

MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FICOBILIPROTEINAS A ESCALA INDUSTRIAL

CAMPO TÉCNICO

5

La presente divulgación se refiere a un método para la producción a gran escala de ficobiliproteínas a partir de algas fotosintéticas como la Spirulina, evitando el uso de reactivos con alto grado de toxicidad. Particularmente, el Método de extracción y purificación de ficobiliproteínas a escala industria permite obtener de manera ecológica y natural ficobiliproteínas de grado alimento. Este método permite extraer y purificar gran cantidad de ficobiliproteínas en un corto tiempo, permitiendo disminuir costos de producción y obtener producto de mejor calidad.

10

DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

15

Las algas son diversos grupos de organismos que incluyen macroalgas y microalgas. Las microalgas son algas microscópicas que incluyen las cianobacterias. Las microalgas son capaces de realizar la fotosíntesis y son de gran importancia para la vida.

20

La importancia de los productos naturales de alto valor que pueden obtenerse de fuentes renovables y su calidad nutricional ha ido creciendo en los últimos tiempos. Las materias primas de tercera generación, como las microalgas, han mostrado un gran potencial en la generación de productos valiosos según la cepa (Chew et al., 2018a,b). La cianobacteria *S. platensis* y *S. maxima* ha estado en el punto de mira por su gran potencial en la producción de alimentos y compuestos nutricionales, a saber, proteínas, carbohidratos, vitaminas, ácidos grasos y colorantes alimentarios (Kulshreshtha et al., 2008). Uno de los principales pigmentos que se pueden extraer de *S. platensis* y *S. maxima* es la C-ficocianina (C-PC). C-PC es un pigmento azul natural que forma parte del grupo de las ficobiliproteínas de las proteínas presentes en la espirulina. C-PC es ampliamente utilizado en la industria cosmética y de procesamiento de alimentos y posee actividad antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena. Puede ayudar a modular el metabolismo de lípidos y carbohidratos y controlar la aparición de enfermedades crónicas como la obesidad, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes (Chew et al., 2017; Khan et al.,

25

30

2005). Estos beneficios han llevado a los investigadores a centrarse en el desarrollo de un proceso eficiente para la extracción y purificación comercial de ficocianina.

La patente EP3802574A2 hace referencia a un proceso simplificado para la separación selectiva y la purificación de ficobiliproteínas, en particular ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina, a partir del extracto crudo de cianobacterias y/o algas que contienen mezclas de estas ficobiliproteínas, a nivel de laboratorio sin utilizar columnas cromatográficas, ultrafiltración u otras técnicas de alto costo. Este documento describe la separación y purificación de ficobiliproteínas presente en un extracto acuoso salino, haciéndolo pasar por una membrana de microfiltración. En particular, los materiales de partida son extractos de cianobacterias o extractos de algas como *Arthrospira platensis* (Spirulina) y extractos de *Porphyridium cruentum*, también se pueden emplear extractos de biomasa fresca o deshidratada. Este documento señala que las membranas de poro hidrofílicas se pueden seleccionar de membranas planas, membranas de fibra hueca, membranas capilares o tubulares de material hidrofílico, seleccionada de por ejemplo policarbonato y PVDF (fluoruro de polivinilideno).

La patente CN107011433B D2 describe un método para purificar ficocianina de *Rhizoma kudzu*, usando una columna de intercambio aniónica, de gel de agarosa, el documento señala que el método descrito es simple de operar, y la concentración y pureza de la ficocianina obtenida de kudzu chinensis se mejoran notablemente, y es un método apto para producción industrializada a gran escala.

El documento CN114213512A describe una composición para mejorar la estabilidad fototérmica de la ficobiliproteína, que comprende un extracto de algas azules y un extracto de algas rojas. También se refiere a un método de preparación de la composición para mejorar la estabilidad fototérmica de la ficobiliproteína, por un método de enzimólisis de acoplamiento hipertónico. La purificación y secado para obtener polvo de extracto de alga azul y extracto de alga roja se realiza usando una membrana de tamaño de poro de 10kDa.

