espectroscopía de fluorescencia**

La fluorescencia es un proceso de emisión a partir del cual las moléculas son excitadas mediante la absorción de radiación electromagnética y al relajarse al estado fundamental liberan el exceso de energía en forma de fotones. 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 fluorescencia se mide con un equipo denominado espectrofluorímetro. El haz que irradia la muestra pasa primero a través de un filtro de excitación o un monocromador que sirve para transmitir aquella parte del haz que excitará la fluorescencia. La muestra emite radiación fluorescente en todas las direcciones, pero se observa mejor perpendicularmente al haz de excitación. La radiación emitida llega a un detector fotoeléctrico después de atravesar un segundo filtro o sistema monocromador que aísla el pico fluorescente. Al final de este proceso, se obtiene una gráfica de la intensidad de la fluorescencia en función de la longitud de onda de excitación.

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, al igual que el resto de las macromoléculas, 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 (Skoog et al, 1989).

Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron utilizando un espectrofluorímetro FP-6500 (Jasco Inc.) con una cubeta de cuarzo con un paso de luz de 1 cm. Las muestras de proteína fueron excitadas al máximo de absorción del cromóforo (618 nm) midiendo la emisión a 636 nm. Las rendijas utilizadas de emisión y excitación fueron en los dos casos de 10 nm.

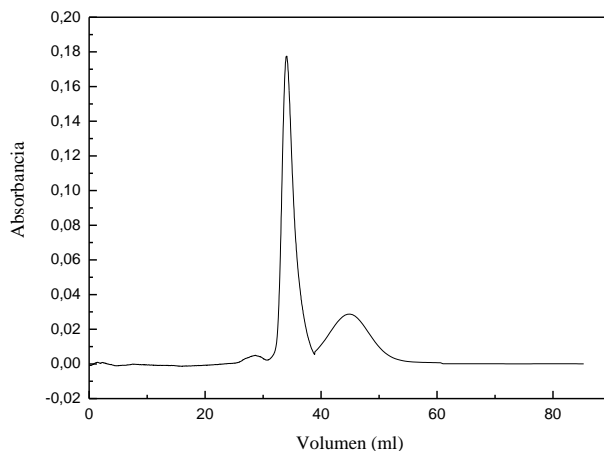


## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Determinación de la masa molecular y pureza

Para iniciar este trabajo de investigación es necesario que la proteína C-Ficocianina se encuentre con la pureza adecuada para realizar los experimentos. La proteína, cuyo proceso de extracción se encuentra bajo patente, fue suministrada por la profesora María José Ibáñez, del Grupo de Investigación “Biotecnología de microalgas marinas (BIO173)” perteneciente al Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería.

La muestra de proteína suministrada se pasa en primer lugar por cromatografía de exclusión molecular, utilizando para ello la columna Sephacryl S-300, con el fin de eliminar las impurezas que puedan estar presentes en la muestra original. Como se ha mencionado anteriormente, se introduce en la columna aproximadamente 1 ml de proteína concentrada y se van recolectando fracciones de 3 ml. El perfil cromatográfico obtenido se muestra en la Figura 14, donde se indican los valores de absorbancia a 280 nm de cada una de las fracciones recogidas. También se recogieron los valores correspondientes de las absorbancias a 618 nm y 650 nm, obteniéndose un perfil análogo al mostrado en la Figura 14.

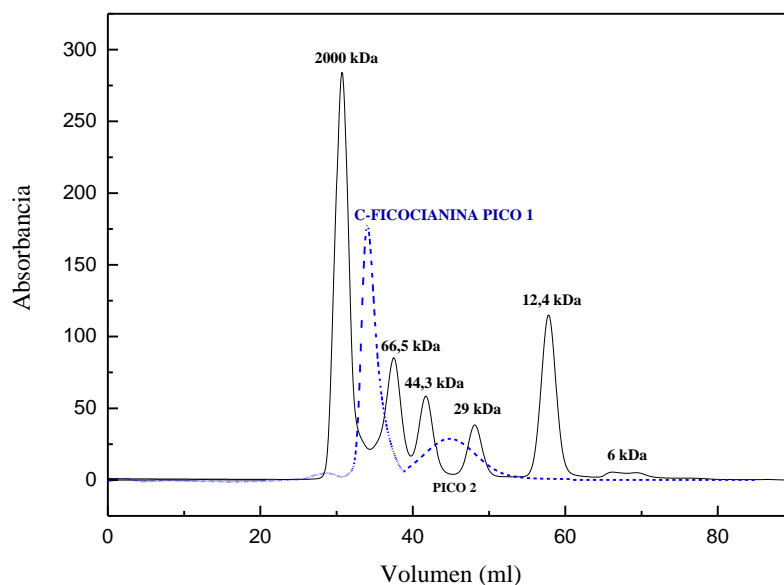


**Figura 14:** Perfil cromatográfico de la C-Ficocianina en función del volumen. La columna Sephacryl S-300 es equilibrada en tampón fosfato sódico 50 mM a pH 7.

Con el fin de poder determinar cuál de los dos picos obtenidos presenta una mayor pureza, se aplica la siguiente relación determinando su valor para cada una de las fracciones obtenidas (Ecuación 6):

$$Pureza = \frac{A_{618}}{A_{280}} \quad \text{Ecuación 6}$$

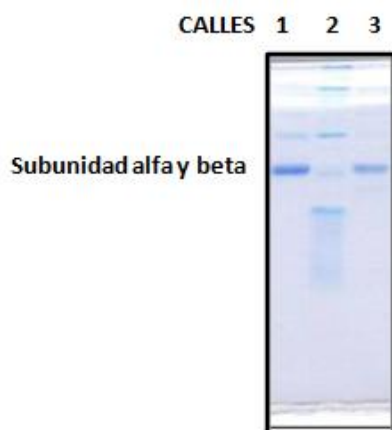
Los resultados que se obtienen muestran que para el pico 1 (correspondiente a un volumen de 32 ml) le corresponde una pureza de 0,7 y para el pico 2 (volumen de 45 ml un valor de 0,2). Por último, para poder determinar la masa molecular y el correspondiente estado de agregación de la C-Ficocianina se introduce un kit de proteínas con masas moleculares conocidas en la columna de exclusión molecular, obteniéndose el perfil cromatográfico que se muestra en la Figura 15.



**Figura 15:** Patrón del perfil cromatográfico de la C-Ficocianina en tampón fosfato sódico 50 mM a pH 7, 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).

Se realiza la recta patrón con los valores de cromatografía de exclusión molecular. Una vez determinada, con los volúmenes de elución de la muestra de C-Ficocianina podemos determinar su masa molecular. Utilizando los datos de la recta patrón, al pico 2 le corresponde una masa molecular de 38900 Da, que corresponde al monómero de la C-Ficocianina y el pico 1 correspondería a un trímero de esta proteína, con una masa molecular de 116700 Da. Estos datos coinciden con los que se encuentran en la bibliografía sobre el estado de agregación de la proteína (Chaiklahan et al, 2012).

Para confirmar el estado de pureza de las muestras de proteína obtenidas en la exclusión molecular se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes. En la Figura 16 se muestra una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % obtenida donde se observa la presencia de una única banda correspondiente a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la C-Ficocianina.



**Figura 16:** Electroforesis en presencia de SDS en un gel con una 10 % de acrilamida. La calle 1 y 3 corresponde a la muestra de C-Ficocianina después de pasar por la columna de exclusión molecular Sephacryl S-300 en tampón fosfato sódico 50 mM a pH 7. En la calle 2 aparecen los patrones Miosina (200.000 Da),  $\beta$ -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).

