

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 325 847**

21 Número de solicitud: 200702782

51 Int. Cl.:

**C07K 1/36** (2006.01)

**C07K 1/18** (2006.01)

**C07K 1/22** (2006.01)

**C07K 1/30** (2006.01)

**C07K 14/405** (2006.01)

**C07K 14/795** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **16.10.2007**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **21.09.2009**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**21.09.2009**

71 Solicitante/s: **Universidad de Jaén  
OTRI-Campus Las Lagunillas, s/n - Edif. B-1  
23071 Jaén, ES  
Universidad de Almería**

72 Inventor/es: **Bermejo Román, Ruperto y  
Acién Fernández, Francisco Gabriel**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Proceso escalable para la obtención de ficocianina.**

57 Resumen:

Proceso escalable para la obtención de ficocianina. Proceso de tres etapas para la obtención y purificación de ficocianina procedente de microalgas del género *Anabaena*, caracterizado por ser escalable y tener un alto rendimiento. La primera etapa consiste en una ruptura celular mediante choque osmótico que libera el material citoplasmático, usando tampón de fosfatos. La segunda etapa utiliza una columna cromatográfica de adsorción en lecho expandido constituida por un intercambiador iónico como fase adsorbente. La tercera etapa es un proceso adicional cromatográfico en columna de intercambio iónico que utiliza como fase estacionaria un cambiador aniónico, funcionando en formato empaquetado. En condiciones óptimas, tras la segunda etapa se obtiene un rendimiento en torno al 87% de recuperación de ficocianina, mientras que tras la tercera etapa se obtiene un rendimiento global del proceso del 64% de ficocianina pura.

ES 2 325 847 A1

## DESCRIPCIÓN

Proceso escalable para la obtención de ficocianina.

5 **Sector de la técnica**

La C-ficocianina es una macromolécula biológica perteneciente a la familia de las ficobiliproteínas con aplicaciones en diversos sectores industriales como consecuencia de sus extraordinarias propiedades espectroscópicas, tanto absorciométricas como fluorimétricas.

10 En concreto, su elevado coeficiente de extinción molar a  $\lambda = 620$  nm, le confiere un intenso color azul muy apropiado para su empleo como colorante natural, mientras que su elevado rendimiento cuántico de fluorescencia permite su detección con mayor o similar sensibilidad que otros fluoróforos convencionales.

15 **Estado de la técnica**

Las ficobiliproteínas son una familia de proteínas que poseen grupos prostéticos tetrapirrólicos, denominados bilinas, que en su estado funcional se encuentran enlazados covalentemente a los residuos cisteína de las cadenas de las apoproteínas. Estas proteínas se encuentran en algas verde-azuladas denominadas cianobacterias, en una clase de algas unicelulares biflageladas eucariotas denominadas algas criptomonadales y en algas rojas o rodofitas. En todos estos organismos las ficobiliproteínas actúan como pigmentos fotosintéticos antena y suelen estar organizadas formando parte de unas macroestructuras celulares denominadas ficobilisomas. Atendiendo a sus propiedades espectroscópicas de absorción se clasifican en tres grupos principales: ficoeritrinas (PEs,  $\lambda_{\text{max}}$ -540-570 nm), ficocianinas (PCs,  $\lambda_{\text{max}}$ -610-620 nm) y aloficocianinas (APCs,  $\lambda_{\text{max}}$ -650-655 nm).

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

35 Dentro de la familia de las ficobiliproteínas, la C-ficocianina constituye una macromolécula interesante para el conjunto de aplicaciones anteriormente citadas como consecuencia de sus características espectroscópicas. Además, posee propiedades fluorescentes específicas tales como su elevado rendimiento cuántico y desplazamiento de Stokes, que evitan interferencias en la detección procedente de matrices biológicas u otros medios en los que puede utilizarse. Todas estas ventajas hacen que la C-ficocianina se esté utilizando en la actualidad como marcador fluorescente conjugado a anticuerpos, lectinas, polisacáridos, DNA y otras macromoléculas y macroestructuras supramoleculares. También se usa en el diseño y caracterización de elementos fotosensibles en biosensores y en tratamientos terapéuticos desarrollados a nivel de animales de experimentación. Otras utilidades, debidas a su intenso y único color azul, son el empleo como colorante natural en preparaciones cosméticas, farmacéuticas y de la industria alimentaria.