No obstante, el constante desarrollo y actividad investigativa en este campo, persiste la necesidad de desarrollar métodos de obtención de ficobiliproteínas a escala industrial en

un corto tiempo, permitiendo disminuir costos de producción y obtener producto de mejor calidad.

BREVE DESCRIPCIÓN

5

La presente divulgación hace referencia a un método de extracción y purificación de ficobiliproteínas de grado alimento a escala industrial. Uno de los principales problemas en la extracción y purificación de ficobiliproteínas es el gran número de etapas, el uso de compuestos tóxicos durante el proceso de extracción y los bajos rendimientos de extracción.

10

El método propuesto, es un método que permite la obtención de ficobiliproteínas de grado alimento a escala industrial, que comprende una primera etapa de extracción que puede tener una duración entre 3 a 12 horas, para luego llevar a cabo una etapa de filtración por dos membranas la primera de 50 μ m y la segunda de 25 μ m a una presión mínima de 1bar y posteriormente se somete la solución obtenida a una nueva etapa de filtración por dos membranas de 5 μ m y de 1 μ m a una presión mínima de 1bar, para finalmente pasar la solución obtenida por radiación ultravioleta.

15

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Diagrama de flujo del proceso de extracción y purificación

FIG. 2 Coloración óptima de la solución después de la etapa de reposo

25

FIG. 3 Zonas de coloración después de la etapa de reposo

FIG.4 Coloraciones de extractos con tres tipos de espirulina

30

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Para propósitos de interpretar los términos usados a lo largo del presente documento se debe tener en cuenta su significado usual en el campo técnico, a menos que se incorpore

una definición particular o el contexto indique claramente lo contrario. Adicionalmente, los términos utilizados en forma singular también incluirán la forma plural.

El objeto principal de la presente divulgación es un método para extraer ficobiliproteínas a partir de una biomasa de microalgas fotosintéticas, en particular de cianobacterias. Dichas microalgas fotosintéticas se eligen en particular entre Rhodophyceae, Cryptophyceae y cianobacterias, más particularmente cianobacterias, aún más particularmente *Arthrospira platensis*, *Arthrospira maxima* y *Aphanizomenon flosaquae*, en particular la biomasa es de espirulina.

El término “ficobiliproteínas” se refiere a las proteínas pigmentarias hidrosolubles de la fotosíntesis, como la aloficocianina (APC), la familia de las ficocianinas (C-PC y R-PC), la familia de las ficoeritrinas (R-PE y C-PE), y ficoeritrocianina (PEC), aislado de ciertas microalgas o cianobacterias. Estas proteínas se caracterizan por su coloración azul y por su alto nivel antioxidante y por lo tanto es de interés en la industria cosmética, farmacéutica y de alimentos.

El método de la presente divulgación permite obtener altos rendimientos en la extracción y purificación de ficobiliproteínas y adicionalmente, de grado alimenticio.

El método de extracción y purificación de ficobiliproteínas a escala industrial comprende las siguientes etapas:

A. Mezclado

Mezclado de la biomasa de espirulina seca con soluciones amortiguadoras para desnaturalizar la membrana celular y facilitar el rompimiento de la misma. Las soluciones amortiguadoras usadas en la presente invención incluyen, pero no se limitan a soluciones amortiguadoras de fosfato, acetato, citrato, cloruro de calcio, Tris-HCl, Azida de sodio. El tiempo de mezclado se da entre aproximadamente 3 a 20 minutos. El mezclado se puede llevar a cabo en tanques de mezcla o agitadores conocidos por la persona medianamente versada en la materia; en una modalidad, el proceso de mezclado se lleva a cabo en un biorreactor.

