



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**Caracterización bioquímica y funcional de una
alginasa del abulón rojo, *Haliotis rufescens***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA**

PRESENTA:

PIÑA PORTILLA MARÍA FERNANDA

**VWUÜCE
ÖÜCEŠÖRCE ÖÜCEP ÖÜP7P ÖÖZÄÜCEP VUÿU**



Ciudad Universitaria, CD. MX.

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Rodríguez Sotres Rogelio

VOCAL: Mendoza Rodríguez Carmen Adriana

SECRETARIO: Hernández Santoyo Alejandra

1^{ER} SUPLENTE: Morales Flores Félix

2° SUPLENTE: Pérez Díaz José Oscar Humberto

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Departamento de Química de Biomacromoléculas, laboratorio 3.

Instituto de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Alejandra Hernández Santoyo

SUSTENTANTE:

Piña Portilla María Fernanda

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Química de Biomacromoléculas 3 del Instituto de Química, UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Alejandra Hernández Santoyo.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	6
ABREVIATURAS	7
1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN	10
3. MARCO TEÓRICO	11
3.1 Alginato	11
3.2 Propiedades del alginato	12
3.3 Aplicaciones del alginato	13
3.4 Alginasas, enzimas que degradan alginato	14
3.5 Clasificación de las alginasas	14
3.6 Mecanismo de eliminación β	16
3.7 Estructura de las polisacárido liasas	17
3.8 Aplicaciones de las alginasas	20
3.9 <i>Haliotis rufescens</i>, abulón rojo	21
4. ANTECEDENTES	22
5. OBJETIVO GENERAL	24
5.1. Objetivos Particulares	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1 Material Biológico	25
6.2 Purificación de la alginasa	25
6.2.1 Extracción de la alginasa	25
6.2.2 Perlas de alginato	25
6.2.3 Purificación	26
6.3 Determinación de la actividad alginolítica	26
6.3.1. Protocolo para la determinación de actividad alginolítica	27

6.3.2. Curva de calibración DNS	28
6.4 Cuantificación de la enzima purificada.....	29
6.4.1. Curva de calibración cuantificación de proteína	29
6.5 Determinación del peso molecular de la enzima	31
6.5.1. Electroforesis SDS-PAGE	31
6.5.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF	31
6.6. Determinación de parámetros óptimos para la actividad de la alginasa	32
6.6.1 Efecto del pH.....	32
6.6.2 Efecto de la temperatura	32
6.7. Determinación de la estructura secundaria por dicroísmo circular	33
6.8. Estudios de fluorometría diferencial de barrido	35
6.9. Secuenciación de la alginasa de <i>H. rufescens</i>.....	38
6.9.1. Procedimiento para la digestión en gel	38
6.10. Modelado estructural.....	39
7. Resultados y Discusión _____	39
7.1 Purificación de la alginasa.....	39
7.2 Determinación de la pureza y de la masa molecular	42
7.3. Máximos de actividad alginolítica	43
7.3.1 Máximo de actividad en función de pH.....	43
7.3.2 Máximo de actividad en función de la temperatura	44
7.4 Estabilidad de la alginasa de <i>H. rufescens</i>	45
7.5. Estudios de dicroísmo circular de la alginasa de <i>H. rufescens</i>	46
7.6 Secuencia de la alginasa de <i>H. rufescens</i>	48
7.7 Modelado molecular	49
8. CONCLUSIONES _____	52
9. REFERENCIAS _____	53

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se realizó gracias al apoyo económico brindado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) mediante el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el No. De proyecto IN213022.

Un especial agradecimiento a la M. en C. Lucero Mayra Ríos Ruiz, la M. en C. Lucía del Carmen Márquez Alonso y a la Q. Eréndira García Ríos del Laboratorios de Cromatografía del Instituto de Química, UNAM por todo su apoyo técnico.

A la Q.F.B. Ma. Concepción José Núñez, Técnico Académico del Laboratorio de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por su apoyo técnico.