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

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

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

60 - Son difícilmente escalables porque los procesos implicados en la obtención del producto sólo han sido estudiados a escala analítica de laboratorio y en la mayoría de los casos las etapas que se precisan no permiten su paso al nivel de planta piloto o industrial.

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

Por todo lo anterior, la presente invención aporta, respecto a otros procedimientos conocidos, un mayor rendimiento del proceso, extrayéndose del orden del 64% del contenido de la C-ficocianina contenida en la biomasa de ciertas microalgas, y una reducción de costes de obtención. Además, a diferencia de los procesos conocidos, las etapas en que se divide la purificación son fácilmente escalables.

## Explicación de la invención

### Objeto de la invención

La presente invención tiene por objeto el desarrollo de un proceso basado en las propiedades de la cromatografía de adsorción en lecho expandido, para la purificación a elevado rendimiento de la proteína C-ficocianina procedente de microalgas del género *Anabaena*.

### Resumen de la invención

Proceso de tres etapas para la obtención y purificación de ficocianina procedente de microalgas del género *Anabaena*, caracterizado por ser escalable y tener un alto rendimiento. La primera etapa consiste en una ruptura celular mediante choque osmótico que libera el material citoplasmático, usando tampón de fosfatos. La segunda etapa utiliza una columna cromatográfica de adsorción en lecho expandido constituida por un intercambiador iónico como fase adsorbente. La tercera etapa es un proceso adicional cromatográfico en columna de intercambio iónico que utiliza como fase estacionaria un cambiador aniónico, funcionando en formato empaquetado. En condiciones óptimas, tras la segunda etapa se obtiene un rendimiento en torno al 87% de recuperación de ficocianina, mientras que tras la tercera etapa se obtiene un rendimiento global del proceso del 64% de ficocianina pura.

### Descripción detallada de la invención

Se describen a continuación las tres etapas para la obtención y purificación de C-ficocianina a partir de microalgas del género *Anabaena*.

*Primera etapa:* Pretratamiento inicial en el que se mezcla la biomasa de microalga con tampón y tras la correspondiente homogeneización, se produce la ruptura celular debido al choque osmótico. De esta forma, se permite la liberación del contenido intracelular del cual forman parte los ficobilisomas, que son las macroestructuras que contienen las ficobiliproteínas.

A continuación, el homogeneizado se somete a un proceso de centrifugación que sedimenta las macroestructuras supramoleculares (como restos de paredes celulares) y proporciona un sobrenadante (extracto crudo) en el que se encuentran solubilizadas la mayor parte de los componentes del microalga. En este extracto crudo, junto a otras macromoléculas y solutos moleculares, se encuentra la C-ficocianina. El rendimiento de esta primera etapa alcanza el 100% de recuperación de la ficocianina contenida en el microalga.

*Segunda etapa:* Consiste en la utilización de una columna cromatográfica de adsorción en lecho expandido constituida por un intercambiador iónico como fase adsorbente. Esta etapa permite simplificar mucho el proceso frente a metodologías previas convencionales. Se han estudiado y optimizado las características y condiciones que deben tener tanto la columna de lecho expandido, como la fase móvil utilizada y la muestra a cromatografiar. Los resultados muestran que utilizando una fase móvil compuesta por tampón fosfato, tras la aplicación de la muestra a la columna, se adsorbe preferencialmente la C-ficocianina, mientras que la mayor parte de los componentes existentes en el extracto crudo procedente del tratamiento inicial no son retenidos en la fase adsorbente. Tras la aplicación de la muestra, se lleva a cabo la elución de las proteínas adsorbidas dejando sedimentar el lecho expandido, de tal forma que se trabaja en formato empaquetado o clásico.

En la elución se utiliza una fase móvil compuesta por tampón fosfato. En estas condiciones se consigue la separación de la práctica totalidad de la C-ficocianina retenida, junto a una pequeña cantidad de otras proteínas contaminantes. El porcentaje de recuperación en esta segunda etapa o rendimiento medio de la misma, depende directamente de la viscosidad de la muestra que se aplica a la columna de lecho expandido y de la cantidad de proteína cargada en la fase de aplicación (es decir, de la relación mg C-ficocianina/ml de adsorbente). La Tabla 1 muestra la influencia de estos parámetros en el porcentaje total de recuperación logrado en esta segunda etapa.

