

Extraction and purification of B-phycoerythrin from the red microalga *Rhodorus marinus*

Extracción y purificación de B-ficoeritrina de la microalga roja *Rhodorus marinus*

GA Básaca-Loya¹, MA Valdez², EA Enríquez-Guevara¹, LE Gutiérrez-Millán³, MG. Burboa^{3*}

¹ Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, A.P. 1819, Hermosillo, CP 83000, Sonora, México.

² Departamento de Física y Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, Hermosillo, CP 83000, Sonora, México.

³ Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS), Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, Hermosillo, CP 83000, Sonora, México. * E-mail: mburboa@correom.uson.mx

Abstract

A description is given of the purification of B-phycoerythrin (B-PE) from the red microalga *Rhodorus marinus*. Initially, phycobiliproteins were released from the microalgal cells by manual cellular fragmentation and sonication. B-PE was extracted with ammonium sulfate precipitation, and purified by anionic and size exclusion chromatography. Its purity was tested using indexes and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Spectroscopic characterization of B-PE was performed by UV-visible spectroscopy, fluorescence spectroscopy, and circular dichroism. *Rhodorus marinus* showed three types of phycobiliproteins: phycoerythrin, phycocyanin, and allophycocyanin. The purified B-PE showed a purity ratio (A_{545}/A_{280}) of 4.8, characteristic peaks at 540 and 562 nm with a shoulder at 498 nm, fluorescence emission maximum at 578 nm, and a secondary structure almost stable with pH changes. B-PE was found to be the predominant pigment in *R. marinus* and this red microalga could be a viable option for the recovery of this chromoprotein.

Key words: microalgae, phycobiliproteins, phycoerythrin, pigments, *Rhodorus marinus*.

Resumen

En este trabajo se describe la purificación de la proteína B-ficoeritrina (B-PE) de la microalga roja *Rhodorus marinus*. Inicialmente se extrajeron las ficobiliproteínas de las células microalgales mediante fragmentación manual y sonicación. La B-PE fue purificada mediante precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de exclusión por tamaño e intercambio aniónico. Se determinó la pureza de B-PE por medio de índices y electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio. La caracterización espectroscópica de B-PE se realizó mediante espectroscopía UV-visible, espectroscopía de fluorescencia y dicroísmo circular. *Rhodorus marinus* presentó tres tipos de ficobiliproteínas: ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina. La B-PE purificada mostró un índice de pureza (A_{545}/A_{280}) de 4.8, picos característicos a 540 y 562 nm con un hombro a 498 nm, un máximo de emisión de fluorescencia de 578 nm, y una estructura secundaria casi estable ante cambios de pH. La B-PE mostró ser el pigmento predominante en *R. marinus*. Esta microalga roja podría ser una opción viable para la recuperación de esta cromoproteína.

Palabras clave: microalgas, ficobiliproteínas, ficoeritrina, pigmentos, *Rhodorus marinus*.

Introduction

Phycobiliproteins act as photosynthetic accessory pigments in marine algae such as Rhodophyceae, Cyanophyceae, Cryptophyceae, and some Pirrophyceae (Gantt 1975, Ma *et al.* 2003). They are organized into cellular structures, called phycobilisomes, which are attached in regular arrays to the outer surface of the thylakoids. Phycobiliproteins are water-soluble and composed of α , β , and γ subunits of phycoerythrins (Wang *et al.* 1998), each of which consists of an apoprotein and one or more kinds of open-chain tetrapyrrole prosthetic groups (chromophores named bilins) that are covalently linked to specific cysteine residues of the apoproteins (Glazer 1981). The spectroscopic properties of individual biliproteins depend mainly on the chemical nature of the bilins they carry (MacColl and

Introducción

Las ficobiliproteínas actúan como pigmentos accesorios para la fotosíntesis en algas marinas de las Rhodophyceae, Cyanophyceae, Cryptophyceae y algunas Pirrophyceae (Gantt 1975, Ma *et al.* 2003). Se encuentran organizadas en estructuras celulares, llamadas ficobilisomas, las cuales están unidas en conjuntos regulares a la superficie exterior de los tilacoides. Las ficobiliproteínas son solubles en agua y están compuestas de subunidades α , β y γ de las ficoeritrinas (Wang *et al.* 1998), cada una de las cuales consiste de una apoproteína y uno o más tipos de grupos prostéticos tetrapirrólicos de cadena abierta (cromóforos llamados bilinas) unidos mediante enlaces covalentes a los residuos específicos de cisteína de las apoproteínas (Glazer 1981). Las propiedades espectroscópicas de las

Guard-Friar 1983, Glazer 1989, Grossman 1990, Holzwarth 1991, Moerschel 1991). Phycobiliproteins are divided into three classes based on their absorption properties: phycoerythrins ($\lambda_{\text{max}} \sim 540\text{--}570\text{ nm}$), which have the chromophores phycoerythrobilin and phycourobilin; phycocyanins ($\lambda_{\text{max}} \sim 610\text{--}620\text{ nm}$), which contain either a mixture of the phycocyanobilin and phycoerythrobilin chromophores or just phycocyanobilin, depending on the species of origin; and allophycocyanins ($\lambda_{\text{max}} \sim 650\text{--}655\text{ nm}$), with phycocyanobilin as prosthetic group (Glazer 1984, Bermejo *et al.* 2003). The chromophores confer a characteristic color to each phycobiliprotein: red to phycoerythrin, bright blue to phycocyanin, and green-blue to allophycocyanin. The major classes of phycoerythrins have been reported to differ in their absorption characteristics: B-phycoerythrins show $\lambda_{\text{max}} \sim 565, 546\text{ nm}$ and a shoulder at $\sim 499\text{ nm}$; R-phycoerythrins show $\lambda_{\text{max}} \sim 568, 499\text{ nm}$ and a shoulder at $\sim 545\text{ nm}$; and C-phycoerythrins show $\lambda_{\text{max}} \sim 565\text{ nm}$ (Hilditch *et al.* 1991, D'Agnolo *et al.* 1994, Bermejo *et al.* 2001).

Among the phycobiliproteins, B-phycoerythrin (B-PE) is a major light-harvesting pigment of red microalgae, and it is the most valuable of the three main classes of phycoerythrins (B, R, and C) due to its high fluorescence efficiency and its intense and unique pink color. It is thus widely used as a fluorescent probe and analytical reagent, as well as being employed as a natural dye in foodstuffs and cosmetics (Bermejo *et al.* 2003) and in the development of biosensors (Martek Corporation, <http://www.marketbio.com>) (Ayyagari *et al.* 1995, Haugland 1996, Bermejo *et al.* 2002, Benavides and Rito-Palomares 2004). Phycobiliproteins have also been shown to have therapeutic value due to their immunomodulating and anticarcinogenic activities (Iijima and Shimamatsu 1982).

To date, very different methodologies have been proposed for purifying phycobiliproteins from microalgae. Pure phycobiliproteins from crude algal extracts are usually obtained by a combination of different chromatographic methods and ammonium sulfate precipitation (Gray and Gantt 1975, Grabowski and Gantt 1978, Duerring *et al.* 1991, Ficner *et al.* 1992, Bermejo *et al.* 1997, Tchernov *et al.* 1999). Most of the proposed methods can be divided into two steps: first, the extraction of phycobiliproteins from the biomass and second, the purification of the extract obtained. The original study conducted by Glazer and Hixson (1975) on B-PE purification consisted of a three chromatographic step scheme, which has since been simplified to two chromatographic steps (Yu *et al.* 1981, Schoeletter *et al.* 1983, Bermejo *et al.* 2003, Rossano *et al.* 2003). In the present study, we used different methods for the extraction of proteins, and anionic and size-exclusion chromatography for their purification.