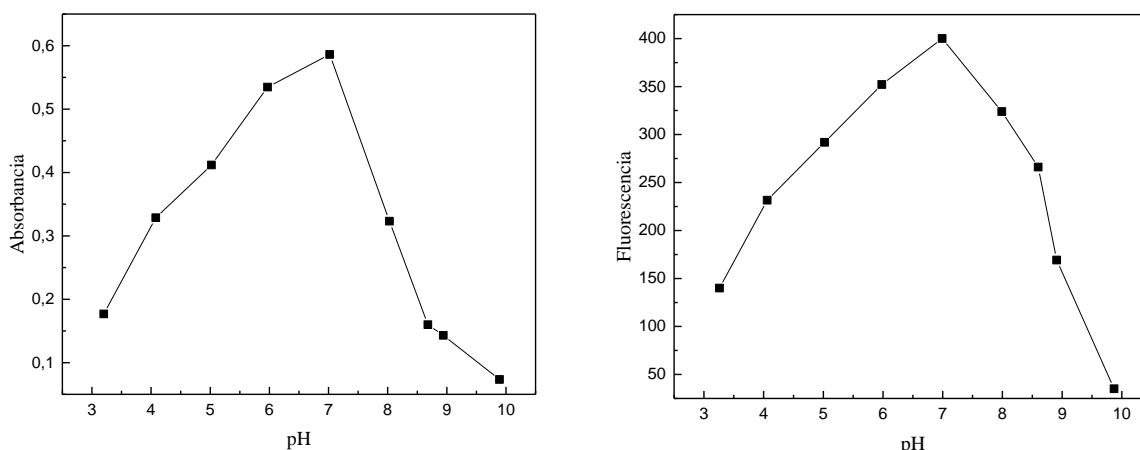
Para calcular la masa de las subunidades de la proteína basta con medir la movilidad relativa de las bandas que presenta y, con ayuda de una recta patrón, obtenida a partir de las medidas de  $R_f$  de una serie de proteínas de masa molecular conocida, podemos determinar su masa molecular. La masa molecular obtenida en el estado desnaturalizante de la proteína corresponde a 38900 Da, coincidiendo dicho valor con la masa molecular del monómero calculado anteriormente mediante exclusión molecular.

Los experimentos de estabilidad de la C-Ficocianina se han llevado en todos los casos con la forma trimérica de la proteína.

## 4.2 Influencia del pH

Se ha estudiado como varía la estabilidad de la C-Ficocianina a diferentes pHs, midiendo la variación de los espectros UV-visible y fluorescencia en diferentes tampones. Las medidas de absorbancia se realizaron a 618 nm para poder hacer un seguimiento de la variación del color azul de la proteína. En el caso de la fluorescencia se recoge el espectro de emisión a 636 nm tras excitar a 518 nm. En los dos casos se realizaron las medidas en un intervalo de pH de 3 a 10 utilizando los siguientes tampones: tampón fosfato sódico 0,1 M a pH 3, 4, 5, 6, 7, 8; tampón TRIS 0,1 M a pH 9; y tampón CHES 0,1 M a pH 10.

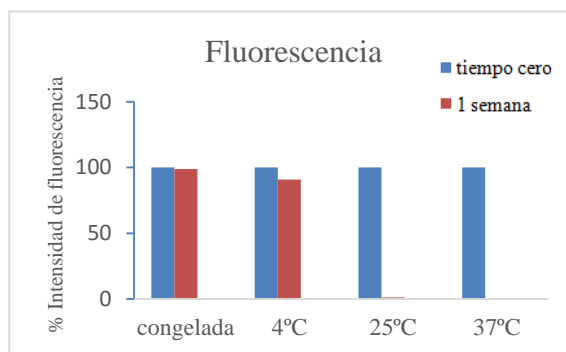
En la Figura 17 se puede observar como varía la estabilidad de la C-Ficocianina, a 25 °C, a diferentes pHs. Como se puede apreciar, los valores máximos de absorción y de fluorescencia se obtienen en el intervalo de pH de 5,5 a 7,5, mientras que fuera de estos valores se produce un descenso de los mismos. El pH máximo en los dos casos es 7.



**Figura 17:** Efecto del pH en la estabilidad de la C-Ficocianina, en los diferentes tampones mencionados anteriormente, a tiempo cero con temperatura de 25 °C, expuestas a la luz y sin presencia de azida. La gráfica de la izquierda corresponde a medidas de absorbancia en el espectrofotómetro UV-visible y la gráfica de la derecha a las de fluorescencia.

### 4.3 Influencia de la temperatura

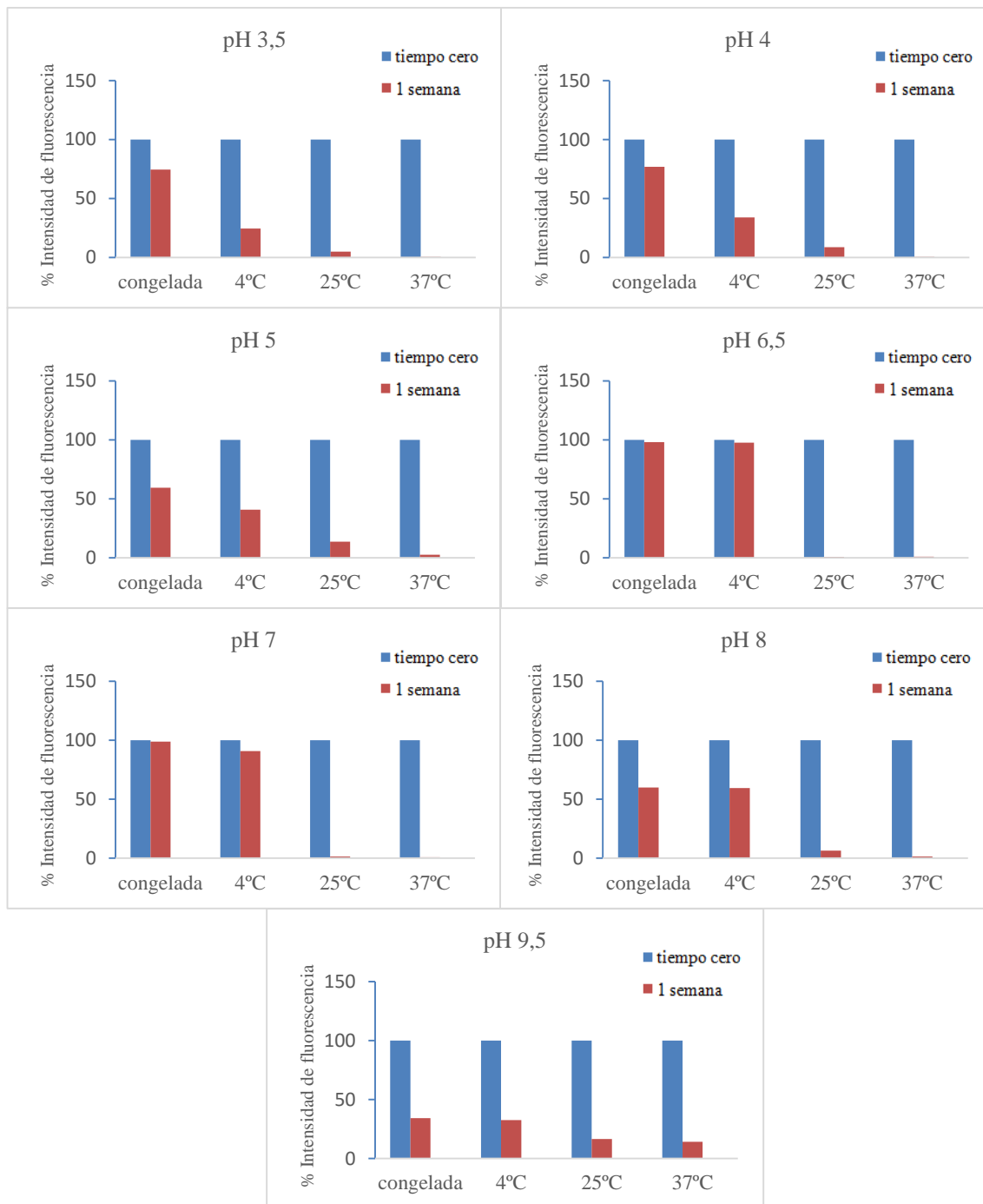
Como se ha mencionado anteriormente, el pH óptimo se encuentra aproximadamente sobre 7. En la Figura 18 se muestra la variación de la estabilidad de la C-Ficocianina a este pH a diferentes temperaturas y en función del tiempo de incubación.