TABLA 1

Rendimiento medio (%) recuperación	C-ficocianina cargada (mg)	Ratio (mg C-PC/ ml adsorbente)
82	21	0.80
83	26	1.00
84	31	1.20
87	36	1.40
86	41	1.60
81	47	1.80

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

Tras la segunda etapa las fracciones eluidas de la columna corresponden a disoluciones concentradas de C-ficocianina, con pequeñas impurezas de otras proteínas que no han sido eliminadas totalmente en el proceso cromatográfico en lecho expandido.

En condiciones adecuadas, el porcentaje medio de recuperación de C-ficocianina en esta segunda etapa es del 87%.

*Tercera etapa:* Consiste en hacer pasar el producto de la segunda etapa a través de una columna cromatográfica de intercambio iónico que utiliza como fase estacionaria un cambiador aniónico, funcionando en formato empaquetado. La muestra se aplica a la cabeza de la columna y, seguidamente se desarrolla utilizando un gradiente discontinuo de fase móvil. Inicialmente, se trata con tampón fosfato de baja fuerza iónica, que permite la retención de C-ficocianina en el soporte sólido mientras que el resto de proteínas que contiene la muestra no son retenidas y eluyen en el frente de fase móvil, recogién dose a la salida de la columna. A continuación se aumenta la fuerza iónica de la fase móvil y con ello se provoca la elución de la C-ficocianina enlazada inicialmente y permite la obtención de una disolución constituida por la proteína pura. El análisis por anisotropía de emisión en estado estacionario muestra que la proteína obtenida conserva la estructura trimérica, tal y como se encuentra en su forma nativa, en los ficobilisomas del organismo de procedencia.

#### Modo de realización preferido

*Primera etapa:* Como materia prima del proceso se utilizan partidas de la microalga liofilizada para su almacenamiento y transporte, preferentemente *Anabaena marina*.

En esta especie, las ficobiliproteinas constituyen en torno al 1.6% del peso seco.

La biomasa se resuspende en tampón fosfato, preferentemente 50 mM con un pH entre 5 y 7.5, más preferentemente pH 7, utilizando una razón de 1 litro de tampón por cada 0.1 - 1.0 kilogramos de biomasa liofilizada, preferentemente 1 litro de tampón por cada 0.25 kilogramos de biomasa liofilizada.

Tras agitación mecánica, preferentemente durante una hora, para conseguir la ruptura celular por choque osmótico, el homogeneizado resultante se centrifuga, preferentemente de 5 a 30 minutos a 5000 - 30000 rpm, más preferentemente a 15000 rpm durante 10 minutos, obteniéndose un sobrenadante (extracto crudo) y un sedimento que es desechado.

Al extracto crudo se añade un conservante, preferentemente azida sódica, hasta una concentración del 0.01% y se guarda refrigerada a unos 4°C hasta su posterior utilización.

La determinación de la cantidad de C-ficocianina contenida en el extracto crudo da un valor óptimo del 100% de recuperación.

*Segunda etapa:* Se equilibra con tampón fosfato, preferentemente con 200 ml de tampón fosfato 50 mM pH 7, una columna de 1.5 - 6 cm. de diámetro interno, preferentemente 1.5 cm. de diámetro interno, y 50 cm. de altura conteniendo 27 ml de cambiador iónico Streamline-DEAE<sup>®</sup>, lo que genera una altura de lecho empaquetado de unos

## ES 2 325 847 A1

15 cm. El lecho se expande con un progresivo aumento del caudal de fase móvil impulsado con una bomba peristáltica, hasta llegar a un valor de 200 cm h<sup>-1</sup>. Tras esto, se alcanza el doble de la altura inicial de lecho empaquetado, llegando hasta 30 cm.