Porphyridium cruentum is a well-studied red microalga and used for the recovery of B-PE (Schoeletter *et al.* 1983; Hilditch *et al.* 1991; D'Agnolo *et al.* 1994; Bermejo *et al.* 2001, 2002, 2003; Ma *et al.* 2003; Rossano *et al.* 2003; Benavides and Rito-Palomares 2004). In this study we describe the B-PE from *Rhodospirillum rubrum*, an alga that shows

biliproteínas individuales dependen principalmente de la naturaleza química de sus bilinas (MacColl y Guard-Friar 1983, Glazer 1989, Grossman 1990, Holzwarth 1991, Moerschel 1991). Las ficobiliproteínas se dividen en tres clases según sus propiedades de absorción: ficoeritrinas ($\lambda_{\text{max}} \sim 540\text{--}570\text{ nm}$), las cuales contienen los cromóforos ficoeritrobilina y ficourobilina; ficocianinas ($\lambda_{\text{max}} \sim 610\text{--}620\text{ nm}$), que contienen ya sea una mezcla de los cromóforos ficocianobilina y ficoeritrobilina o sólo ficocianobilina, según la especie de origen; y aloficocianinas ($\lambda_{\text{max}} \sim 650\text{--}655\text{ nm}$), con ficocianobilina como grupo prostético (Glazer 1984, Bermejo *et al.* 2003). Los cromóforos dan un color característico a cada ficobiliproteína: rojo a la ficoeritrina, azul brillante a la ficocianina, y verde azulado a la aloficocianina. Se ha encontrado que las principales clases de ficoeritrinas difieren en sus características de absorción: las B-ficoeritrinas muestran $\lambda_{\text{max}} \sim 565\text{ y }546\text{ nm}$, con un hombro a $\sim 499\text{ nm}$; las R-ficoeritrinas $\lambda_{\text{max}} \sim 568\text{ y }499\text{ nm}$, con un hombro a $\sim 545\text{ nm}$; y las C-ficoeritrinas $\lambda_{\text{max}} \sim 565\text{ nm}$ (Hilditch *et al.* 1991, D'Agnolo *et al.* 1994, Bermejo *et al.* 2001).

Entre las ficobiliproteínas, la B-ficoeritrina (B-PE) es un importante pigmento para la captación de luz por las microalgas rojas, y es la más valiosa de las tres clases de ficoeritrinas (B, R y C) debido a su gran eficiencia de fluorescencia y su intenso y particular color rosa. Por lo tanto, es ampliamente utilizada como una sonda fluorescente y reactivo analítico, además de emplearse como un tinte natural en alimentos y cosméticos (Bermejo *et al.* 2003), así como para desarrollar biosensores (Martek Corporation, <http://www.marketbio.com>) (Ayyagari *et al.* 1995, Haugland 1996, Bermejo *et al.* 2002, Benavides y Rito-Palomares 2004). También se ha mostrado que las ficobiliproteínas poseen un valor terapéutico debido a sus actividad inmunomoduladora y anticarcinogénica (Iijima y Shimamatsu 1982).

A la fecha, se han propuesto métodos muy diferentes para la purificación de las ficobiliproteínas de microalgas. Generalmente se obtienen ficobiliproteínas puras de extractos crudos de algas mediante una combinación de diversos métodos cromatográficos y la precipitación con sulfato de amonio (Gray y Gantt 1975, Grabowski y Gantt 1978, Duerring *et al.* 1991, Ficner *et al.* 1992, Bermejo *et al.* 1997, Tchernov *et al.* 1999). La mayoría de los métodos propuestos consta de dos pasos: primero se extraen las ficobiliproteínas de la biomasa y después se purifica el extracto obtenido. El estudio original realizado por Glazer y Hixson (1975) sobre la purificación de la B-PE consistió en un esquema de tres pasos cromatográficos, el cual ya ha sido simplificado a dos pasos (Yu *et al.* 1981, Schoeletter *et al.* 1983, Bermejo *et al.* 2003, Rossano *et al.* 2003). En el presente trabajo se utilizaron diferentes métodos para la extracción de proteínas, y posteriormente cromatografía de exclusión por tamaño e intercambio aniónico para su purificación.

Porphyridium cruentum es una microalga roja que ha sido bien estudiada y utilizada para la obtención de B-PE (Schoeletter *et al.* 1983; Hilditch *et al.* 1991; D'Agnolo *et al.*

potential for the biotechnological production of this protein. It is a cosmopolitan species and represents a very interesting case since the industrial and commercial value of this product is considerable. Notwithstanding, until now, there are no scientific reports known on B-PE from *R. marinus*.

Material and methods

Algal strain and cultivation conditions

The study was carried out using the red microalga *R. marinus* provided by UTEX (1723). Microalgae were grown in batch cultures (10-mL culture tubes, 250-mL Erlenmeyer flask, and 18-L carboys) for 25 days, under the following conditions: Erdschreiber culture medium (Rosowski and Parker 1971), continuous bubbling of air until the 12-L level, 25°C, lateral illumination with cool-white fluorescent lamps at a photon flux density of 215 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ measured at the surface of 250-mL flasks, and a circadian 12-h light and 12-h dark cycle. Microalgae were decanted and harvested by centrifugation at 3000 rpm for 5 min (Marathon 8K Fisher Scientific). See Básaca-Loya *et al.* (2008).

Preparation and fractionation of the crude extract

Algal cells (4 g dry biomass) were rinsed with 0.01 M Na-phosphate buffer containing 0.1 M NaCl (pH 7.0) (Rossano *et al.* 2003) and resuspended in the 0.01 M Na-phosphate/NaCl buffer (pH 7.0). The suspension was then frozen at -20°C , thawed, sonicated for 30 min, and cellular fragmentation was performed manually in a ceramic pot. Cell debris removal was achieved by centrifugation at 5000 rpm, at 4°C , for 10 min. The supernatant was referred to as crude extract and the precipitate was discarded. The crude extract obtained was saturated with 40% ammonium sulfate, agitated for 3.5 h and left at 4°C until precipitation, and then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The precipitate was discarded. The supernatant was saturated with 60% ammonium sulfate (Bermejo *et al.* 2002), agitated for 15 h and left at 4°C until precipitation, and then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The precipitate was resuspended in the 0.01 M Na-phosphate/NaCl buffer (pH 7.0).

Chromatography

The remaining ammonium sulfate was removed by chromatography on a Sephadex G-25 (Sigma) column pre-equilibrated with 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.1 M NaCl. The eluate was then monitored at 280 nm and collected in 4-mL fractions. The fractions with protein were pooled and applied to an anionic chromatographic column HiPrep 16/10 Q XL ($0.75 \times 10 \text{ cm}$) (Amersham BioSciences), which was pre-equilibrated with 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.1 M NaCl.

After washing with 40 mL of 0.01 M Na-phosphate/NaCl buffer (pH 7.0), the column was eluted with 0.01 mM

1994; Bermejo *et al.* 2001, 2002, 2003; Ma *et al.* 2003; Rossano *et al.* 2003; Benavides y Rito-Palomares 2004). En este estudio se describe la B-PE de *Rhodospirillum rubrum*, un alga que muestra potencial para la producción biotecnológica de esta proteína. Es una especie cosmopolita, y de gran interés ya que el valor industrial y comercial de este producto es considerable; no obstante, hasta ahora, no se cuenta con ningún informe científico sobre la B-PE de *R. marinus*.