A la Dra. Adriana Romo Pérez del Laboratorio de Espectroscopía y Polarimetría del Instituto de Química, UNAM. Por su apoyo en el uso del equipo de dicroísmo circular.

ABREVIATURAS

α -CHCA: Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico

ACN: Acetonitrilo

BCA: Ácido bicinconínico

BSA: Albúmina de suero bovino

CAZy: Carbohydrate Active Enzymes

cP: centiPoise

DC: Dicroísmo circular

DNS: Ácido 3,5-dinitrosalicílico

DP: Degree of polymerization (Grado de polimerización)

DUC: Dominio de unión a carbohidratos

G: Ácido gulurónico

GG: Bloque de ácido gulurónico

GSH: Glutación

GSSG: Glutación disulfuro

kDa: kilo daltones

M: Ácido manurónico

MM: Bloque de ácido manurónico

MG: Bloque de ácido manurónico y gulurónico

MALDI-TOF: Espectrometría de masas mediante ionización-desorción por láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo.

PEG: Polietilenglicol

PL: Polisacárido liasas

Poli M: Bloques homopoliméricos de β -D-manuronato

Poli G: Bloques homopoliméricos de α -L-guluronato

Poli MG: Bloques heteropoliméricos de M y G

SDS-PAGE: Dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

rpm: revoluciones por minuto

TCA: Ácido tricloroacético

TCEP: Tris-(2-carboxietil)-fosfina clorhidrato

TFA: Ácido trifluoroacético

U: unidad de actividad

1. RESUMEN

Las alginasas son enzimas que rompen, mediante un mecanismo de eliminación β , los enlaces glicosídicos entre el ácido β -D-manurónico y el ácido α -L-gulurónico que conforman el alginato. A pesar de que se han identificado alginasas de diversas fuentes (algas, microorganismos, moluscos marinos) sólo se han caracterizado unas cuantas y en su mayoría de bacterias. Las alginasas de moluscos marinos han mostrado cierta dificultad para ser purificadas debido a que sufren fuertes procesos de oligomerización que muchas veces provocan la pérdida de su actividad en periodos de tiempo muy cortos, lo que ha impedido profundizar en su estudio.

En el presente trabajo se purificó a una alginasa del hepatopáncreas del molusco marino *H. rufescens* mediante una metodología desarrollada en el grupo de trabajo que consiste en utilizar perlas de alginato de sodio como matriz para una cromatografía de afinidad. Se obtuvieron 6 mg de alginasa pura a partir de un hepatopáncreas de 12 g, con un rendimiento de purificación de 54.8 % y una actividad específica de 1.02 U/mg. La alginasa presentó una masa molecular de 17.69 kDa, con óptima actividad a pH 7.5 y temperatura entre 50°C y 80°C. En los estudios de termofluorescencia se observó que la alginasa es muy estable y no se despliega aún a temperaturas de 85°C y que aditivos como la sacarosa y el manganeso favorecen su estabilidad. Esta estabilidad se verificó por dicroísmo circular en el UV lejano donde observamos que no hay cambios estructurales con el calentamiento. También, observamos que predominan las hebras β en su estructura secundaria. Identificamos la secuencia de la alginasa por medio de digestión enzimática y el posterior análisis de los péptidos en el servidor MASCOT. Dicha secuencia consta de 150 aminoácidos con una masa teórica de 16.8 kDa que es menor a la obtenida por espectrometría de masas, dicha diferencia puede ser el resultado de alguna modificación postraduccional. Con la secuencia se obtuvo un modelo estructural utilizando el servidor Robetta que muestra un plegamiento tipo rollo de gelatina o “ β -jelly roll” similar a las polisacárido liasas de la familia 14 y que los aminoácidos catalíticos Y114, Y116 y K78 se conservan.