5 El extracto crudo procedente del tratamiento inicial se aplica hasta alcanzar preferentemente una carga proteica igual a 1.4 mg C-ficocianina/ml de adsorbente. A continuación, 100 ml de esta disolución tamponada, preferentemente con tampón fosfato 50 mM pH 7, se bombean a través de la columna de lecho expandido, preferentemente a una velocidad de 200 cm h<sup>-1</sup>. Después de la aplicación de la muestra, la columna se lava, preferentemente con 100 ml del mismo tampón utilizado en la aplicación de la muestra, preferentemente a la misma velocidad de flujo e igual grado de expansión en el lecho cromatográfico. Con ello se consigue reducir al mínimo posible la pérdida de C-ficocianina en las fases de aplicación y lavado.

15 A continuación se procede a la elución en formato de lecho empaquetado clásico, lo que se logra cortando el flujo de fase móvil y dejando sedimentar el lecho expandido hasta la configuración empaquetada. La C-ficocianina adsorbida en el lecho expandido se eluye utilizando preferentemente tampón fosfato, más preferentemente tampón fosfato 500 mM pH 7, preferentemente a una velocidad de flujo de 86 cm h<sup>-1</sup>. Las fracciones recogidas son de color azul intenso, con una presencia mayoritaria de C-ficocianina junto a una pequeña cantidad de otras proteínas. La pureza de la C-ficocianina obtenida en esta etapa permite su utilización en diversos usos, entre ellos el uso como colorante alimentario o en cosmética.

20 El rendimiento de esta segunda etapa, en las condiciones preferentes descritas, es del orden del 87%, expresado como porcentaje de cantidad total de C-ficocianina recuperada en el eluato por cantidad de proteína cargada en la columna.

25 Para el modo de realización preferido descrito, esta etapa de cromatografía en lecho expandido incluye: un proceso de equilibración (15 minutos), otro de aplicación de la muestra (17 minutos), un tercero de lavado de la columna (14 minutos) y finalmente la elución en formato empaquetado (18 minutos), lo que constituye un total de 64 minutos de operación.

30 *Tercera etapa:* Los resultados de la segunda etapa muestran que la purificación hasta homogeneidad de C-ficocianina, para su uso en aplicaciones que requieren proteína pura, precisa de una etapa adicional que se concreta en la necesidad del empleo de cromatografía de intercambio iónico en lecho estacionario, preferentemente de DEAE-celulosa DE-52.

35 La disolución obtenida en la segunda etapa se aplica a una columna de 2.5 - 9.0 cm. de diámetro interno y 20 cm. de altura, preferentemente de 2.5 cm. de diámetro interno, preferentemente equilibrada con tampón fosfato, más preferentemente tampón fosfato 50 mM pH 7. Seguidamente, la columna se desarrolla con tampón, preferentemente 110 ml de tampón fosfato, más preferentemente 110 ml de tampón fosfato 290 mM pH 7, lo que permite obtener un eluato de C-ficocianina, visualizado como una intensa banda azul. A continuación se procede al lavado de la columna con tampón fosfato, preferentemente tampón fosfato 400 mM pH 7.

En todas las fases de este proceso cromatográfico, la velocidad de flujo se mantiene constante e igual a 21 cm h<sup>-1</sup>.

45 El análisis de las fracciones recogidas mediante espectroscopia de absorción y de fluorescencia, así como mediante electroforesis, muestra que los resultados son consistentes con los mencionados en la bibliografía para disoluciones puras de C-ficocianina.

El rendimiento de esta tercera etapa, para el modo de realización preferido descrito, es del 74%.

50 El procedimiento compuesto por las tres etapas, en las condiciones descritas para el modo de realización preferido, alcanza un rendimiento global del 64% de recuperación de C-ficocianina respecto a la contenida en la materia prima utilizada.

55 En resumen, la presente invención consiste en un proceso de obtención y purificación de C-ficocianina en dos etapas, siendo la primera de ellas la ruptura celular por choque osmótico y la segunda la utilización de cromatografía de adsorción en lecho expandido, que utiliza como materia prima microalgas del género *Anabaena* y obtiene un porcentaje de recuperación de C-ficocianina mayor del 75% del contenido en la materia prima. Preferiblemente la especie utilizada como materia prima es *Anabaena marina*.