Materiales y métodos

Cepa algal y condiciones de cultivo

En este trabajo se utilizó la microalga roja *R. marinus* proporcionada por UTEX (1723). Las microalgas fueron cultivadas por lotes (tubos de ensayo de 10 mL, frascos Erlenmeyer de 250 mL y garrafones de 18 L) durante 25 días, bajo las siguientes condiciones: medio de cultivo Erdschreiber (Rosowski y Parker 1971), burbujeo continuo de aire hasta el nivel de 12 L, 25°C , iluminación lateral con lámparas fluorescentes (blanco frío) a una densidad del flujo de fotones de 215 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ medida en la superficie de los frascos de 250 mL, y un ciclo circadiano de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Las microalgas fueron decantadas y cosechadas mediante centrifugación a 3000 rpm por 5 min (Marathon 8K Fisher Scientific). Ver el trabajo de Básaca-Loya *et al.* (2008).

Preparación y fraccionación del extracto crudo

Las células algales (4 g de biomasa seca) se enjuagaron con amortiguador de fosfato de sodio 0.01 M que contenía NaCl 0.1 M (pH 7.0) (Rossano *et al.* 2003) y se resuspendieron en el amortiguador de fosfato de sodio/NaCl 0.01 M (pH 7.0). La suspensión fue congelada a -20°C , descongelada y sonicada durante 30 min, realizándose la fragmentación celular de forma manual en una olla de cerámica. La eliminación de restos celulares se logró mediante centrifugación a 5000 rpm a 4°C por 10 min. El sobrenadante se consideró el extracto crudo y el precipitado se descartó. El extracto crudo obtenido se saturó con sulfato de amonio al 40%, se agitó durante 3.5 h y se dejó reposar a 4°C hasta su precipitación; posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. Se descartó el precipitado. El sobrenadante se saturó con sulfato de amonio al 60% (Bermejo *et al.* 2002), se agitó durante 15 h, se dejó reposar a 4°C hasta su precipitación, y luego se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. El precipitado se resuspendió en amortiguador de fosfato de sodio/NaCl 0.01 M (pH 7.0).

Cromatografía

El sulfato de amonio restante se eliminó mediante cromatografía en una columna Sephadex G-25 (Sigma) pre-equilibrada con amortiguador de fosfato 0.01 M (pH 7.0) que contenía NaCl 0.1 M. La elución fue monitoreada a 280 nm y recolectada en fracciones de 4 mL. Las fracciones proteicas se

phosphate buffer containing 0.1 M and 0.5 M NaCl. The eluate was collected in 4-mL fractions and analyzed. The fractions were pooled and separated in a HPLC system (Agilent 1100) with a Zorbax GF-250 (Agilent) column (0.94×25 cm, $4 \mu\text{m}$), pre-equilibrated with 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.1 M NaCl. The column was eluted with the 0.01 M Na-phosphate/NaCl buffer (pH 7.0) and the eluate was collected in 1-mL fractions.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Electrophoresis was carried out in a vertical slab gel apparatus (Miniprotean III, Bio-Rad), using a Laemmli buffer system (Laemmli 1970) consisting of a 16.5% (w/v) polyacrylamide slab gel, 1.0 mm thick, containing 0.1% (w/v) SDS with a stacking gel of 4% polyacrylamide. Samples were pre-incubated with 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 4.5% (v/v) β -mercaptoethanol, 0.025% (w/v) bromophenol blue, and 60 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8) for 5 min at 95°C . Gels were run at room temperature and visualized by staining with 0.1% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250, 40% (v/v) methanol, and 7% (v/v) acetic acid for 30 min, and destained in dilute acetic acid. The following proteins were used as molecular mass markers: phosphorilase *b* (94 000), albumin (67 000), ovalbumin (43 000), carbonic anhydrase (30 000), trypsin inhibitor (20 100), and α -lactalbumin (14 400).

Spectroscopic measurements

Absorption spectra were recorded on a Beckman Coulter UV/VIS DU 530 spectrophotometer with a 1-cm light path. The scan wavelength was 200–900 nm. Protein concentrations for these experiments ranged from 0.1 to 0.5 g L^{-1} . Fluorescence emission spectra were recorded at room temperature by a Perkin Elmer LS-50B luminescence spectrophotometer with an excitation wavelength of 545 nm. Protein concentrations were chosen so that reabsorption of the emission was negligible.

Circular dichroism spectra were recorded on a Jasco (Tokyo, Japan) J-810 spectropolarimeter, using 1-mm path length quartz cells for measurements in the far UV region (180–260 nm). The protein concentration of the fractions obtained by anionic chromatography was 0.2 mg mL^{-1} . A 10 mM Na-phosphate buffer (pH 2 and pH 7) was used and the pH was adjusted with diluted hydrochloric acid. The secondary structure was analyzed with the DICHROWEB software (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/home.html>) and the molecular information of B-PE was obtained from Bermejo *et al.* (2001). All spectra were recorded at room temperature.

Analytical procedures

Protein concentration in the samples was estimated by the Bradford method (Bradford 1976). The purity of B-PE was determined as the relation between absorbances at 545 and 280

juntaron y se introdujeron en una columna de intercambio aniónico HiPrep 16/10 Q XL (0.75×10 cm) (Amersham BioSciences), equilibrada previamente con amortiguador de fosfato 0.01 M (pH 7.0) con NaCl 0.1 M.

Después de enjuagar con 40 mL de amortiguador de fosfato de sodio/NaCl 0.01 M (pH 7.0), la columna se enjuagó con amortiguador de fosfato 0.01 mM que contenía NaCl 0.5 M y 0.1 M. Esta elución fue recolectada en fracciones de 4 mL y analizada. Las fracciones se juntaron y luego se separaron en un sistema (Agilent 1100) de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) con una columna Zorbax GF-250 (Agilent, 0.94×25 cm, $4 \mu\text{m}$), equilibrada previamente con amortiguador de fosfato 0.01 M (pH 7.0) con NaCl 0.1 M. La columna se enjuagó con amortiguador de fosfato de sodio/NaCl 0.01 M (pH 7.0) y la elución se recolectó en fracciones de 1 mL.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE por sus siglas en inglés)

La electroforesis vertical se realizó en un aparato Miniprotean III (Bio-Rad), usando un sistema de amortiguador discontinuo (Laemmli 1970), el cual consiste en un gel de poliacrilamida al 16.5% (p/v) de 1.0 mm de grosor que contiene SDS al 0.1% (p/v), con un gel concentrador de poliacrilamida al 4%. Las muestras fueron previamente incubadas con SDS al 2% (p/v), glicerol al 10% (v/v), β -mercaptoetanol al 4.5% (v/v), azul de bromofenol al 0.025% (p/v) y amortiguador Tris-HCl 60 mM (pH 6.8) durante 5 min a 95°C . Los geles se incubaron a temperatura ambiente y se visualizaron mediante tinción con azul brillante de Coomassie R-250 al 0.1% (p/v), metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 7% (v/v) por 30 min; se destañaron en ácido acético diluido. Se emplearon las siguientes proteínas como marcadores de peso molecular: fosforilasa *b* (94 000), albúmina (67 000), ovalbúmina (43 000), anhidrasa carbónica (30 000), inhibidor de tripsina (20 100) y α -lactalbúmina (14 400).