2. INTRODUCCIÓN

Las alginasas, también llamadas alginato liasas o alginato despolimerasas, son enzimas que pertenecen a la familia de las polisacárido liasas. Éstas catalizan la degradación del alginato, un biopolímero de gran importancia comercial que es obtenido principalmente de algas marinas pardas como *Laminaria hyperborea* y *Laminaria digitata* y de los biofilms de bacterias de las familias Pseudomonadaceae y Azotobacteriaceae, a diferencia del sintetizado por algas, el producido por bacterias a menudo está acetilado en las posiciones 2 y/o 3 del D-manuronato¹. El alginato está constituido por largas cadenas de ácidos urónicos, el ácido β -D-manurónico y el ácido α -L-gulurónico, unidos por enlaces 1,4-glicosídicos que forman bloques homopoliméricos (con bloques continuos de ácido manurónico o ácido gulurónico) o bloques heteropoliméricos (bloques con los ácidos alternados). El mecanismo por el cual las alginasas degradan al alginato es un mecanismo de eliminación β , en el cual se produce un nuevo extremo reductor y un 4-deoxi-L-eritro-hex-4-eno-piranouronato.² Estas enzimas se han encontrado en bacterias, virus, algas y moluscos marinos, sin embargo, la información estructural y las propiedades de alginasas reportadas en su mayoría provienen de microorganismos, y a la fecha, hay pocos estudios que revelen características estructurales o bioquímicas de las alginasas de invertebrados marinos.

Las alginasas de moluscos tienen una fuerte tendencia a agregarse una vez que se extraen, por lo que nuestro grupo de trabajo diseñó un método económico, rápido y eficaz para purificar dichas enzimas sin que pierdan su actividad y manteniéndolas estables. Esta técnica se implementó al principio para purificar alginasas del molusco *Astraea undosa*³, como se observó que fue eficiente se utilizó en el presente estudio para purificar a una alginasa del abulón rojo *H. rufescens* y caracterizarla bioquímica y estructuralmente, aportando así información valiosa de este tipo de alginasas tan poco estudiadas.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Alginato

El alginato es un polímero compuesto por ácido β -D-manurónico (M) y su epímero en el carbono 5 el ácido α -L-gulurónico (G), estos ácidos están unidos mediante enlaces 1,4-glicosídicos y crean bloques que pueden acomodarse en tres diferentes arreglos: por regiones homopoliméricas, bloques MM, que son bloques exclusivamente de ácido β -D-manurónico y bloques GG que son bloques exclusivamente de ácido α -L-gulurónico o por regiones heteropoliméricas en donde estos ácidos están arreglados de forma aleatoria (figura 1).⁴