**Figura 18:** Variación de la intensidad de fluorescencia de la C-Ficocianina a pH 7 a diferentes temperaturas (-20°C, 4°C, 25°C y 37°C), en función del tiempo de incubación (tiempo cero y 1 semana).

Como se puede observar en la Figura 18, la C-Ficocianina es bastante más estable a temperaturas bajas que a temperaturas altas. Cuando esta proteína se encuentra a -20 °C (congelada) y 4 °C presenta una gran estabilidad, ya que esta apenas varía al pasar una semana; mientras que cuando se encuentra a 25 °C y 37 °C y pasa el mismo tiempo, pierde totalmente su fluorescencia. Lo mismo ocurre en el UV-visible, donde los datos de absorbancia varían de manera análoga a los de intensidad de fluorescencia.

A continuación, en la Figura 19 se muestra la variación de la estabilidad de la C-Ficocianina para cada valor de pH en función de la temperatura, a tiempo cero y una semana de incubación.

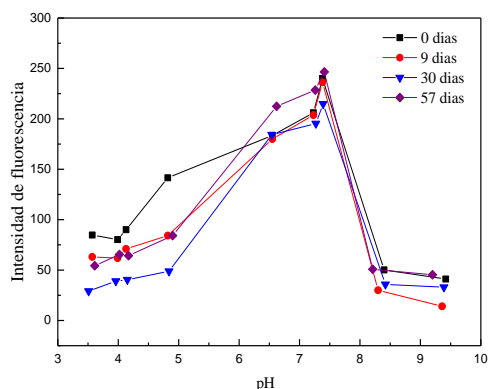


**Figura 19:** Variación de la intensidad de fluorescencia de la C-Ficocianina a diferentes pHs a diferentes temperaturas (congeladas, 4°C, 25°C y 37°C), en función del tiempo de incubación (tiempo cero y 1 semana).

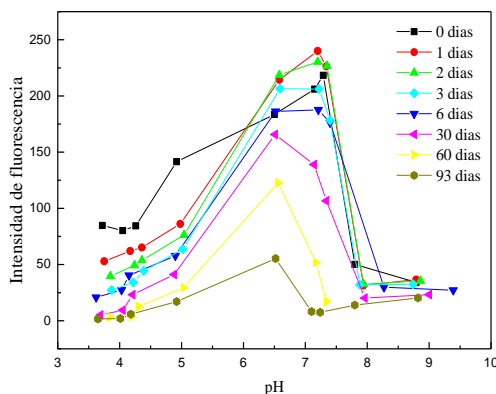
Como se puede observar en la Figura 19, se han ido recogiendo datos experimentales de intensidad de fluorescencia a diferentes pHs a los que se encuentra la C-Ficocianina, para comprobar como varía su estabilidad a distintas temperaturas en función del tiempo de incubación. Se observa que dicha estabilidad va disminuyendo en función del aumento de la temperatura, ya que para las muestras congeladas y 4 °C son bastantes estables al pasar una semana, mientras que, para temperaturas más altas, como lo son a 25 °C y 37 °C, pierde por completo esta estabilidad. En las gráficas d) y e) correspondientes a la C-Ficocianina a pH 6,5 y 7 respectivamente, se observa que la variación de la intensidad de la fluorescencia en una semana de incubación es prácticamente nula con respecto a tiempo cero, es decir, esta proteína es bastante estable a estos pHs. Se han realizado experimentos análogos a los de fluorescencia utilizando en este caso espectrofotometría UV-visible, obteniéndose los mismos resultados.

#### 4.4 Influencia del tiempo de incubación

A continuación, desde la Figura 20 hasta la 23 se muestra la variación de la estabilidad de la C-Ficocianina para cada temperatura en función del pH y tiempo de incubación.

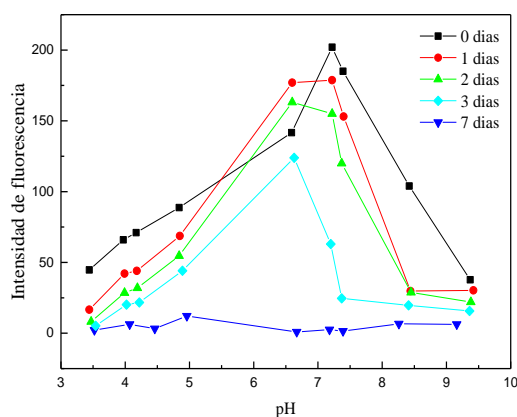


**Figura 20:** Variación de la intensidad de fluorescencia de la C-Ficocianina congelada, en función de diferentes valores de pH y tiempos de incubación.

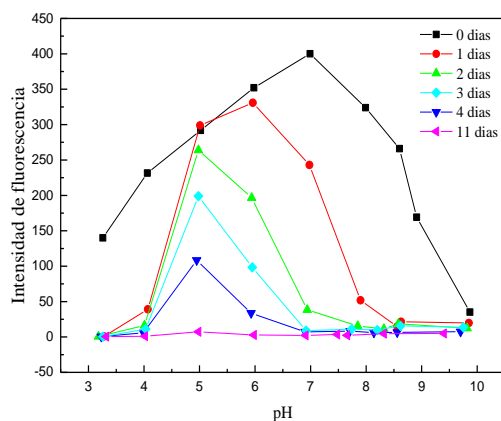


**Figura 21:** Variación de la intensidad de fluorescencia de la C-Ficocianina a 4 °C, en función de diferentes valores de pH y tiempos de incubación.





**Figura 22:** Variación de la intensidad de fluorescencia de la C-Ficocianina a 25 °C, en función de diferentes valores de pH y tiempos de incubación.

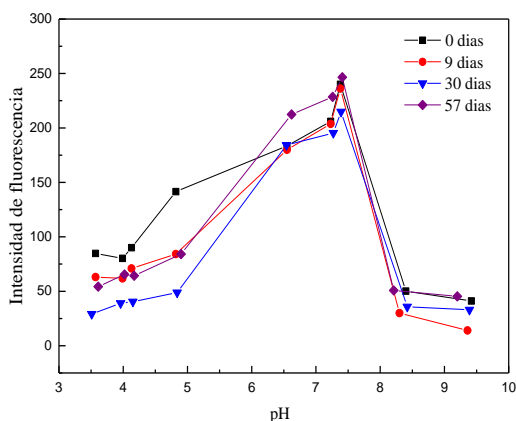


**Figura 23:** Variación de la intensidad de fluorescencia de la C-Ficocianina a 37 °C, en función de diferentes valores de pH y tiempos de incubación.

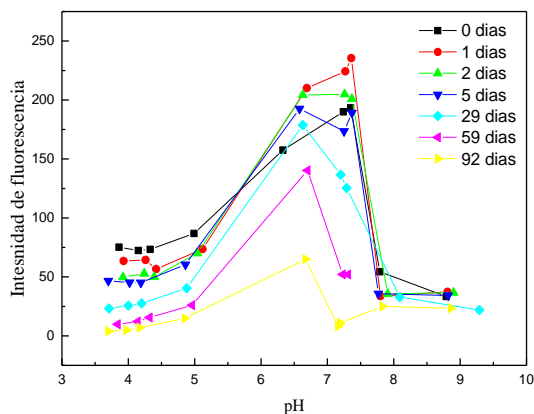
Al igual que la estabilidad de la C-Ficocianina se encuentra influenciada por la temperatura, también lo está con el tiempo de incubación. Como se puede observar en las gráficas desde la Figura 20 hasta la 23, los valores de fluorescencia van disminuyendo con el tiempo de incubación. Como se ha mencionado anteriormente, esta proteína presenta una mayor estabilidad a temperaturas bajas, es decir, con el mismo tiempo de incubación a menor temperatura habrá menor variación de los valores de fluorescencia tal y como se puede observar en estas gráficas. También con estos valores experimentales se puede comprobar que la estabilidad de esta proteína es mayor en el intervalo de pH 5,5 a 7,5, siendo 7 aproximadamente el pH óptimo, mientras que fuera de este intervalo se produce un gran descenso de los valores de fluorescencia. Lo mismo ocurre en el UV-visible, donde los datos de absorbancia varían de manera análoga a los de intensidad de fluorescencia.