Mediciones espectroscópicas

Se registraron espectros de absorción en un espectrofotómetro UV-VIS DU 530 (Beckman Coulter) con una trayectoria óptica de 1 cm. La longitud de onda fue de 200 a 900 nm. Las concentraciones de proteínas en estos ensayos variaron entre 0.1 y 0.5 g L^{-1} . Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron a temperatura ambiente usando un espectrofotómetro de luminiscencia (Perkin Elmer LS-50B) con una longitud de onda de excitación de 545 nm. Las concentraciones proteicas se escogieron para que la reabsorción de la emisión fuese insignificante.

Los espectros de dicroísmo circular se registraron con un espectropolarímetro Jasco (modelo J-810, Tokio, Japón), usando células de cuarzo con una trayectoria óptica de 1 mm para las mediciones en la región del UV lejano (180–260 nm). La concentración de proteína en las fracciones obtenidas

nm (i.e., purity of B-PE = A_{545}/A_{280}) (Bermejo *et al.* 2001), since the absorption spectrum of this protein exhibits a peak at 545 nm.

Results

We obtained 145 mL of crude extract from the microalga culture. The analysis indicated that the protein content was $1.6372 \text{ mg mL}^{-1}$. The absorption spectrum of the crude extract is shown in figure 1. In this spectrum, three peaks corresponded to the B-PE maxima (562 and 540 nm, with a shoulder at 498 nm), one peak corresponded to the R-phycoerythrin maximum (620 nm), and another peak was observed for allo-phycoerythrin (650 nm). This shows that R-phycoerythrin and allo-phycoerythrin contents are only minor components of the total phycobilins of these cells; the bulk consists of B-PE.

The precipitate obtained after 60% ammonium sulfate saturation was resuspended in 30 mL of 0.01 M Na-phosphate buffer. The protein concentration was 2.445 mg mL^{-1} . This solution was desalted using Sephadex G-25 (Sigma) and the fractions obtained were applied to a Q Sepharose column. In some experiments we used different buffers for elution in anionic chromatography: a discontinuous gradient with 0.01 M Na-phosphate/0.1 M NaCl (pH 7) and 0.05 M Na-phosphate/0.1 M NaCl was not found to yield satisfactory results. Better results were found using a discontinuous gradient with different concentrations of NaCl in 0.01 M Na-phosphate (pH 7.0): 0.1 M, 0.25 and 0.5 M NaCl and the majority of B-PE and R-phycoerythrin in the phycobiliproteins were eluted with 0.01 M Na-phosphate/0.1 M NaCl (fig. 2). Therefore, the results showed that an ionic strength was enough for separation of the phycoerythrin. The absorbance at 280 nm (most proteins

mediante cromatografía de intercambio aniónico fue de 0.2 mg mL^{-1} . Se usó un amortiguador de fosfato de sodio 10 mM (pH 2 y pH 7) y el pH se ajustó con ácido clorhídrico diluido. La estructura secundaria se analizó utilizando la paquetería DICHROWEB (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/home.html>) y la información molecular en relación a la B-PE se obtuvo de Bermejo *et al.* (2001). Todos los espectros se registraron a temperatura ambiente.

Procedimientos analíticos

La concentración de proteína en las muestras se estimó por el método de Bradford (1976). La pureza de B-PE fue determinada como la relación entre las absorbancias a 545 y 280 nm (i.e., pureza de B-PE = A_{545}/A_{280}) (Bermejo *et al.* 2001), ya que el espectro de absorción de esta proteína presenta un pico a 545 nm.

Resultados

Se obtuvieron 145 mL de extracto crudo de los cultivos microalgales. El análisis mostró que el contenido de proteína fue $1.6372 \text{ mg mL}^{-1}$. En la figura 1 se muestra el espectro de absorción del extracto crudo. En tal espectro, tres picos correspondieron a los máximos de B-PE (562 y 540 nm, con un hombro a 498 nm), un pico correspondió al máximo de R-ficocianina (620 nm) y otro correspondió a la aloficocianina (650 nm). Esto indica que los contenidos de R-ficocianina y aloficocianina son componentes menores del total de ficobilinas en estas células, siendo B-PE el pigmento predominante.

El precipitado obtenido después de la saturación con sulfato de amonio al 60% fue resuspendido en 30 mL de amortiguador de fosfato de sodio 0.01 M. La concentración de proteínas entonces fue 2.445 mg mL^{-1} . Esta solución se desalinizó en una columna Sephadex G-25 (Sigma) y las fracciones obtenidas se introdujeron en una columna Sepharose Q. En algunos ensayos se utilizaron diferentes amortiguadores para la elución en la cromatografía aniónica: un gradiente discontinuo con fosfato de sodio 0.01 M/NaCl 0.1 M (pH 7) y fosfato de sodio 0.05 M/NaCl 0.1 M no produjo resultados satisfactorios. Se obtuvieron mejores resultados usando un gradiente discontinuo con diferentes concentraciones de NaCl en fosfato de sodio 0.01 M (pH 7.0): la elución de NaCl 0.1, 0.25 y 0.5 M y la mayor parte de B-PE y R-ficocianina en las ficobiliproteínas se obtuvo con fosfato de sodio 0.01 M/NaCl 0.1 M (fig. 2). Por lo tanto, los resultados mostraron que la fuerza iónica fue suficiente para la separación de la ficoeritrina. La absorbancia a 280 nm (la mayoría de las proteínas absorben a 280 nm) disminuyó notablemente en relación con el extracto crudo, lo que indica una purificación considerable de la ficobilina en comparación con otras proteínas celulares, mientras que los máximos de B-PE (540 y 562 nm) fueron los componentes principales. También se observó que la elución con fosfato 0.01 M/NaCl 0.5 M en la cromatografía de intercambio aniónico produjo B-PE; sin embargo, se obtuvieron bajas concentraciones de proteínas con menor pureza.

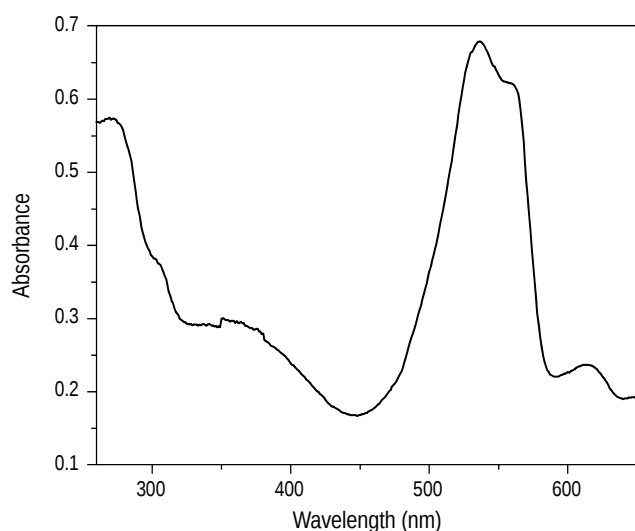


Figure 1. Absorption spectrum of crude extract obtained from *Rhodospirillum rubrum* biomass.

Figura 1. Espectro de absorción del extracto crudo obtenido de la biomasa de *Rhodospirillum rubrum*.