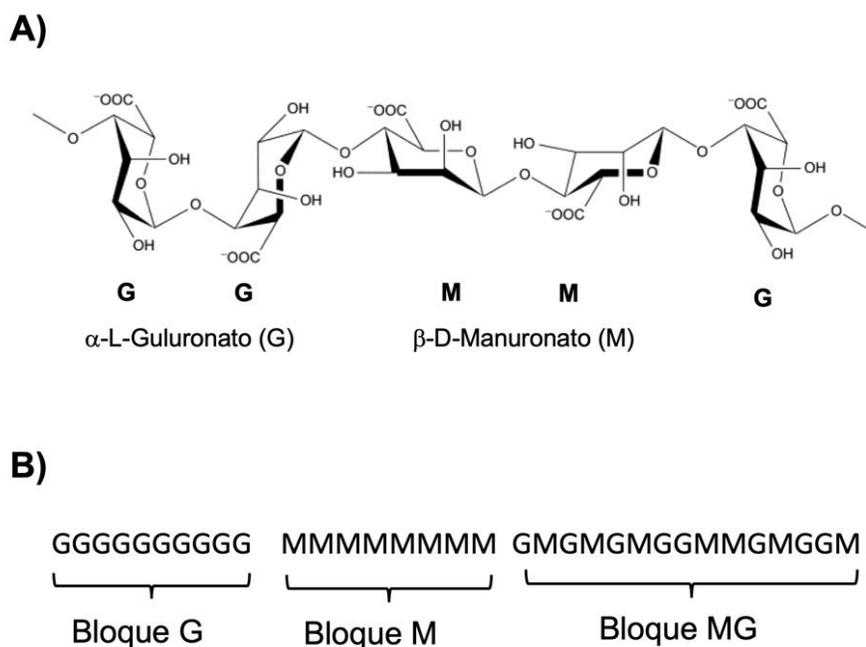


Figura 1. Características estructurales del alginato. A) Monómeros de ácidos urónicos que conforman al alginato y la forma de unión entre ellos. B) Representación de los bloques homopoliméricos (Bloques G y M) y heteropoliméricos (Bloques MG).

La principal fuente de alginato comercial son las algas marinas pardas que lo biosintetizan para proporcionar fuerza y elasticidad en sus tallos y hojas; por ejemplo, el alga *Laminaria hyperborea* que crece en áreas costeras muy expuestas

necesita que su estructura sea más rígida, por lo que el alginato tiene un alto contenido de bloques de ácido gulurónico, mientras que algas como *Macrocystis pyrifera* necesitan hojas más flexibles, conteniendo así más bloques de ácido manurónico (figura 2).⁵

El alginato también es biosintetizado por algunas bacterias como *Azotobacter vinelandii* y *Pseudomonas*, sin embargo, aún no se han estudiado tanto como para considerar obtener alginato comercial a través de estos u otros microorganismos.^{5, 6}



Figura 2. Algas marinas pardas. A la izquierda *Laminaria hyperborea* y a la derecha *Macrocystis pyrifera*.

3.2 Propiedades del alginato

Muchas de las aplicaciones comerciales del alginato dependen de su capacidad para formar geles en presencia de cationes multivalentes como Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} y Al^{3+} .⁷ Los bloques donde predomina el ácido gulurónico (G) tienen preferencia por el ion Ca^{2+} y lo enlaza fuertemente, mientras que los bloques de ácido manurónico (M) no tienen preferencia por ningún ion, también puede enlazar al ion Ca^{2+} , pero no con tanta fuerza como los bloques donde predomina el ácido gulurónico.⁴ A la estructura formada por los bloques enlazados al ion Ca^{2+} se le denomina estructura de “caja de huevo” (figura 3), esta fue propuesta por Rees *et al.*⁸ en la cual los residuos de ácido gulurónico forman un arreglo espacial, emulando una caja de huevo, creando intersticios donde se depositan los iones y se retienen por el efecto quelante que crea la interacción de éstos con los átomos de oxígeno pertenecientes al ácido carboxílico y con los hidroxilos.

Las características fisicoquímicas del gel formado dependen del contenido de ácidos en la estructura; por ejemplo, si la estructura en presencia de iones Ca^{2+} contiene más bloques de ácido gulurónico el gel formado será firme, pero quebradizo, mientras que si la estructura posee más bloques de ácido manurónico el gel será más ligero y flexible.⁴ La distribución, el tipo de los bloques y el peso molecular del alginato también influyen en la viscosidad, si el alginato posee una gran cantidad de bloques, si su masa molecular es muy alta, la viscosidad también lo será.⁹