#### 4.5 Influencia de la luz

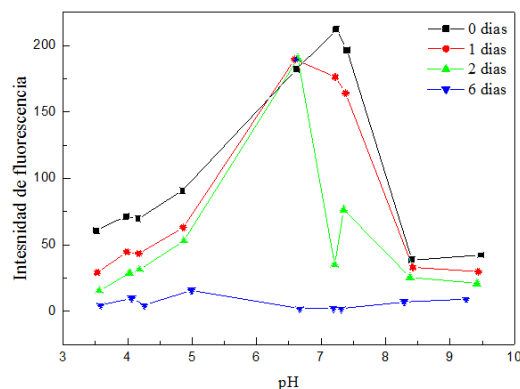
La estabilidad de la C-Ficocianina puede verse afectada por la presencia o ausencia de luz en el medio. Para poder determinar cuál es el efecto de esta variable, en este apartado se va a estudiar como varía la intensidad de fluorescencia de esta proteína para cada temperatura, en función del pH y tiempo de incubación en ausencia de luz (desde la Figura 24 hasta la 27).



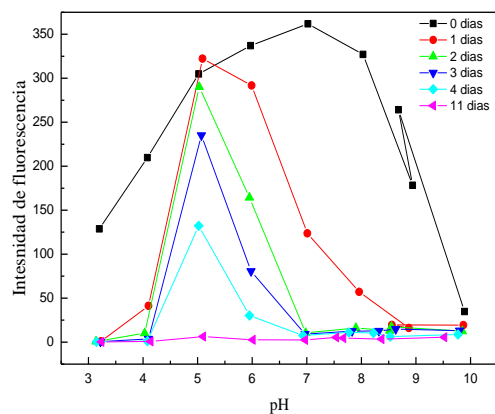
**Figura 24:** Variación de la intensidad de fluorescencia de la C-Ficocianina congelada, en función de diferentes valores de pH y tiempos de incubación, en ausencia de luz.



**Figura 25:** Variación de la intensidad de fluorescencia de la C-Ficocianina a 4 °C, en función de diferentes valores de pH y tiempos de incubación, en ausencia de luz.



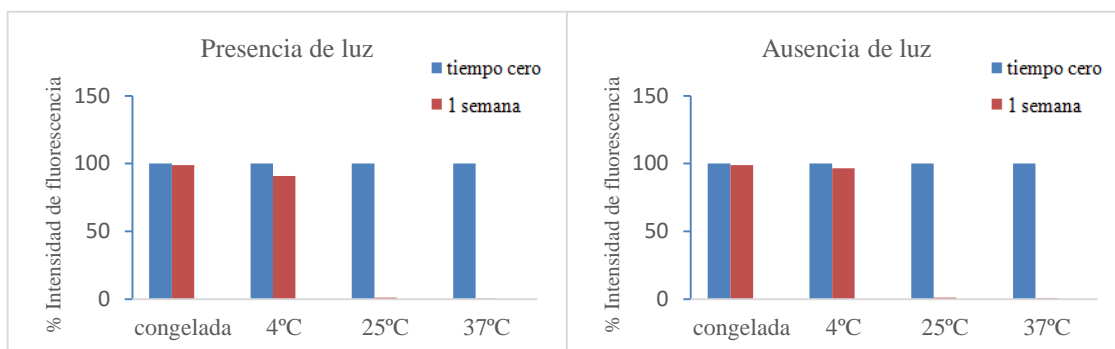
**Figura 26:** Variación de la intensidad de fluorescencia de la C-Ficocianina a 25 °C, en función de diferentes valores de pH y tiempos de incubación, en ausencia de luz.



**Figura 27:** Variación de la intensidad de fluorescencia de la estabilidad de la C-Ficocianina a 37 °C, en función de diferentes valores de pH y tiempos de incubación, en ausencia de luz.

Las representaciones gráficas desde la Figura 24 hasta la 27 muestran cómo afecta la ausencia de luz en la estabilidad de la C-Ficocianina a diferentes pHs, temperaturas y tiempo de incubación. Al igual que ocurre con las otras variables estudiadas la estabilidad va disminuyendo cuando aumenta el tiempo de incubación, siendo el intervalo de mayor estabilidad el de pH entre 5,5 y 7,5. Lo mismo ocurre con los valores de absorbancia en el UV-visible.

En la Figura 28 se realiza una comparación de cómo afecta la luz en la estabilidad de esta proteína a pH 7 a diferentes temperaturas en tiempo cero y una semana de incubación.

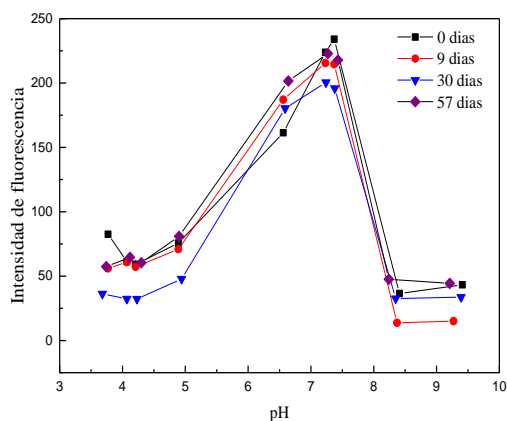


**Figura 28:** Comparación de la influencia de la luz en la variación de la intensidad de fluorescencia de la C-Ficocianina a pH 7, para cada temperatura en función de diferentes tiempos de incubación (tiempo cero y 1 semana).

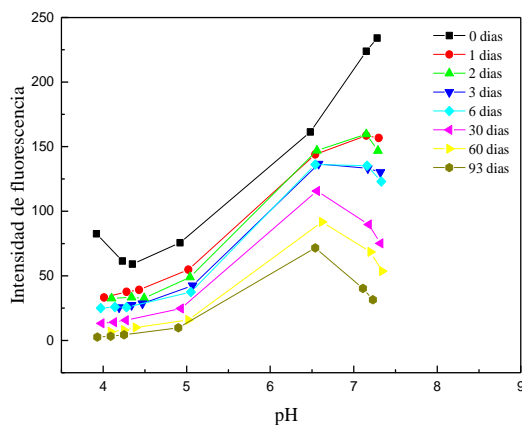
Como se puede observar en la Figura 28, no hay un cambio muy evidente de la influencia de la luz en la estabilidad de la C-Ficocianina, ya que los resultados experimentales apenas varían cuando se llevan a cabo en presencia o en ausencia de esta. Estas gráficas muestran que la proteína cuando se encuentra congelada y a 4 °C es bastante estable al pasar una semana de incubación, independientemente de la presencia o ausencia de luz. Los datos obtenidos mediante espectrofotometría UV-visible son análogos a los de fluorescencia.

#### 4.6 Influencia de azida

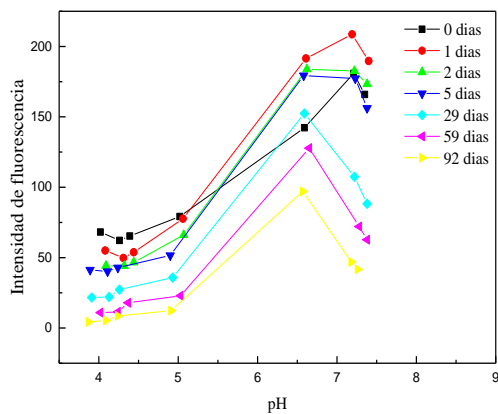
En este apartado se estudia la influencia de la presencia azida en la estabilidad de la C-Ficocianina. Para ello, se hace un estudio de la variación de la intensidad de fluorescencia de esta proteína para cada temperatura, en función del pH y tiempo de incubación en ausencia y presencia de luz y presencia de azida (desde la Figura 29 hasta la 33). Las muestras de proteína a 37 °C no se han estudiado en presencia de azida, solo en ausencia de esta.