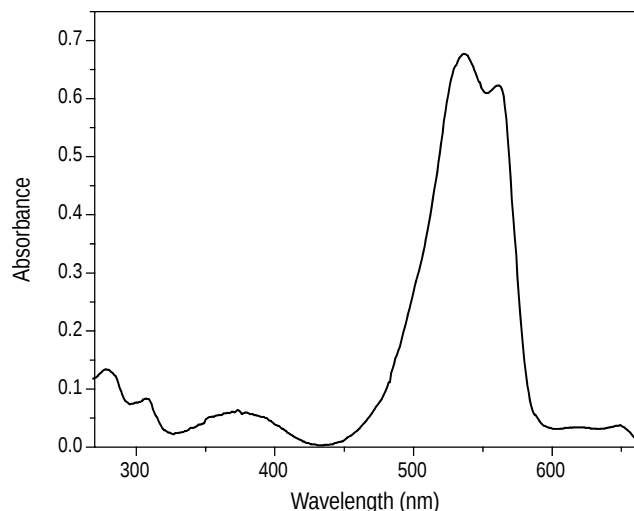


Figure 2. Absorption spectrum obtained from the anionic chromatography (Q Sheparose), using 0.01 M Na-phosphate/0.1 M NaCl buffer (pH 7.0).

Figura 2. Espectro de absorción obtenido mediante cromatografía de intercambio aniónico (Q Sheparose), utilizando fosfato de sodio 0.01 M/NaCl 0.1 M (pH 7.0) como amortiguador.

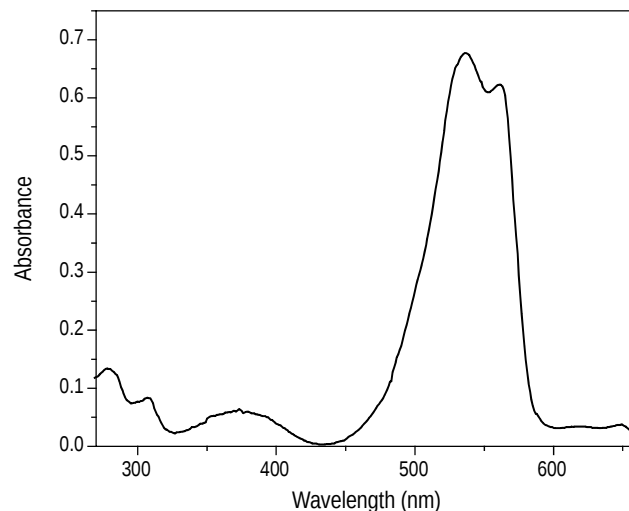


Figure 3. Absorption spectrum of B-phycoerythrin purified by size-exclusion chromatography in HPLC.

Figura 3. Espectro de absorción de la B-ficoeritrina purificada mediante cromatografía de exclusión por tamaño (cromatografía líquida de alta resolución).

absorb at 280 nm) greatly decreased relative to the crude extract, indicating considerable purification of the phycobilin compared with other extraneous proteins, whereas B-PE peaks (540, 562 nm) were the main components. We also observed that elution with 0.01 M phosphate/0.5 M NaCl on anionic chromatography produced B-PE, but low concentrations of protein with lower purity were obtained.

The fraction pool obtained using the elution with 0.01 M phosphate/0.1 M NaCl on anionic chromatography was applied to a column for size-exclusion chromatography. The results obtained by HPLC showed a protein with a purity of 4.8 (A_{545}/A_{280}), suitable for the purification steps (fig. 3). The ratio of absorption value at 545 nm to that at 498 nm (A_{545}/A_{498}) was 2.5; this value was acceptable for the identification of the phycoerythrin pigment. About 1.292 mg of B-PE was obtained from 4 g of lyophilized *R. marinus*, with the above-mentioned purity.

The most widely used criterion to check biliprotein solution purity is the absorbance ratio $A_{\text{max visible}}/A_{280}$; nevertheless, the purity must be confirmed using other experimental methods. Spectroscopic analyses of the fractions from size-exclusion chromatography were carried out. We also measured fluorescence emission spectra of purified B-PE that showed a maximum at 578 nm (fig. 4).

The B-PE subunits by SDS-PAGE showed two bands (fig. 5) containing closely similar amounts of protein. By comparison with standards, the molecular masses were 27 000 and 26 800, corresponding to the α and β subunits of B-PE.

Circular dichroism analysis was performed to fractionate with B-PE to obtain structural information at pH 7 and pH 2. It is well known (Berova *et al.* 1981) that α helix structures show an intense positive band at about 192 nm and two negative

Las fracciones conjuntas obtenidas mediante elución con fosfato 0.01 M/NaCl 0.1 M por cromatografía aniónica se introdujo en una columna para cromatografía de exclusión por tamaño. Los resultados obtenidos por HPLC mostraron una proteína con una pureza de 4.8 (A_{545}/A_{280}), adecuada para los pasos de purificación (fig. 3). La razón de la absorción a 545 nm entre la absorción a 498 nm (A_{545}/A_{498}) fue 2.5; este valor es aceptable para la identificación del pigmento de ficoeritrina. Se obtuvieron alrededor de 1.292 mg de B-PE de 4 g de *R. marinus* liofilizada, con la pureza ya mencionada.

El criterio utilizado con mayor frecuencia para determinar la pureza de la solución de biliproteínas es la razón de absorción $A_{\text{max visible}}/A_{280}$; no obstante, se debería de confirmar la pureza con otros métodos experimentales. Se realizaron análisis espectroscópicos de las fracciones de la cromatografía de exclusión por tamaño. También se midieron espectros de emisión de fluorescencia de la B-PE purificada que mostraron un máximo a 578 nm (fig. 4).

Mediante la SDS-PAGE las subunidades de B-PE mostraron dos bandas (fig. 5) que contenían cantidades similares de proteína. Al comparar con estándares, las masas moleculares fueron 27 000 y 26 800, correspondiendo a las subunidades α y β de B-PE.

Se realizó un análisis de dicroísmo circular para fraccionar con B-PE y obtener información estructural a pH 7 y pH 2. Es bien conocido (Berova *et al.* 1981) que las estructuras de hélice α muestran una banda positiva intensa alrededor de 192 nm y dos bandas negativas alrededor de 208 y 222 nm. En la figura 6 se observa el comportamiento de la proteína a pH 7 y pH 2 en el intervalo de 180 a 260 nm. La curva muestra una banda positiva intensa alrededor de 195 nm, la cual disminuyó cuando la proteína se encontraba en condiciones ácidas. Las bandas

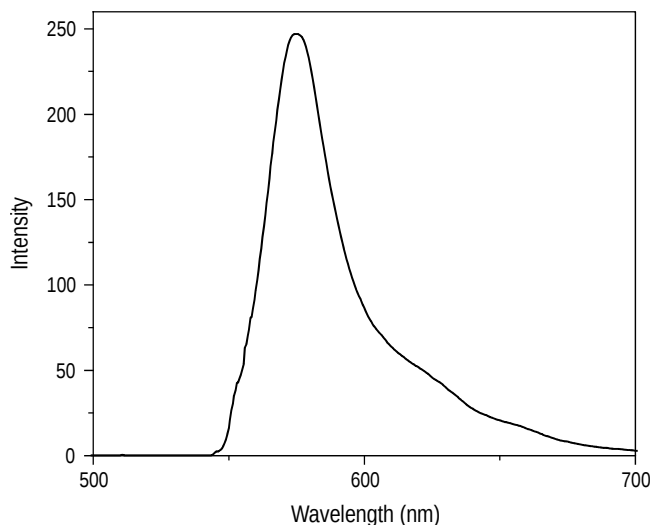


Figure 4. Visible fluorescence emission spectra of purified B-phycoerythrin.
Figura 4. Espectros visibles de emisión de fluorescencia de la B-ficoeritrina purificada.