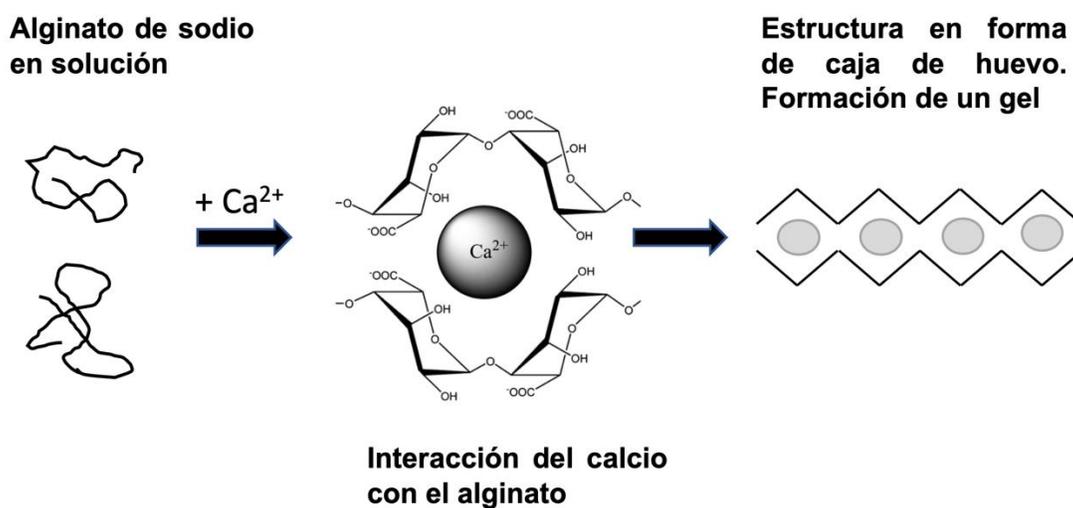


Figura 3. Formación de la estructura de “caja de huevo”. Los bloques de ácidos urónicos se arreglan de tal manera que puedan coordinar a los iones divalentes, este arreglo de las cadenas de ácidos urónicos simula la caja mientras que los iones que quedan coordinados simulan los huevos.

3.3 Aplicaciones del alginato

El alginato es ampliamente utilizado en diversas industrias, al ser un producto inocuo puede ser utilizado en diversos productos para consumo humano. Algunas de las principales industrias en utilizar este polisacárido son la industria alimentaria y la cosmética. En la tabla 1 se muestran algunas de las aplicaciones funcionales del alginato a diferentes industrias.

Tabla 1. Aplicaciones del alginato en algunas industrias.⁶

Área de aplicación	Función	Ejemplos
Industria Alimenticia	Estabilizador	Estabilizador de espumas, retardante de fases en los helados, les da consistencia a las salsas, pulpas de frutas o gelatinas. También se utiliza para reconstruir pequeños frutos como uvas y fresas.
	Viscosificante	
	Agente gelificante	
Industria Farmacéutica	Estabilizador	Ayuda a preparar emulsiones para productos cosméticos como jabones, pastas dentales. Protege algunos medicamentos en tabletas o grajeas. Moldes para impresiones dentales.
	Agente gelificante	
	Capas protectoras	
Biomedicina	Agentes terapéuticos	Se ha utilizado para tratar enfermedades del sistema digestivo, como antiácido y antiulceroso gástrico. Debido a su biocompatibilidad se han realizado estudios para utilizar alginato como injerto de tejidos.
	Injerto de tejido	

3.4 Alginasas, enzimas que degradan alginato

Las alginasas son un miembro de la familia de las polisacárido liasas (PL) que reconocen al alginato como su sustrato y pueden degradarlo rompiendo los enlaces 1,4-glicosídicos mediante mecanismo de eliminación β , generando un ácido hexenurónico insaturado y un nuevo extremo reductor.^{2,11} Las alginasas se han aislado de diferentes fuentes como algas, hongos, moluscos marinos y en una gran cantidad de microorganismos. En el caso de los moluscos marinos se ha encontrado actividad de estas enzimas en diferentes regiones de sus sistemas digestivos, por ejemplo, en el hepatopáncreas de *Littorina* spp y *Dollabella auricola* y en el estilete cristalino de *Choromystilus*. Estas enzimas son secretadas para facilitar la digestión de los tejidos algales que consumen como alimento.¹⁰

3.5 Clasificación de las alginasas

Las alginasas pueden clasificarse con base en su especificidad por el sustrato como poli M liasa (EC 4.2.2.3.), poli G liasa (EC 4.2.2.11.) o bifuncionales (Poli MG liasa),

(figura 4). Sin embargo, las poli M y poli G liasas suelen presentar menor actividad por el otro polímero ^{10,12}.