B. Ruptura celular

Posterior a la etapa de mezclado, se busca romper las células de la biomasa de espirulina, para realizar la extracción de las ficobiliproteínas. Para llevar a cabo esta ruptura celular, la presente invención incluye, pero no se limita a los siguientes métodos:

- 5 Extracción por congelación y descongelación, en donde la biomasa de espirulina se pone en contacto con amortiguadores de extracción, esta solución se congela a una temperatura entre -24°C a -18°C por entre 3-4 horas y se descongela por entre 1 a 1.5 horas, este ciclo se repite 4 a 5 veces.
- 10 Extracción por campo eléctrico pulsado (PEF), en donde la biomasa de espirulina se pone en contacto con amortiguadores de extracción, para posteriormente ser colocada en una cámara de PEF de 50 a 200 pulsos a 20kV.
- 15 Extracción por alta presión (HPP), en donde la biomasa de espirulina se pone en contacto con amortiguadores de extracción, posteriormente, esta solución de biomasa se transfiere en botellas de plástico de polietileno de alta densidad selladas al vacío. Las botellas son sometidas a tratamiento HPP durante 3,5 min con presiones entre 50 y 600 MPa.
- 20 Extracción por ultrasonido, en donde la biomasa de espirulina se pone en contacto con amortiguadores de extracción, posteriormente esta solución se almacena en tubos cónicos que son sometidos a ultrasonido. Este proceso se lleva a cabo en frío con agua/hielo. Las ondas ultrasónicas de alta frecuencia generan el colapso implosivo de las burbujas de cavitación llenas de gas e intensas ondas de choque a miles de presiones atmosféricas que
- 25 rompen las paredes celulares.

C. FILTRACIÓN

- En la etapa de filtración se busca retener impurezas de gran tamaño, como por ejemplo
- 30 sedimentos y sólidos suspendidos. Para efectos de la presente invención, se utilizan dos membranas, una de $50\mu\text{m}$ y otro de $25\mu\text{m}$ ambas a una presión mínima de 1bar. Las membranas de filtración pueden ser membranas planas, membranas de fibra hueca, membranas capilares o tubulares. En una modalidad, las membranas son tipo cartucho de polipropileno plisado y polipropileno aglomerado.

D. PURIFICACIÓN

En la etapa de purificación de ficobiliproteínas, se filtra la solución obtenida en la etapa C por dos membranas, la primera de 5µm y la segunda de 1µm ambas a una presión mínima de 1bar. Posteriormente, se somete a esterilización UV para eliminar microorganismos. En una modalidad, la purificación se realiza con una lámpara de rayos ultravioleta de onda corta (UVC) de mínimo 4W.

10 En particular, el método de la presente divulgación comprende las siguientes etapas:

- mezclar la biomasa de las algas fotosintéticas con solución amortiguadora en un biorreactor a una temperatura entre 20°C a 30°C; agitar la mezcla anterior durante 3 a 5 minutos; dejar reposar la mezcla durante 7 a 12 horas;
- filtrar la solución por dos membranas una de 50 µm y otro a 25 µm ambas a una presión mínima de 1bar;
- filtrar la solución obtenida en la etapa anterior por dos membranas de 5µm y 1µm a una presión mínima de 1bar;
- esterilizar la solución obtenida en la etapa anterior con luz UV.

20 En una modalidad particular, el método aquí descrito comprende las etapas de:

- mezclar la biomasa de las algas fotosintéticas con solución de fosfato de potasio dibásico y fosfato de potasio monobásico en un biorreactor a una temperatura entre 25°C a 30°C; agitar la mezcla anterior durante 3 a 5 minutos; dejar reposar la mezcla durante 7 horas;
- filtrar la solución por dos membranas una de 50µm y otro a 25µm ambas a una presión mínima de 1bar;
- filtrar la solución obtenida en la etapa anterior por dos membranas de 5µm y 1µm a una presión mínima de 1bar;
- esterilizar la solución obtenida en la etapa anterior con luz UV.

En otra modalidad, el método aquí descrito comprende las siguientes etapas:

- mezclar la biomasa de las algas fotosintéticas con solución de fosfato de potasio dibásico y fosfato de potasio monobásico en un biorreactor a una

temperatura entre 25°C a 30°C; agitar la mezcla anterior durante 3 a 5 minutos; dejar reposar la mezcla durante 12 horas;

- filtrar la solución por dos membranas una de 50µm y otro a 25µm ambas a una presión mínima de 1bar;
- 5 - filtrar la solución obtenida en la etapa anterior por dos membranas de 5µm y 1µm a una presión mínima de 1bar;
- esterilizar la solución obtenida en la etapa anterior con luz UV.