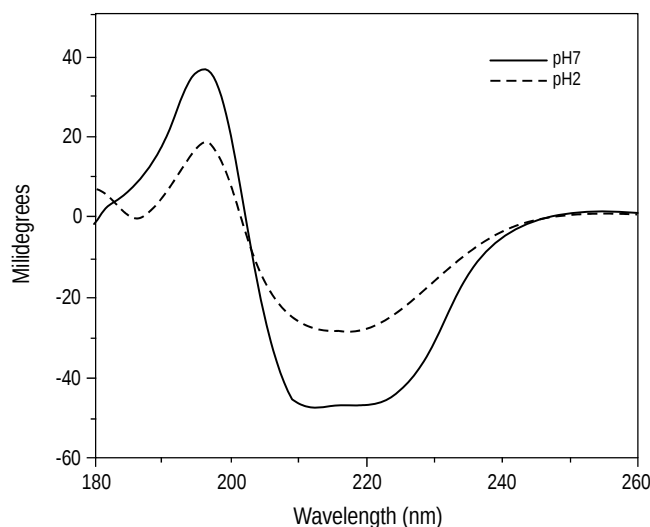


Figure 6. Far UV circular dichroism spectra of B-phycoerythrin in 0.01 M Na-phosphate buffer at pH 7 and pH 2. Protein concentration was 0.2 mg mL⁻¹.

Figura 6. Espectros de dicroísmo circular en el lejano UV de B-ficoeritrina en amortiguador de fosfato de sodio 0.01 M a pH 7 y pH 2. La concentración de proteína fue 0.2 mg mL⁻¹.

bands at about 208 and 222 nm. Figure 6 shows the behavior of the protein at pH 7 and pH 2 in the range of 180–260 nm. As can be observed the curve shows an intense positive band at about 195 nm, which decreased when the protein was under acidic conditions. The negative bands at 210 and 222 nm are present in the fraction at pH 7, but the intensity of the bands decreased at pH 2. The results of the DICHROWEB analysis are shown in table 1, where the CDSSTR program was used to obtain the curve that best fits to the data.

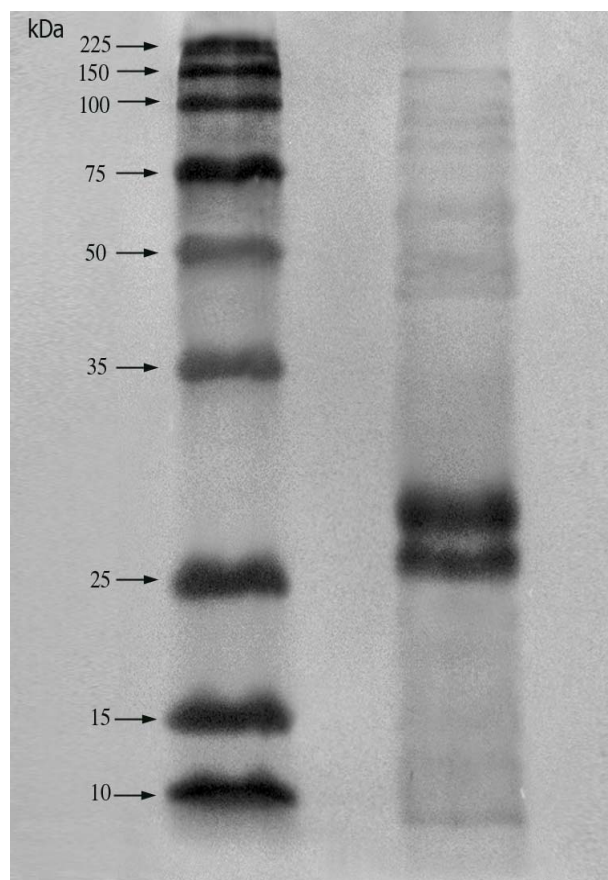


Figure 5. SDS-PAGE of purified B-phycoerythrin. From left to right the bands correspond to marker proteins and purified B-phycoerythrin after HPLC.

Figura 5. SDS-PAGE de la B-ficoeritrina purificada. De izquierda a derecha las bandas corresponden a proteínas marcadoras y B-ficoeritrina purificada después de la cromatografía líquida de alta resolución.

negativas a 210 y 222 nm se observan en la fracción a pH 7, pero la intensidad disminuyó a pH 2. En la tabla 1 se muestran los resultados del análisis con DICHROWEB, en donde se usó el programa CDSSTR para determinar la curva que mejor se ajusta a los datos.

Discusión

Rhodospirillum rubrum presentó tres tipos de ficobiliproteínas: ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina. Para la microalga roja *Porphyridium cruentum*, Bermejo *et al.* (2002) encontraron que el contenido de aloficocianina era insignificante o inexistente en comparación con la R-ficocianina y la B-PE.

En el presente trabajo se obtuvo la elución de la mayor parte de B-PE con fosfato de sodio 0.01 M/NaCl 0.1 M. Rossano *et al.* (2003) utilizaron la misma fuerza iónica para la elución de R-ficoeritrina con un amortiguador que contenía fosfato de sodio 0.05 M/NaCl 0.1 M (pH 7.0) en una columna de hidroxiapatita y fosfato de sodio 0.01 M/NaCl 0.1 M

Table 1. Secondary structure of B-phycoerythrin (B-PE). The software used was DICHROWEB.**Tabla 1.** Estructura secundaria de la proteína B-ficoeritrina (B-PE). Se utilizó la paquetería DICHROWEB.

B-PE	Helix 1	Helix 2	Strand 1	Strand 2	Turns	Unordered	Total
pH 7	0.42	0.08	0.15	0.11	0.06	0.19	1.01
pH 2	0.045	0.10	0.11	0.12	0.06	0.17	1.01

Discussion

Rhodorus marinus showed three types of phycobiliproteins: phycoerythrin, phycocyanin, and allophycocyanin. Bermejo *et al.* (2002) showed that allophycocyanin content is negligible or absent relative to R-phycoerythrin and B-PE in the red microalga *Porphyridium cruentum*.

In our purification, the majority of B-PE was eluted with 0.01 M Na-phosphate/0.1 M NaCl buffer. The same ionic strength was used by Rossano *et al.* (2003), who eluted R-phycoerythrin with a buffer containing 0.05 M Na-phosphate/0.1 M NaCl (pH 7.0) on a hydroxyapatite column and 0.01 M Na-phosphate/0.1 M NaCl (pH 7.0) on a Superdex 75 gel filtration column. In our experiments we found that it was necessary to use size-exclusion chromatography following anionic chromatography to obtain highly purified B-PE.

The purified B-PE of *R. marinus* showed two peaks at 540 and 562 nm, and a small shoulder at 498 nm. It is known that there are two types of phycoerythrin in *P. cruentum*: one is B-PE, which has an absorption shoulder at 498 nm, and the other is b-phycoerythrin, which does not. We believe our preparations could have a mixture of both pigments because the shoulder is slight. In addition, there is only one emission peak at 578 nm but this is the same in both pigments. The fluorescence emission spectrum of the purified B-PE maximum is 578 nm. This result is consistent with that published for the fluorescence spectrum of phycoerythrins (Bermejo *et al.* 2002).

We produced a B-PE with a purity index of 4.8 (A_{545}/A_{280}), which exceeds the standard purification of phycobiliproteins from other sources (Siegelman and Kycia 1978). The A_{545}/A_{498} ratio was 2.5, an acceptable value for identifying the phycoerythrin pigment as from typical B-PE (Gantt and Lipschultz 1974).