- **Poli M liasa o manuronidasas (EC 4.2.2.3).** Actúan sobre bloques de ácido manurónico (poli M), generando oligosacáridos con grupos 4-desoxi- α -L-eritro-hex-4-enuronosilo en sus extremos no reductores y β -D-manuronato en su extremo reductor¹².
- **Poli G liasa o guluronidasas (EC 4.2.2.11).** Actúan sobre bloques de ácido gulurónico (poli G), generando oligosacáridos con grupos 4-deoxi- α -L-eritro-hex-4-enuronosilo en sus extremos no reductores y α -L-guluronato en su extremo reductor¹².
- **Bifuncionales (aún no se les asigna número EC).** Actúan tanto en bloques de ácido manurónico como de ácido gulurónico, logrando degradar el alginato de manera más efectiva¹².

Estas enzimas también pueden clasificarse como endolíticas, si escinden los enlaces glicosídicos internos del polímero de alginato, y exolíticas, si eliminan monómeros o dímeros de los extremos del alginato¹². La mayoría de las alginato liasas caracterizadas hasta ahora muestran actividad endolítica.

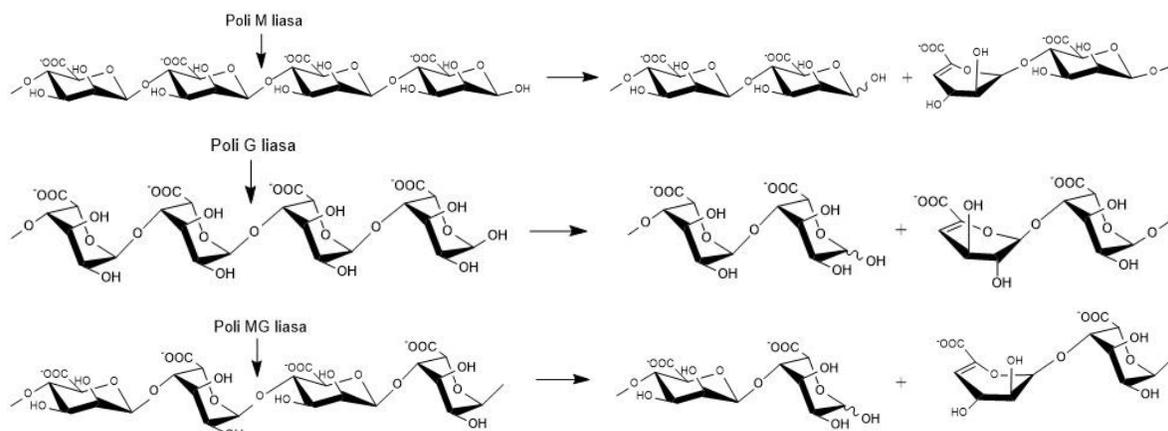


Figura 4. Especificidad de las alginato liasas. Las poli M liasas actúan sobre bloques de ácido manurónico, las poli G sobre los bloques de ácido gulurónico y las poli MG pueden actuar sobre ambos tipos de bloques. (Modificado de Garron y Cygler¹³).

3.6 Mecanismo de eliminación β

Como ya se ha mencionado en las secciones anteriores, las alginasas escinden al alginato mediante un mecanismo de eliminación β , para explicar este mecanismo se ha propuesto una reacción que consiste en tres etapas (figura 5):¹³ (1) neutralización del grupo carboxilo C5 del sustrato, a menudo mediante una carga positiva cercana, lo cual disminuye el pKa del protón H5 y aumenta su susceptibilidad a la abstracción; (2) se crea como intermediario un anión enolato por abstracción de protones en C5 y (3) la transferencia de electrones desde el grupo carboxilo para formar un doble enlace entre C4 y C5, provocando la ruptura del enlace glicosídico C4-O1. Esta ruptura crea dos extremos químicamente distintos; un azúcar con un doble enlace (en C4-C5) en el nuevo extremo no reductor, y un azúcar que permanece saturado en el nuevo extremo reductor. Dependiendo de las configuraciones en C4 y C5, el protón abstraído y el oxígeno puente C4 pueden estar en el mismo lado (configuración sin) o en lados opuestos (configuración anti) del anillo de ácido urónico. Según la nomenclatura de uso común, los azúcares se numeran +1, +2, etc. desde el sitio de escisión hacia el extremo reductor y -1, -2, etc. hacia el extremo no reductor.¹³ Al final de la reacción se produce 4-deoxi-L-eritro-hex-4-eno- en el extremo no reductor.