En una modalidad, el método aquí descrito comprende las siguientes etapas:

- 10 - mezclar la biomasa de las algas fotosintéticas con solución de fosfato pH 7.5 100 mM en un biorreactor a una temperatura entre 25°C a 30°C; agitar la mezcla anterior durante 3 a 5 minutos; dejar reposar la mezcla durante 7-12 horas;
- filtrar la solución por dos membranas una de 50µm y otro a 25µm tipo
- 15 cartucho de polipropileno, ambas a una presión mínima de 1bar;
- filtrar la solución obtenida en la etapa anterior por dos membranas de 5µm y 1µm tipo cartucho de polipropileno a una presión mínima de 1bar;
- esterilizar la solución obtenida en la etapa anterior con luz UV.

20 En otra modalidad, el método aquí descrito comprende las etapas de:

- mezclar la biomasa de las algas fotosintéticas con solución de fosfato pH 7.5 100 mM en un biorreactor a una temperatura entre 25°C a 30°C; agitar la mezcla anterior durante 3 a 5 minutos; dejar reposar la mezcla durante 7-12 horas;
- 25 - filtrar la solución por dos membranas una de 50µm y otro a 25µm tipo cartucho de polipropileno, ambas a una presión mínima de 1bar;
- filtrar la solución obtenida en la etapa anterior por dos membranas de 5µm y 1 µm tipo cartucho de polipropileno a una presión mínima de 1bar;
- esterilizar la solución obtenida en la etapa anterior con luz UVC de mínimo
- 30 4W.

En una modalidad, el método aquí descrito comprende las etapas de:

- mezclar la biomasa de espirulina con solución de fosfato pH 7.5 100 mM en un biorreactor a una temperatura entre 25°C a 30°C; agitar la mezcla anterior durante 3 a 5 minutos; dejar reposar la mezcla durante 7-12 horas;

- filtrar la solución por dos membranas una de 50µm y otro a 25µm tipo cartucho de polipropileno, ambas a una presión mínima de 1bar;
- filtrar la solución obtenida en la etapa anterior por dos membranas de 5µm y 1 µm tipo cartucho de polipropileno a una presión mínima de 1bar;
- 5 - esterilizar la solución obtenida en la etapa anterior con luz UVC de mínimo 4W.

EJEMPLOS

10 **Ejemplo 1: Etapa 1 - Tiempo mínimo y máximo de reposo**

- *Tiempo mínimo*

En una modalidad de la invención, el método comprende una primera etapa donde se debe
15 mezclar la biomasa de espirulina durante 5 min a una velocidad de 80 rpm hasta que la solución este completamente verde. La velocidad y tiempo de mezclado varía en función de la cantidad de biomasa espirulina implementada en el proceso de extracción.

Se mezclan 15g de biomasa de espirulina obtenida de cultivos en fotobiorreactores
20 (solicitud de patente NC2021/0014692), con 1L de solución amortiguadora (Solución fosfato pH 7.5 100 mM utilizando fosfato monobásico y fosfato dipotásico grado USP). Luego se deja reposar la mezcla por 7 horas. Una vez culminado el tiempo de reposo, la solución debe evidenciar de dos a tres zonas, en donde la parte superior e inferior debe mostrar sedimentos característicos de color marrón verdoso, y se debe evidenciar una
25 zona de color violeta correspondiente a las ficobiliproteínas, esta es la solución que se utilizara en las etapas posteriores 2 a 4. Si el color no es lo suficiente morado, ver FIG. 2, la cantidad de ficobiliproteínas extraída será menor. Ver resultados en la Tabla 1.

- *Tiempo máximo*

30

En una modalidad de la invención, el método comprende una primera etapa donde se debe mezclar durante 5 min a una velocidad de 80 rpm hasta que la solución este completamente verde. La velocidad y tiempo de mezclado varía en función de la cantidad de biomasa espirulina implementada en el proceso de extracción.