About 1.292 mg of B-PE were obtained from 4 g of lyophilized *R. marinus*. Rossano *et al.* (2003) obtained 15 mg of pure phycoerythrin from 25 g of lyophilized *Corallina elongata*, with a similar A_{545}/A_{280} ratio of 5.

The SDS-PAGE results revealed two close intense bands at 26.8 and 27.7 kDa, whereas we expected 17 and 18 kDa, respectively, for the α and β subunits found in the major cyanobacterial and red algal phycobiliproteins (phycoerythrin, phycocyanin, and allophycocyanin; Swanson and Glazer 1990). Both R- and B-PE have a $(\alpha\beta)6\gamma$ composition (Redlinger and Gantt 1981). Moreover, in the SDS-PAGE of *P. cruentum*, the B-PE shows the presence of at least three γ subunits, differing slightly in molecular weight. We think what this

(pH 7.0) en una columna de filtración sobre gel Superdex 75. En nuestros ensayos fue necesario usar cromatografía de exclusión por tamaño después de la cromatografía de intercambio aniónico para obtener B-PE altamente purificada.

La B-PE purificada de *R. marinus* mostró dos máximos, a 540 y 562 nm, con un hombro pequeño a 498 nm. Se sabe que existen dos tipos de ficoeritrina en *P. cruentum*: una es B-PE, que tiene un hombro de absorción a 498 nm, y la otra es b-ficoeritrina, que no lo tiene. Creemos que nuestras preparaciones podrían tener una mezcla de ambos pigmentos ya que el hombro es pequeño. Además, sólo hay un pico de emisión a 578 nm pero es igual en ambos pigmentos. El espectro de emisión de fluorescencia del máximo de la B-PE purificada es 578 nm. Este resultado concuerda con lo publicado para el espectro de fluorescencia de las ficoeritrinas (Bermejo *et al.* 2002).

En este estudio se obtuvo B-PE con un índice de pureza de 4.8 (A_{545}/A_{280}), que excede la purificación estándar de ficobiliproteínas de otras fuentes (Siegelman y Kycia 1978). La razón A_{545}/A_{498} fue 2.5, un valor aceptable para identificar el pigmento de ficoeritrina como proveniente de B-PE típica (Gantt y Lipschultz 1974).

Se obtuvieron alrededor de 1.292 mg de B-PE a partir de 4 g de *R. marinus* liofilizada. Rossano *et al.* (2003) obtuvieron 15 mg de ficoeritrina pura de 25 g de *Corallina elongata* liofilizada, con una razón A_{545}/A_{280} similar, de 5.

Los resultados de SDS-PAGE mostraron dos bandas cercanas intensas a 26.8 y 27.7 kDa, cuando se esperaban 17 y 18 kDa, respectivamente, para las subunidades α y β encontradas en las principales ficobiliproteínas de cianobacterias y algas rojas (ficoeritrina, ficocianina y alofococianina; Swanson y Glazer 1990). Tanto la R-ficoeritrina como la B-PE tienen una composición $(\alpha\beta)6\gamma$ (Redlinger y Gantt 1981). Además, en la SDS-PAGE de *P. cruentum*, la B-PE muestra la presencia de al menos tres subunidades γ que difieren ligeramente en peso molecular. Pensamos que esto le pudiese estar pasando a *R. marinus* ya que los resultados de SDS-PAGE muestran bandas difusas en la región de γ .

El análisis de dicroísmo circular mostró una intensa banda positiva alrededor de los 195 nm que decreció cuando la proteína se encontraba en condiciones ácidas. Esto podría indicar que también hay sábanas β presentes en la estructura. Las bandas negativas a 210 y 222 nm se encuentran en la fracción a pH 7, pero la intensidad de las bandas decreció a pH 2 debido a la pérdida de la estructura secundaria. Bermejo *et al.* (2001) observaron este fenómeno en la B-PE de *P. cruentum*, pero no estimaron su contenido de sábanas α y β .

could be happening to *R. marinus* because the SDS-PAGE results show diffuse bands in the region of γ .

Circular dichroism analysis showed an intense positive band at about 195 nm that decreased when the protein was under acidic conditions. This could mean that β sheets are also present in the structure. The negative bands at 210 and 222 nm are present in the fraction at pH 7 but the intensity of the bands decreased at pH 2 due to a loss of secondary structure. This phenomenon was also observed by Bermejo *et al.* (2001) with B-PE obtained from *P. cruentum*; however, they did not estimate the α and β sheet content.

Secondary structure in B-PE from *R. marinus* does not appear to be greatly different at pH 2 compared with pH 7 (see table 1).

Acknowledgements

This research was supported by CONACYT (Mexico) (grant SEP-2004-C01-46749 and grant 83191). The first author acknowledges receipt of a scholarship from CONACYT.

References

- Ayyagari M, Pande R, Kamtekar S, Gao H. 1995. Molecular assembly of proteins and conjugated polymers: Toward development of biosensors. *Biotechnol. Bioeng.* 45: 116–121.
- Básaca-Loya A, Burboa MG, Valdez MA, Gámez R, Goycoolea FM, Gutiérrez-Millán LE. 2008. Aggregation behavior and rheology of culture broths of *Rhodospirillum rubrum*. *Rev. Mex. Fis. S* 54: 119–126.
- Benavides J, Rito-Palomares M. 2004. Bioprocess intensification: A potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *J. Chromatogr. B* 807: 33–38.
- Bermejo R, Talavera EM, Alvarez-Pez JM, Orte JC. 1997. Chromatographic purification of phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. High-performance liquid chromatographic separation of their α and β subunits. *J. Chromatogr. A* 778: 441–450.
- Bermejo R, Talavera EM, Alvarez-Pez JM. 2001. Chromatographic purification and characterization of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. Semipreparative high-performance liquid chromatographic separation and characterization of its subunits. *J. Chromatogr. B* 790: 135–145.
- Bermejo R, Alvarez-Pez JM, Acien-Fernández FG, Molina E. 2002. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *J. Biotechnol.* 93: 73–85.
- Bermejo R, Acien FG, Ibáñez MJ, Fernández JM. 2003. Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. *J. Chromatogr. B* 790: 317–325.
- Berova N, Nakanishi K, Woody RW (eds.). 1981. Circular Dichroism, Principles and Applications. 2nd ed. Wiley-VCH, New York.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- D'Agnolo E, Rizzo R, Paoletti S, Murano E. 1994. R-phycoerythrin from the red alga *Gracilaria longa*. *Phytochemistry* 35: 693–696.
- Duerring M, Schmidt GB, Huber R. 1991. Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of constitutive C-phycoerythrin from the chromatically adapting cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* at 1.66 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 217: 577–592.
- Ficner R, Lobeck K, Schmidt G, Huber R. 1992. Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of B-phycoerythrin from the red alga *Porphyridium sordidum* at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 228: 935–950.
- Gantt E. 1975. Phycobilisomes: Light harvesting pigment complex. *BioScience* 25: 781–787.
- Gantt E, Lipschultz CA. 1974. Phycobilisome of *Porphyridium cruentum*: Pigment analysis. *Biochemistry* 13: 2960–2966.
- Glazer AN. 1981. Photosynthetic accessory proteins with bilin prosthetic groups. In: Conn EE, Stumpf PK (eds.), *The Biochemistry of Plants*. Vol. 8. Academic Press, New York, pp. 51–96.
- Glazer AN. 1984. Phycobilisome: A macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochem. Biophys. Acta* 768: 29–51.
- Glazer AN. 1989. Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *J. Biol. Chem.* 264: 1–4.
- Glazer AN, Hixson CS. 1975. Characterization of R-phycoerythrin. *J. Biol. Chem.* 250: 5487–5495.
- Grabowski J, Gantt E. 1978. Photophysical properties of phycobiliproteins from phycobilisomes: Fluorescence life-times, quantum yields and polarization spectra. *Photochem. Photobiol.* 28: 39–45.
- Gray BH, Gantt E. 1975. Spectral properties of phycobilisomes and phycobiliproteins from the blue-green alga *Nostoc* spp. *Photochem. Photobiol.* 21: 121–128.
- Grossman AR. 1990. Chromatic adaptation and the events involved in phycobilisome biosynthesis. *Plant Cell Environ.* 13: 651–666.
- Haugland RP. 1996. Handbook of Fluorescent and Research Chemicals. 6th ed. Molecular Probes, Eugene, Oregon.
- Hilditch CM, Balding P, Jenkins R, Smith AJ. 1991. R-phycoerythrin from the macroalga *Corallina officinalis* (Rhodophyceae) and application of a derived phycocyanin probe for detecting sugar-binding sites on cell membranes. *J. Appl. Phycol.* 3: 345–354.
- Holzwarth AR. 1991. Structure function relationship and energy transfer in phycobiliprotein antennae. *Plant Physiol.* 83: 518–528.
- Iijima N, Shimamatsu H. 1982. Antitumor agent and method of treatment therewith. US Pat. Pending Ref. p1150-726-A82679.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Ma SY, Wang GC, Sun HB, Zeng CK. 2003. Characterization of the artificially covalent conjugate of B-phycoerythrin and R-phycoerythrin and the phycobilisome from *Porphyridium cruentum*. *Plant Sci.* 164: 253–257.
- MacColl R, Guard-Friar D. 1983. Phycocyanin 645: The chromophore assay of phycocyanin 645 from the cryptomonad protozoa *Chroomonas* species. *J. Biol. Chem.* 258: 14324–14329.
- Moerschel E. 1991. The light-harvesting antennae of cyanobacteria and red algae. *Photosynthesis* 25: 137–144.