60 En el proceso de obtención y purificación de C-ficocianina, tras estas dos etapas se obtienen disoluciones concentradas de C-ficocianina con ligeras impurezas de otras proteínas. Esta ficocianina tiene pureza suficiente para su empleo en diversas aplicaciones, entre ellas el uso en la industria alimentaria y cosmética.

65 En la etapa de ruptura celular mediante choque osmótico se emplea tampón, en particular tampón fosfato, a pH entre 5 y 7.5, preferentemente tampón fosfato 50 mM pH 7, y posteriores fases sucesivas de mezcla, homogeneización mecánica y centrifugación.

## ES 2 325 847 A1

Se recomienda utilizar una razón de 1 litro de tampón por cada 0.1 - 1.0 kilogramos de biomasa liofilizada, preferentemente 1 litro de tampón por cada 0.25 kilogramos de biomasa liofilizada. La centrifugación posterior puede realizarse durante 5-30 minutos a 5000-30000 rpm, preferentemente durante 10 minutos a 15000 rpm.

5 La segunda etapa del proceso consiste en la utilización de una columna cromatográfica de adsorción en lecho expandido, preferentemente de 1.5 - 6.0 cm. de diámetro interno y 50 cm. de altura, constituida por un intercambiador iónico como fase adsorbente. La columna se desarrolla utilizando una fase móvil constituida por tampón, preferentemente tampón fosfato 50 mM pH 7 en las fases de aplicación de la muestra y lavado de la columna y tampón fosfato 500 mM pH 7 en la fase de desorción. En esta segunda etapa, se recomienda una velocidad de flujo de fase móvil de 200 cm h<sup>-1</sup>, en las fases de aplicación de la muestra y lavado de la columna y de 86 cm h<sup>-1</sup> en la fase de elución de la muestra.

15 Adicionalmente, para obtener un grado de pureza superior en ficocianina, se puede utilizar una tercera etapa consistente en la utilización de una columna cromatográfica, preferentemente de 2.5 - 9 cm. de diámetro interno y 20 cm. de altura, de intercambio iónico en lecho empaquetado clásico, preferentemente de DEAE-celulosa DE-52. La columna es desarrollada utilizando una fase móvil constituida por tampón fosfato, preferentemente tampón fosfato 50 mM pH 7, en las fases de equilibrado y aplicación de la muestra, y tampón fosfato 290 mM pH 7 en la fase de elución.

20 En las fases de aplicación, elución y lavado de la columna se recomienda utilizar una velocidad de flujo de fase móvil de de 21 cm h<sup>-1</sup>.

Tras esta tercera etapa, la ficocianina obtenida puede ser empleada en aplicaciones que precisan de una mayor pureza, como por ejemplo el uso en ensayos de fluorescencia o ensayos biomédicos.

25 El proceso compuesto por las tres etapas descritas alcanza un porcentaje de recuperación de C-ficocianina mayor del 60% del contenido en la materia prima.