35

Se mezclan 15g de biomasa de espirulina obtenida de cultivos en fotobiorreactores (solicitud de patente NC2021/0014692), con 1L de solución amortiguadora (solución fosfato pH 7.5 100 mM utilizando fosfato monobásico y fosfato dipotasico grado USP). Luego dejar reposar la mezcla por 12 horas. Una vez culminado el tiempo de reposo, la solución debe evidenciar de dos a tres zonas, en donde la parte superior e inferior debe mostrar sedimentos característicos de color marrón verdoso, y se debe evidenciar una zona de color violeta correspondiente a las ficobiliproteínas FIG. 3, esta es la solución que se utilizara en las etapas posteriores 2 a 4.

- 10 La temperatura para este proceso debe ser controlada para facilitar la correcta extracción y debe encontrarse entre 25 a 30°C.

A continuación, se muestran los resultados del proceso de extracción usando diferentes tiempos de extracción y concentración de biomasa.

15

Tabla 1: Resultados del proceso de obtención de ficobiliproteínas

Concentraciones en la 1Etapa.	CPC (mg/ml)	APC (mg/ml)	CPCt (mg/ml)	Pureza	Tiempo de extracción (horas)
15g/l	0,36	0,130	0,49	0,95	7
15g/L	1,07	0,459	1,52	0,81	12
60 g/L	2,86	0,822	3,68	0,86	12

[CPC] es la concentración de C-Ficocianina

[APC] la concentración de aloficocianina

[CPCT] la concentración total de C-Ficocianina presente en la muestra.

20

Los resultados se obtuvieron usando el método de absorbancia, utilizando las longitudes de onda A618nm y A652nm, y las ecuaciones 3 4 y 5 descritas por (Bennet et al, 1973; Bryant et al, 1979; Bermejo et al, 2003):

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

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

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

Por otro lado, se determinó la pureza de la proteína a través de la relación entre la absorbancia a 618nm y a 280nm (A_{618}/A_{280}). Es importante señalar que 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). Es decir que las ficobiliproteínas obtenidas por el método aquí descrito presentan un alto grado de pureza, ya que en todos los casos el valor es superior a 0,7.

Ejemplo 2: Etapas 2, 3 y 4 – Filtración y esterilización

- 10 En la segunda etapa se filtra la solución obtenida a través de una membrana de 50 μm y una segunda membrana de 25 μm tipo cartucho de polipropileno plisado para retención de sedimentos.

- 15 En la tercera etapa se filtra la solución obtenida a través de una membrana de 5 μm y una segunda membrana de 1 μm tipo cartucho de polipropileno aglomerado para retención de sólidos suspendidos,

Los filtros implementados deben estar certificados bajo la norma NSF/FDA. Para no afectar la calidad de la solución.

- 20 Finalmente, la cuarta etapa, la solución obtenida se somete a esterilización con luz UV. Para esto la solución fluye por una lámpara de UVC de mínimo 4W y con un caudal de 2L/min durante 3 min. Una mayor potencia de la lámpara eliminara y esterilizara mejor la solución.

Para llevar a cabo el proceso con excelentes resultados se debe emplear una bomba de alta presión, máximo 125 psi y un flujo mínimo de 2L/min.

Ejemplo 3: Método de extracción utilizando 3 biomásas de espirulina de cultivos diferentes.

5

Un factor determinante en la calidad y pureza de las ficobiliproteínas, es la procedencia de la biomasa espirulina, ya que si proviene de cultivos en estanques (RACEWAY), su concentración es poca e inestable. A continuación, se evidencia la presencia de ficobiliproteínas de la extracción de tres tipos de espirulina, donde la izquierda de color

10

azul es biomasa cultivada en fotobiorreactores y las otras dos (verde) son cultivadas en estanques (Raceway). Ver FIG. 4. El color permite evidenciar que la cantidad de ficobiliproteínas obtenida de biomasa cultivada en fotobioreactores es mayor que la obtenida a partir de biomasa cultivada en estanques.