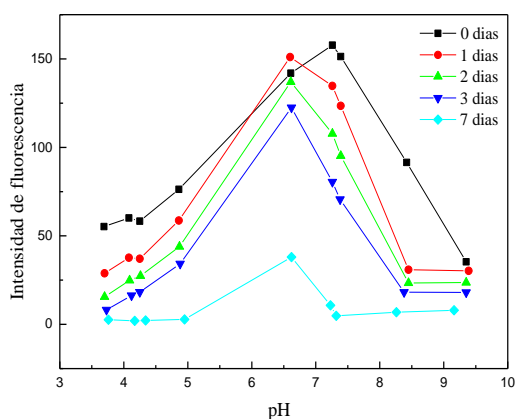
**Figura 29:** Variación de la intensidad de fluorescencia de la C-Ficocianina congelada, en función de diferentes valores de pH y tiempos de incubación, en presencia de azida y de luz. En este caso, son las mismas gráficas que para las congeladas en presencia de azida y ausencia de luz.



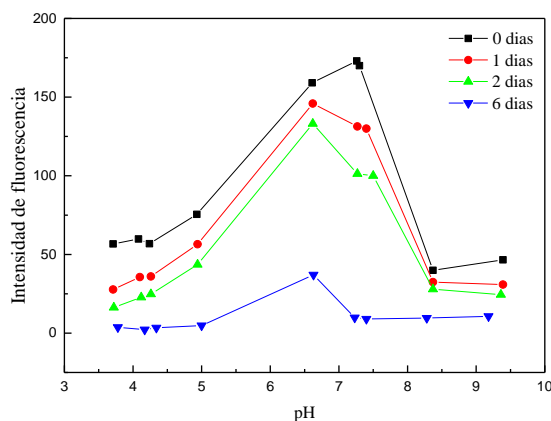
**Figura 30:** Variación de la intensidad de fluorescencia de la C-Ficocianina a 4 °C, en función de diferentes valores de pH y tiempos de incubación, en presencia de azida y de luz.



**Figura 31:** Variación de la intensidad de fluorescencia de la C-Ficocianina a 4 °C, en función de diferentes valores de pH y tiempos de incubación, en presencia de azida y ausencia de luz.



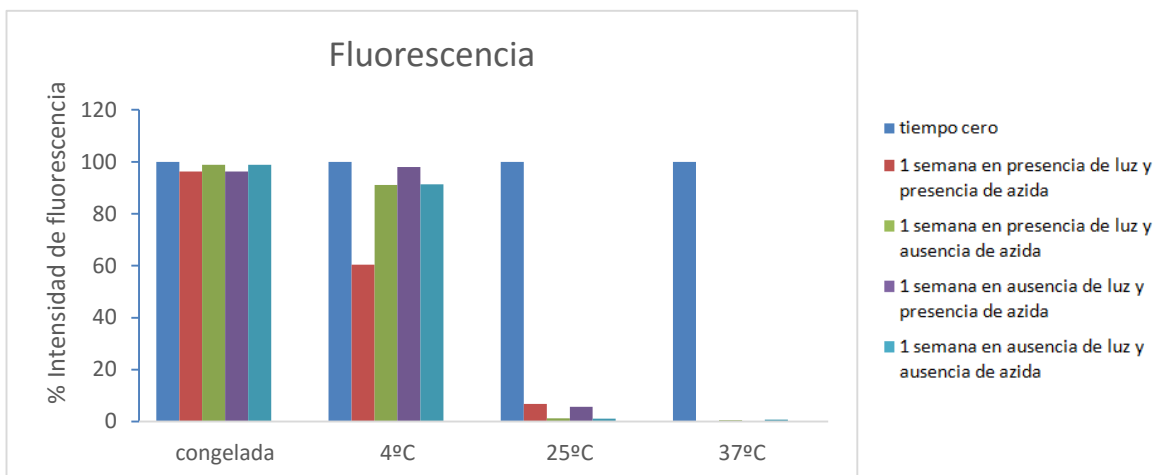
**Figura 32:** Variación de la intensidad de fluorescencia de la C-Ficocianina a 25 °C, en función de diferentes valores de pH y tiempos de incubación, en presencia de azida y de luz.



**Figura 33:** Variación de la intensidad de fluorescencia de la C-Ficocianina a 25 °C, en función de diferentes valores de pH y tiempos de incubación, en presencia de azida y ausencia de luz.

Desde la Figura 29 hasta la 33 se puede observar la influencia de azida en la C-Ficocianina tanto en presencia como en ausencia de luz. Al igual que ocurre en los apartados anteriores, la estabilidad va disminuyendo con el tiempo de incubación. Esta disminución es bastante parecida, independientemente de la presencia de azida, por lo que se puede decir que la estabilidad de la C-Ficocianina no se encuentra afectada por esta. Los datos obtenidos mediante espectrofotometría UV-visible son análogos a los de fluorescencia.

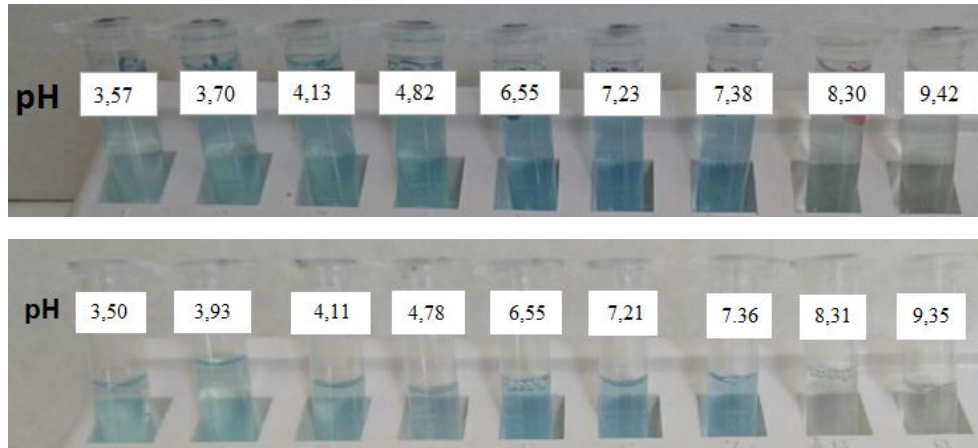
En la Figura 34 se realiza una comparación de cómo afecta la azida a la intensidad de fluorescencia de la C-Ficocianina a pH 7 con diferentes temperaturas a tiempo cero y una semana de incubación, tanto en presencia como en ausencia de luz.



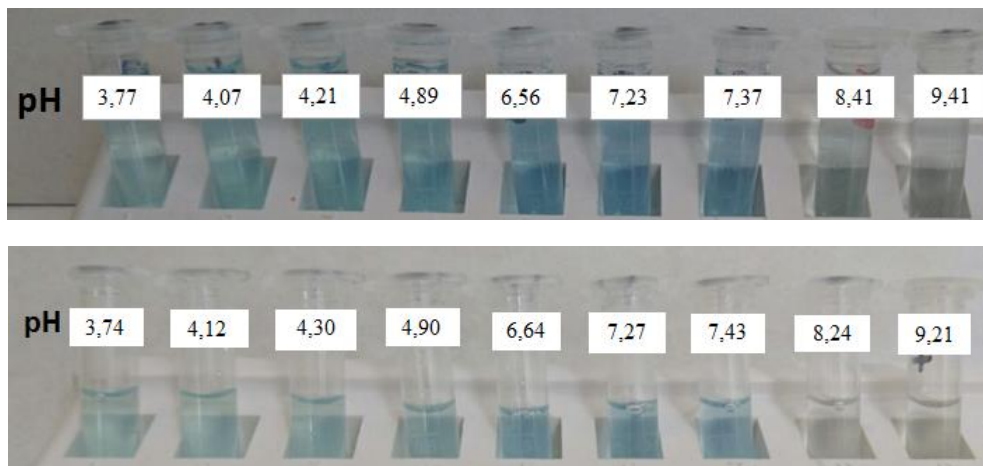
**Figura 34:** Comparación de la influencia de azida en la estabilidad de la C-Ficocianina a pH 7 mediante la variación de la intensidad de fluorescencia, en presencia y ausencia de luz para cada temperatura en función de diferentes tiempos de incubación (tiempo cero y 1 semana).