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Proceso de obtención y purificación de C-ficocianina en dos etapas, mediante la ruptura celular por choque osmótico y la posterior utilización de cromatografía de adsorción en lecho expandido, que utiliza como materia prima microalgas del género *Anabaena* y obtiene un porcentaje de recuperación de C-ficocianina mayor del 75% del contenido en la materia prima.
- 10 2. Proceso de obtención y purificación de C-ficocianina según reivindicación 1, **caracterizado** por la obtención de disoluciones concentradas de C-ficocianina con ligeras impurezas de otras proteínas, de pureza suficiente para diversos usos, entre ellos el uso en la industria alimentaria y cosmética.
- 15 3. Proceso de obtención y purificación de C-ficocianina según reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** por el empleo de tampón, preferentemente tampón fosfato a pH entre 5 y 7.5, más preferentemente tampón fosfato 50 mM pH 7, en la primera etapa de ruptura celular mediante choque osmótico.
- 20 4. Proceso de obtención y purificación de C-ficocianina según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por utilizar, tras la etapa de ruptura celular mediante choque osmótico, fases sucesivas de mezcla, homogeneización mecánica y centrifugación.
- 25 5. Proceso de obtención y purificación de C-ficocianina según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por el empleo en la primera etapa de una razón de 1 litro de tampón por cada 0.1-1.0 kilogramos de biomasa liofilizada, preferentemente 1 litro de tampón por cada 0.25 kilogramos de biomasa liofilizada.
- 30 6. Proceso de obtención y purificación de C-ficocianina según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la centrifugación se realiza durante 5-30 minutos a 5000-30000 rpm, preferentemente durante 10 minutos a 15000 rpm.
- 35 7. Proceso de obtención y purificación de C-ficocianina según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque en la segunda etapa se utiliza una columna cromatográfica de adsorción en lecho expandido, preferentemente de 1.5-6.0 cm. de diámetro interno y 50 cm. de altura, constituida por un intercambiador iónico como fase adsorbente. La columna se desarrolla utilizando una fase móvil constituida por tampón, preferentemente tampón fosfato 50 mM pH 7 en las fases de aplicación de la muestra y lavado de la columna y tampón fosfato 500 mM pH 7 en la fase de desorción.
- 40 8. Proceso de obtención y purificación de C-ficocianina según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por la utilización en la segunda etapa de una velocidad de flujo de fase móvil de 200 cm h<sup>-1</sup>, en las fases de aplicación de la muestra y lavado de la columna y de 86 cm. h<sup>-1</sup> en la fase de elución de la muestra.
- 45 9. Proceso de obtención y purificación de C-ficocianina según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que después de la ruptura celular y la cromatografía de adsorción en lecho expandido se emplea una tercera etapa de cromatografía de intercambio iónico en lecho empaquetado clásico, de forma que el proceso compuesto por las tres etapas alcanza un porcentaje de recuperación de C-ficocianina mayor del 60% del contenido en la materia prima.
- 50 10. Proceso de obtención y purificación de C-ficocianina según reivindicación 9, **caracterizado** porque en la tercera etapa se utiliza una columna cromatográfica de intercambio iónico en lecho empaquetado clásico, preferentemente de DEAE-celulosa DE-52.
- 55 11. Proceso de obtención y purificación de C-ficocianina según reivindicaciones 9 ó 10, **caracterizado** por utilizar en la tercera etapa una columna cromatográfica con un diámetro interno de entre 2.5 - 9.0 cm., y 20 cm. de altura.
- 60 12. Proceso de obtención y purificación de C-ficocianina según reivindicación 9, 10 u 11, **caracterizado** porque la columna es desarrollada utilizando una fase móvil constituida por tampón fosfato, preferentemente tampón fosfato 50 mM pH 7, en las fases de equilibrado y aplicación de la muestra.
- 65 13. Proceso de obtención y purificación de C-ficocianina según reivindicación 9, 10, 11 ó 12, **caracterizado** porque la columna es desarrollada utilizando una fase móvil constituida por tampón fosfato, preferentemente tampón fosfato 290 mM pH 7, en la fase de elución.
14. Proceso de obtención y purificación de C-ficocianina según reivindicaciones 9, 10, 11, 12 o 13, **caracterizado** por el empleo en la tercera etapa de una velocidad de flujo de fase móvil de 21 cm h<sup>-1</sup> en las fases de aplicación, elución y lavado de la columna.
15. Proceso de obtención y purificación de C-ficocianina según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la especie utilizada como materia prima es *Anabaena marina*.



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 325 847

② Nº de solicitud: 200702782

③ Fecha de presentación de la solicitud: 16.10.2007

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2197820 B1 (UNIVERSIDAD DE GRANADA) 01.01.2004, Documento Completo	1-15
X	FELIPE,M.A. et al.Obtención de biliproteínas de interes biotecnológico industrial mediante cromatografía de adsorción en lecho expandido. Iniciación a la investigación. Revista electrónica. Universidad de Jaén.Ini.Inv.1 :al 7(2006).Ver resumen	1-8
Y		9-15
A	GANAPATHI,P. et al. Method to obtain C- phycocyanin of high purity. Journal of Chromatography A,2006, vol.1127, pag.76-81. Ver resumen	

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

07.09.2009

Examinador

J. López Nieto

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07K 1/36** (2006.01)

**C07K 1/18** (2006.01)

**C07K 1/22** (2006.01)

**C07K 1/30** (2006.01)

**C07K 14/405** (2006.01)

**C07K 14/795** (2006.01)