FIGURAS

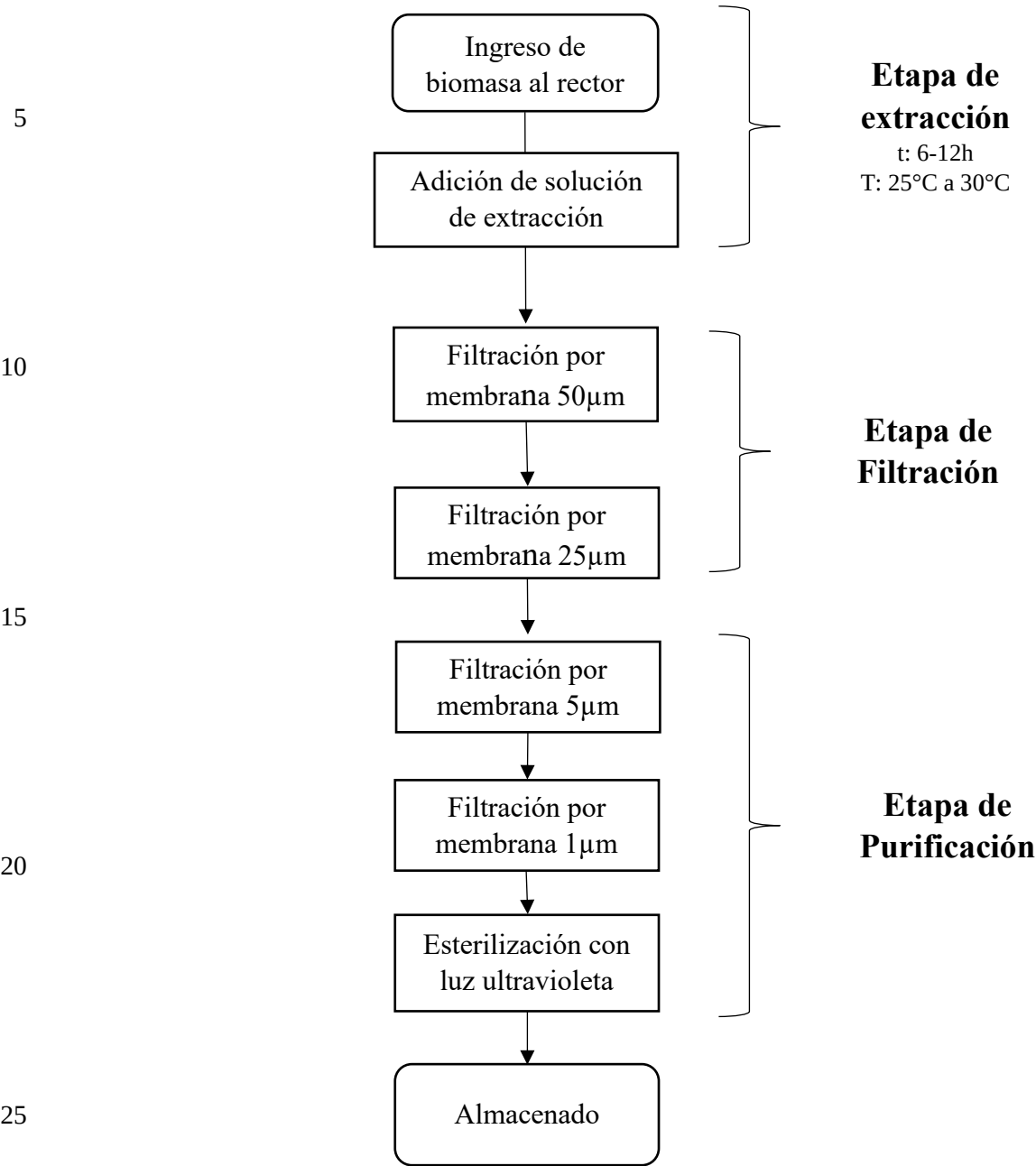


FIG.1



FIG. 2



FIG. 3

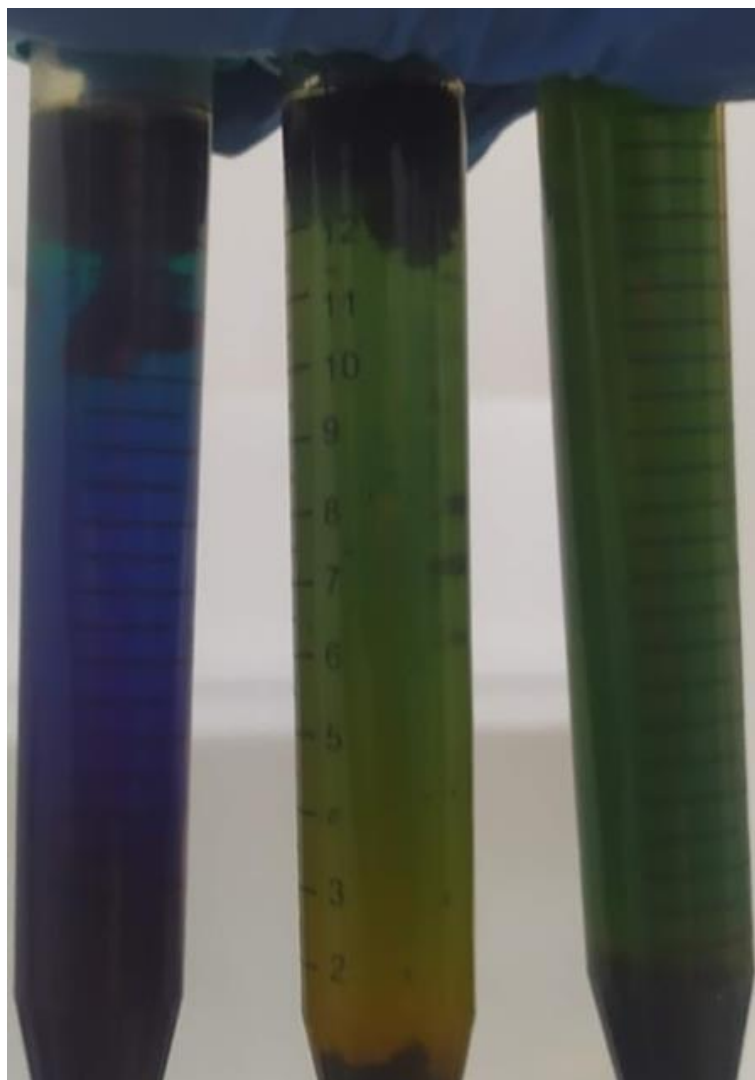


FIG. 4

REIVINDICACIONES

1. Un método de extracción y purificación de ficobiliproteínas que comprende:
 - mezclar biomasa de algas con una solución tampón durante 3 a 10 minutos;
 - 5 - dejar reposar la mezcla por 6 a 12 horas;
 - pasar la solución obtenida por dos membranas la primera de 50µm y la segunda de 25µm a una presión mínima de 1bar;
 - pasar la solución por dos membranas de 5µm y de 1µm a una presión mínima de 1bar;
 - 10 - pasar la solución por luz ultravioleta.
2. El método de la Reivindicación 1, en donde las algas se seleccionan de *Arthrospira platensis*, *Arthrospira maxima*, y *Aphanizomenon flosaquae*.
- 15 3. El método de la Reivindicación 1, en donde la solución tampón se selecciona de solución de fosfato, acetato, citrato, cloruro de calcio, Tris-HCl, Azida de sodio.
4. El método de la Reivindicación 3, en donde la solución tampón es una solución de fosfato de potasio dibásico y fosfato de potasio monobásico.
- 20 5. El método de la Reivindicación 1, en donde la etapa de mezclado y reposo se llevan a cabo a una temperatura entre 25°C y 30°C.
6. El método de la Reivindicación 1, en donde la mezcla se deja reposar por
- 25 aproximadamente 7 horas.
7. El método de la Reivindicación 1, en donde las membranas son tipo cartucho de polipropileno plisado y polipropileno aglomerado.

30

RESUMEN

La presente divulgación hace referencia a un método de extracción y purificación de ficobiliproteínas de grado alimento a escala industrial evitando el gran número de etapas,
5 el uso de compuestos tóxicos durante el proceso de extracción y los bajos rendimientos de extracción.