Como se puede observar en la Figura 34, donde se representa una comparación gráfica de los factores explicados en los apartados anteriores (pH, temperatura, tiempo de incubación y presencia o ausencia de luz y/o azida), la influencia de luz y de la azida en la estabilidad de la C-Ficocianina es prácticamente nula. Como se puede apreciar en esta gráfica, para las muestras congeladas existe una muy buena estabilidad de la proteína ya que apenas varía la intensidad de fluorescencia con el tiempo de incubación. De igual modo ocurre con las muestras a 4 °C, donde la estabilidad es un poco menor comparada con las congeladas. Para temperaturas de 25 °C y 37 °C, la estabilidad de la proteína decae fuertemente a la semana de incubación independientemente de la presencia o ausencia de y/o azida. Lo mismo ocurre en el UV-visible, donde los datos de absorbancia varían de manera análoga a los de intensidad de fluorescencia. En el caso de las muestras a 37 °C solo han sido estudiadas en ausencia de azida, ya que como se ha analizado anteriormente, la azida no es un parámetro relevante en la variación de la estabilidad de la proteína como para hacerle un estudio aparte.

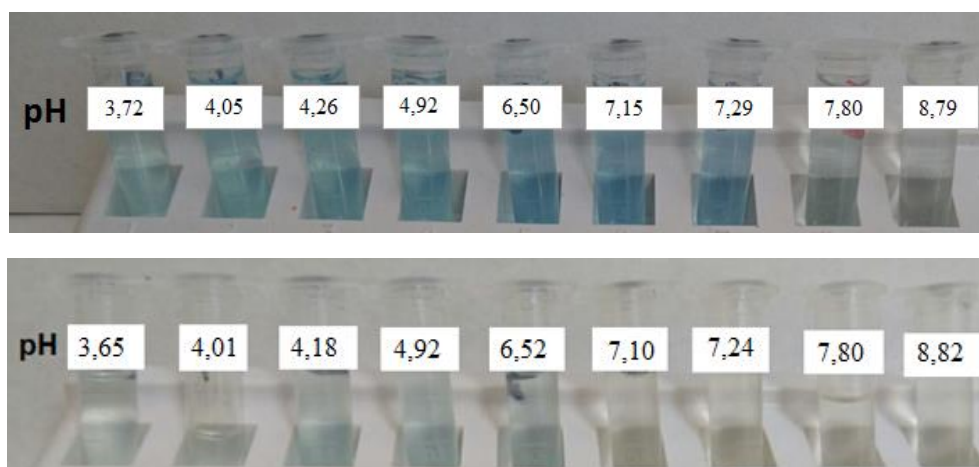
Una vez estudiada la influencia de los diferentes parámetros en la estabilidad de la C-Ficocianina, se muestran una serie de fotografías de las muestras utilizadas en los diferentes experimentos con el fin de poder observar visualmente los cambios de color que se producen (desde la Figura 35 hasta la 46).



**Figura 35:** Muestras de C-Ficocianina congeladas en ausencia de luz y azida. La imagen superior corresponde a tiempo inicial y en la inferior han pasado 87 días de incubación.

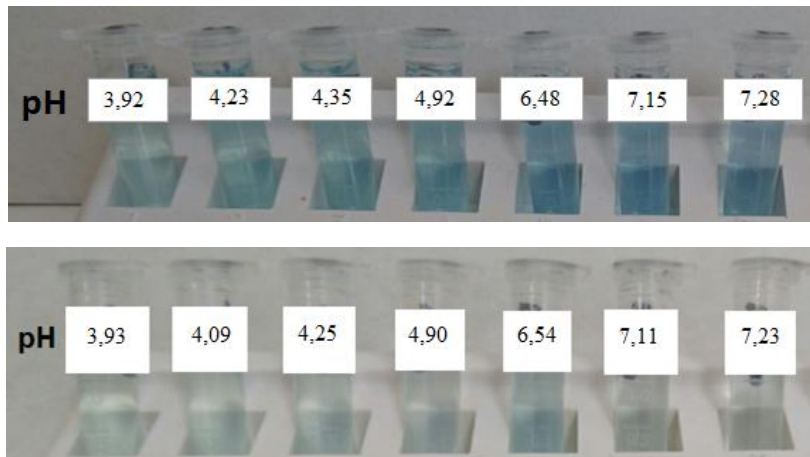


**Figura 36:** Muestras de C-Ficocianina congeladas en ausencia de luz y presencia de azida. La imagen superior corresponde a tiempo inicial y en la inferior han pasado 87 días de incubación.

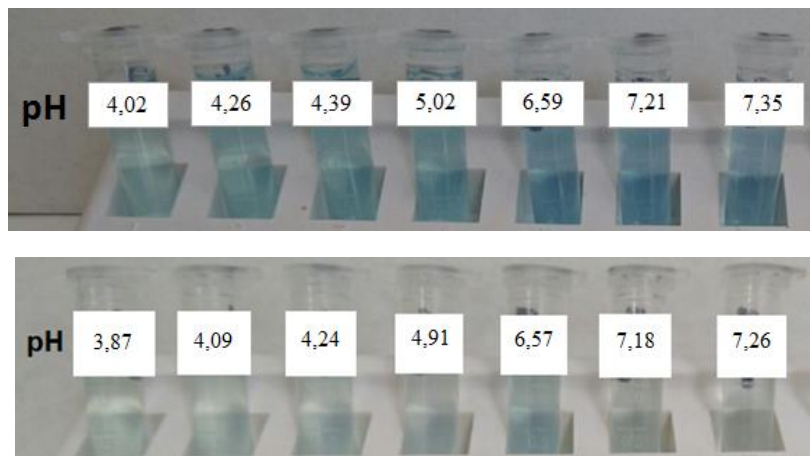


**Figura 37:** Muestras de C-Ficocianina a 4 °C en presencia de luz y ausencia de azida. La imagen superior corresponde a tiempo inicial y en la inferior han pasado 86 días de incubación.