La estructura secundaria de la B-PE de *R. marinus* no parece ser muy diferente a pH 2 al compararla con la estructura a pH 7 (ver tabla 1).

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el CONACYT (México) (convenio SEP-2004-C01-46749 y convenio 83191). La primera autora recibió una beca del CONACYT.

Traducido al español por Christine Harris.

Fremyella diplosiphon at 1.66 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 217: 577–592.

Ficner R, Lobeck K, Schmidt G, Huber R. 1992. Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of B-phycoerythrin from the red alga *Porphyridium sordidum* at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 228: 935–950.

Gantt E. 1975. Phycobilisomes: Light harvesting pigment complex. *BioScience* 25: 781–787.

Gantt E, Lipschultz CA. 1974. Phycobilisome of *Porphyridium cruentum*: Pigment analysis. *Biochemistry* 13: 2960–2966.

Glazer AN. 1981. Photosynthetic accessory proteins with bilin prosthetic groups. In: Conn EE, Stumpf PK (eds.), *The Biochemistry of Plants*. Vol. 8. Academic Press, New York, pp. 51–96.

Glazer AN. 1984. Phycobilisome: A macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochem. Biophys. Acta* 768: 29–51.

Glazer AN. 1989. Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *J. Biol. Chem.* 264: 1–4.

Glazer AN, Hixson CS. 1975. Characterization of R-phycoerythrin. *J. Biol. Chem.* 250: 5487–5495.

Grabowski J, Gantt E. 1978. Photophysical properties of phycobiliproteins from phycobilisomes: Fluorescence life-times, quantum yields and polarization spectra. *Photochem. Photobiol.* 28: 39–45.

Gray BH, Gantt E. 1975. Spectral properties of phycobilisomes and phycobiliproteins from the blue-green alga *Nostoc* spp. *Photochem. Photobiol.* 21: 121–128.

Grossman AR. 1990. Chromatic adaptation and the events involved in phycobilisome biosynthesis. *Plant Cell Environ.* 13: 651–666.

Haugland RP. 1996. Handbook of Fluorescent and Research Chemicals. 6th ed. Molecular Probes, Eugene, Oregon.

Hilditch CM, Balding P, Jenkins R, Smith AJ. 1991. R-phycoerythrin from the macroalga *Corallina officinalis* (Rhodophyceae) and application of a derived phycocyanin probe for detecting sugar-binding sites on cell membranes. *J. Appl. Phycol.* 3: 345–354.

Holzwarth AR. 1991. Structure function relationship and energy transfer in phycobiliprotein antennae. *Plant Physiol.* 83: 518–528.

Iijima N, Shimamatsu H. 1982. Antitumor agent and method of treatment therewith. US Pat. Pending Ref. p1150-726-A82679.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.

Ma SY, Wang GC, Sun HB, Zeng CK. 2003. Characterization of the artificially covalent conjugate of B-phycoerythrin and R-phycoerythrin and the phycobilisome from *Porphyridium cruentum*. *Plant Sci.* 164: 253–257.

MacColl R, Guard-Friar D. 1983. Phycocyanin 645: The chromophore assay of phycocyanin 645 from the cryptomonad protozoa *Chroomonas* species. *J. Biol. Chem.* 258: 14324–14329.

Moerschel E. 1991. The light-harvesting antennae of cyanobacteria and red algae. *Photosynthesis* 25: 137–144.

- Redlinger T, Gantt E. 1981. Polarized photo acoustic spectra of phycobilisomes in polyvinyl alcohol films. *Plant Physiol.* 68: 1375–1379.
- Rosowski JR, Parker BC (eds). 1971. *Selected Papers in Phycology*. Dept. of Botany, Univ. of Nebraska, Lincoln, 876 pp.
- Rossano R, Ungaro N, D'Ambrosio A, Liuzzi GM. 2003. Extracting and purifying R-phycoerythrin from Mediterranean red algae *Corallina elongate* Ellis & Solander. *J. Biotechnol.* 101: 289–293.
- Schoelemer RW, Leung S, Lundell D, Glazer AN. 1983. Chromopeptides from phycoerythrins. Structure and linkage of a phycoerythrobilin tryptic tripeptide derived from a B-phycoerythrin. *J. Am. Chem. Soc.* 105: 4072–4076.
- Siegelman HW, Kycia JH. 1978. Algal biliproteins. In: Hellebust JA, Cragie JS (eds.), *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge Univ. Press, pp. 71–79.
- Swanson RV, Glazer AN. 1990. Separation of phycobiliprotein subunits by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 188: 295–299.
- Tchernov AA, Minkova KM, Houbavenska NB, Kovacheva NG. 1999. Purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. by aminohexyl-sepharose chromatography. *J. Biotechnol.* 69: 69–73.
- Wang GC, Zhou BC, Tseng CK. 1998. Isolation, properties and spatial site analysis of the γ subunits of B-phycoerythrin and R-phycoerythrin. *Sci. China (Ser. C)* 41(1): 9–17.
- Yu MH, Glazer AN, Spencer KG, West JA. 1981. Phycoerythrins of the red alga *Callithamnion*. *Plant Physiol.* 68: 482–488.

Recibido en mayo de 2009;
aceptado en octubre de 2009.