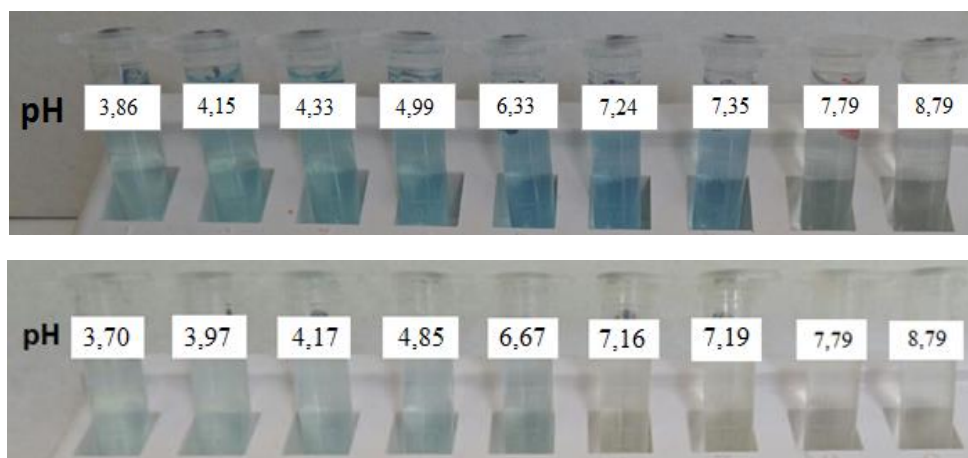




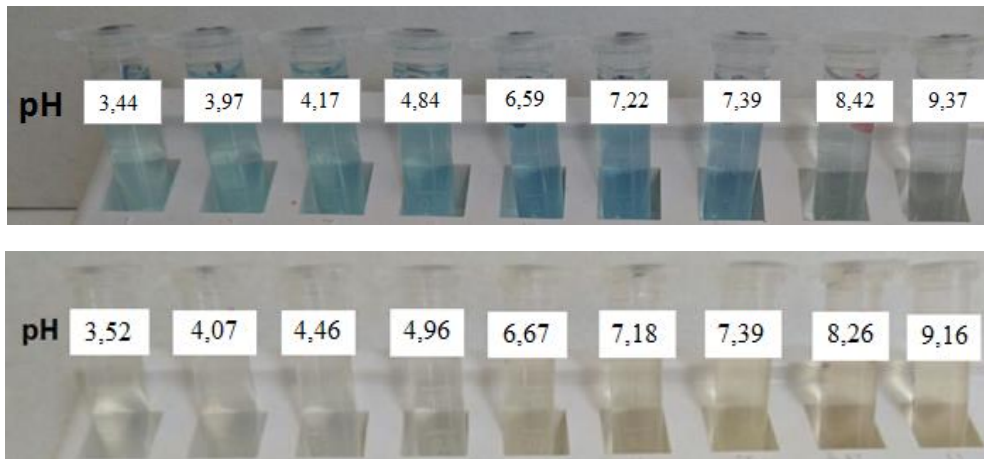
**Figura 38:** Muestras de C-Ficocianina a 4 °C en presencia de luz y de azida. La imagen superior corresponde a tiempo inicial y en la inferior han pasado 86 días de incubación.



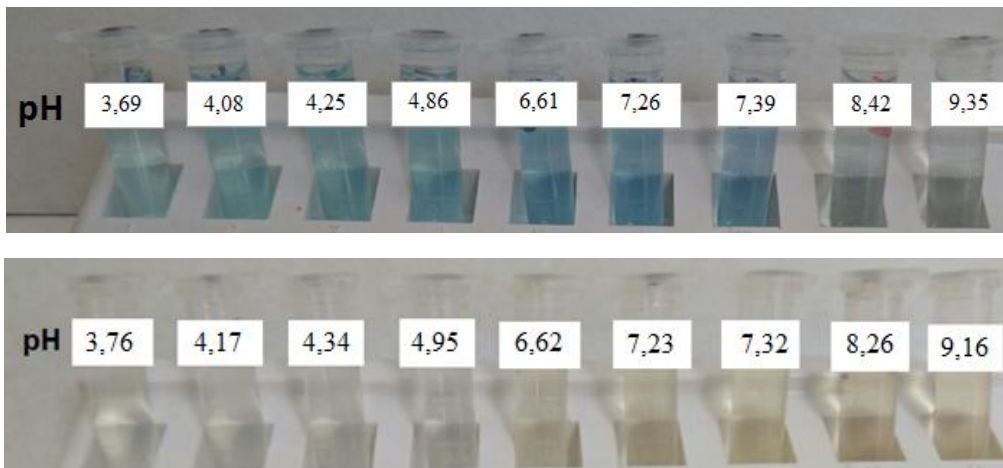
**Figura 39:** Muestras de C-Ficocianina a 4 °C en ausencia de luz y presencia de azida. La imagen superior corresponde a tiempo inicial y en la inferior han pasado 85 días de incubación.



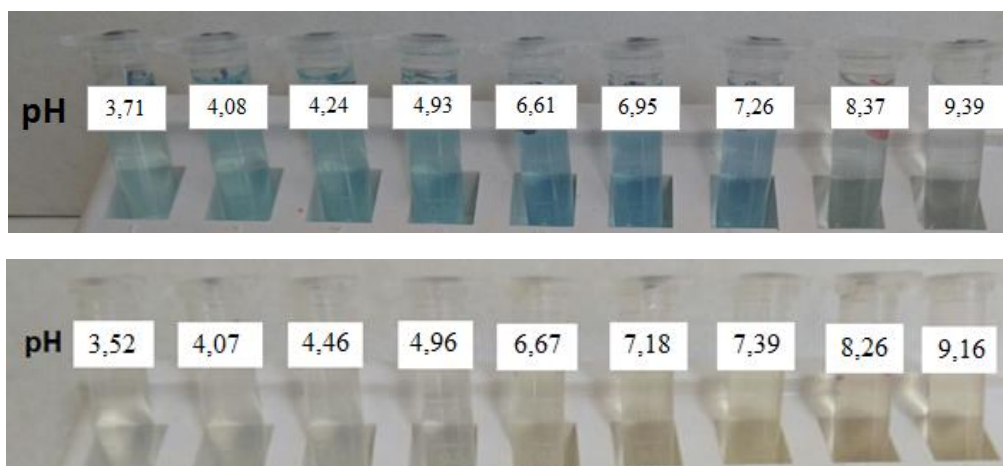
**Figura 40:** Muestras de C-Ficocianina a 4 °C en ausencia de luz y de azida. La imagen superior corresponde a tiempo inicial y en la inferior han pasado 85 días de incubación.



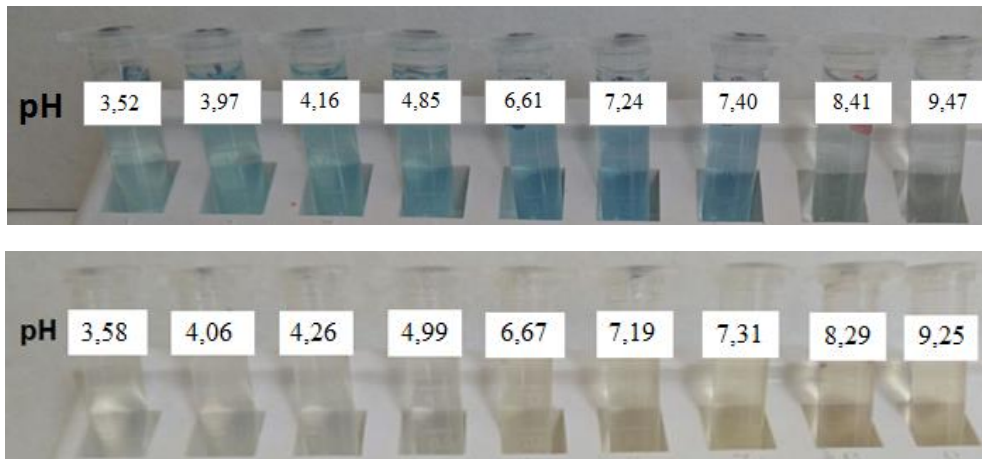
**Figura 41:** Muestras de C-Ficocianina a 25 °C en presencia de luz y ausencia de azida. La imagen superior corresponde a tiempo inicial y en la inferior han pasado 79 días de incubación.



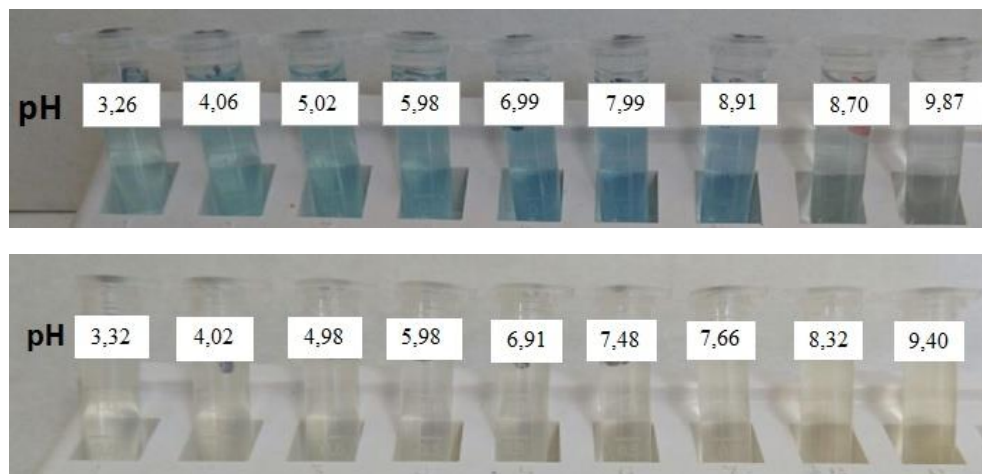
**Figura 42:** Muestras de C-Ficocianina a 25 °C en presencia de luz y de azida. La imagen superior corresponde a tiempo inicial y en la inferior han pasado 79 días de incubación.



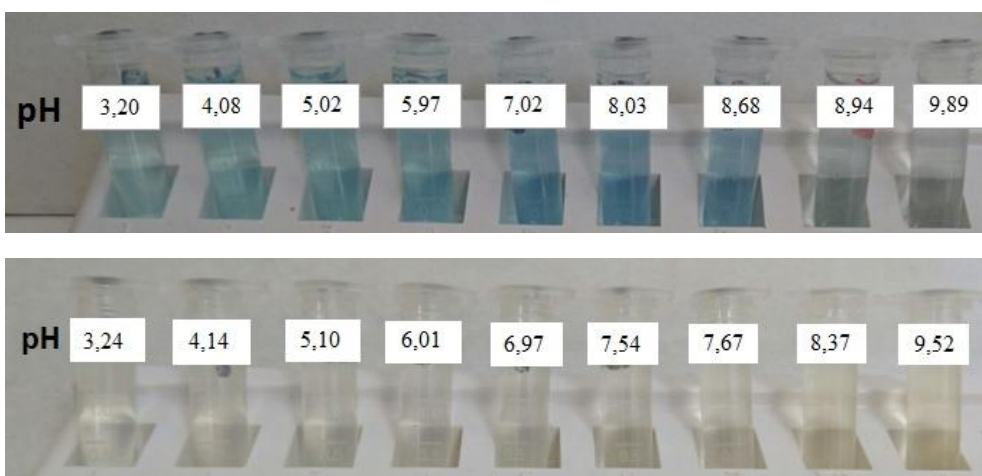
**Figura 43:** Muestras de C-Ficocianina a 25 °C en ausencia de luz y presencia de azida. La imagen superior corresponde a tiempo inicial y en la inferior han pasado 79 días de incubación.



**Figura 44:** Muestras de C-Ficocianina a 25 °C en ausencia de luz y de azida. La imagen superior corresponde a tiempo inicial y en la inferior han pasado 79 días de incubación.



**Figura 45:** Muestras de C-Ficocianina a 37 °C en presencia de luz y ausencia de azida. La imagen superior corresponde a tiempo inicial y en la inferior han pasado 37 días de incubación.



**Figura 46:** Muestras de C-Ficocianina a 37 °C en ausencia de luz y de azida. La imagen superior corresponde a tiempo inicial y en la inferior han pasado 37 días de incubación.



## V. CONCLUSIONES

### CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes que se pueden obtener con los resultados obtenidos en este trabajo son:

- La C-Ficocianina se encuentra como un trímero en estado nativo.
- Los parámetros que más influyen en la estabilidad de la C-Ficocianina son el tiempo de incubación, la temperatura y el pH.
- En un intervalo de pH entre 5,5-7,5 es donde la proteína presenta una mayor estabilidad, siendo el valor máximo del mismo 7.
- A pHs muy ácidos y muy básicos la proteína es muy poco estable perdiendo su color inmediatamente.
- A temperaturas bajas (-20 °C y 4 °C) la proteína se mantiene estable, al menos, durante dos meses.
- A temperaturas de 25 °C y 37 °C la proteína se mantiene en buenas condiciones menos de una semana.
- La presencia o ausencia de luz no afecta a la estabilidad de la C-Ficocianina.
- La presencia o ausencia de azida en las muestras de proteína no afecta a su estabilidad.
- Siguiendo el estudio de la estabilidad de la C-Ficocianina mediante espectrofotometría UV-visible y fluorescencia se obtienen los mismos resultados.



## VI. BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

- Arad, S. (Malis), & Yaron, A. (1992). Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends in Food Science & Technology*, 3(C), 92–97. [http://doi.org/10.1016/0924-2244\(92\)90145-M](http://doi.org/10.1016/0924-2244(92)90145-M)
- Bennet, A. & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of Cell and Biology*. 58, 419.
- Bermejo, R., Tobaruela, D. J., Talavera, 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(2), 616–624. [http://doi.org/10.1016/S0021-9797\(03\)00391-6](http://doi.org/10.1016/S0021-9797(03)00391-6)
- Bryant, D. A., Guglielmi, G., de Marsac, N. T., Castets, A.-M., & Cohen-Bazire, G. (1979). The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Archives of Microbiology*, 123(2), 113–127. <http://doi.org/10.1007/BF00446810>
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., & Bunnag, B. (2012). Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry*, 47(4), 659–664. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.010>
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Loha, V., Tia, S., & Bunnag, B. (2011). Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. *Bioresource Technology*, 102(14), 7159–64. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.067>
- Dasgupta, C. N. (2015). *Algal Biorefinery: An Integrated Approach*. (D. Das, Ed.), *Algal Biorefinery: An Integrated Approach*. Cham: Springer International Publishing. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-22813-6>
- Gantt, E. (1980). Structure and function of phycobilisomes: light harvesting pigment complexes in red and blue-green algae. *International Review of Cytology*. 32, 327–347
- Glazer, A. N. (1984). Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics*, 768(1), 29–51. [http://doi.org/10.1016/0304-4173\(84\)90006-5](http://doi.org/10.1016/0304-4173(84)90006-5)
- González-Ramírez, E., Andújar-Sánchez, M., Ortiz-Salmerón, E., Bacarizo, J., Cuadri, C., Mazzuca-Sobczuk, T., Martínez-Rodríguez, S. (2014). Thermal and pH Stability of the B-Phycoerythrin from the Red Algae *Porphyridium cruentum*. *Food Biophysics*, 9(2), 184–192. <http://doi.org/10.1007/s11483-014-9331-x>
- Jespersen, L., Strømdahl, L. D., Olsen, K., & Skibsted, L. H. (2004). Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. *European Food Research and Technology*, 220(3-4), 261–266. <http://doi.org/10.1007/s00217-004-1062-7>

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature*, 227, 680-685.

Lehninger, Nelson D. L., Cox M. M. "Principios de bioquímica", 6ª edición, Ed. Omega, 2015.

Marín-Prida, J., Llópiz-Arzuaga, A., Pavón, N., Pentón-Rol, G., Pardo-Andreu G.L. (2015). Aplicaciones de la C-Ficocianina: Métodos de obtención y propiedades farmacológicas. *Revista de ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*, 1(1), 29-43.

Ruiz-Ruiz, F., Benavides, J., & Rito-Palomares, M. (2013). Scaling-up of a B-phycoerythrin production and purification bioprocess involving aqueous two-phase systems: Practical experiences. *Process Biochemistry*, 48(4), 738-745. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.010>

Saxena, A. M. (1988). Phycocyanin aggregation. *Journal of Molecular Biology*, 200(3), 579-591. [http://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90544-X](http://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90544-X)

Shapiro, A. L., Viñuela, E., & V. Maizel, J. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 28(5), 815-820. [http://doi.org/10.1016/0006-291X\(67\)90391-9](http://doi.org/10.1016/0006-291X(67)90391-9)

Skoog, D.A., Holler F.J., Nieman T.A. "Principios de análisis instrumental", 5ª edición, Ed. Mc. Graw Hill, 2001.

Skoog, D. A., West D. M. "Análisis instrumental", 2ª edición, Ed. Mc Graw Hill, 1989

Weesepeol, Y., Gruppen, H., & Vincken, J.-P. (2015). Preliminary UHPLC-PDA-ESI-MS screening of light-accelerated autoxidation products of the tetrapyrrole biliverdin. *Food Chemistry*, 173, 624-8. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.072>