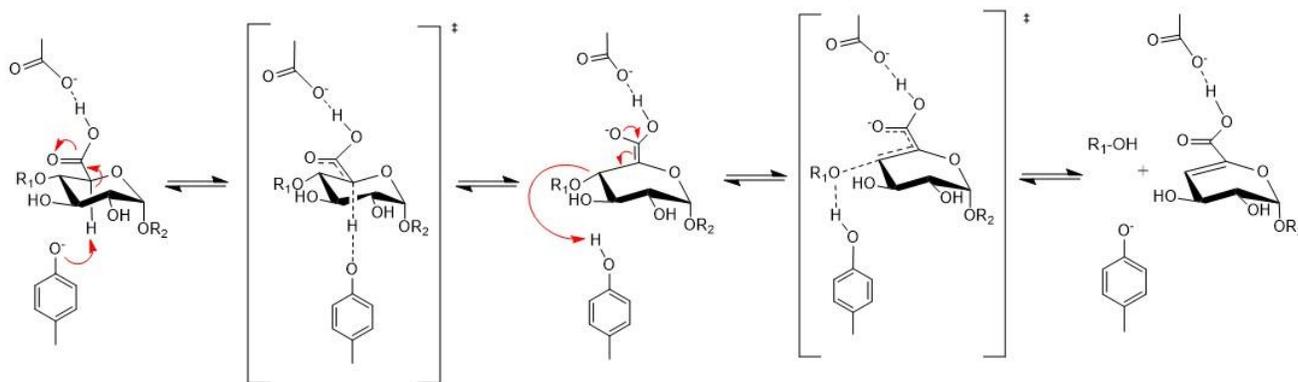


Figura 5. Mecanismo de acción general de polisacárido liasas (Modificado de Kötzer *et al.*¹⁴).

La reacción de β -eliminación requiere la participación de una base de Brønsted para aceptar el protón H5 y un ácido de Brønsted para donar el protón al grupo saliente que recrea un nuevo extremo reductor. Los mecanismos catalíticos se dividen en dos categorías con base en la naturaleza del grupo que neutraliza el carboxilo C5 y los residuos que desempeñan el papel de base y ácido de Brønsted: (1) neutralización del grupo ácido asistida por metal (Ca^{2+} , rara vez Mn^{2+}), con Lys como base Brønsted y Arg como ácido Brønsted o (2) neutralización del grupo ácido por Asn, Gln, Arg, His, Asp/Glu protonado, con Tyr o His como base Brønsted y Tyr como ácido Brønsted.^{13,15}

3.7 Estructura de las polisacárido liasas

De acuerdo con su estructura primaria, las alginato liasas se agrupan en trece familias de PL (tabla 2, figura 6). Las de origen bacteriano se agrupan en las familias de PL 5, 7, 15 y 17, encontrándose principalmente las enzimas endolíticas en las 5 y 7, y las exolíticas en las 15 y 17. Las alginato liasas de moluscos y virus marinos se encuentran en la familia 14 y las de algas en la 31. Las enzimas bifuncionales pertenecen a la familia 18.^{12,13,16,17} En la tabla 2, se muestran las familias de polisacárido liasas en donde se encuentran las alginasas reportadas a la fecha y en la figura 6 se muestran ejemplos de las estructuras de algunas alginasas que representan a cada familia. Cabe resaltar que casi todas las estructuras de las alginasas reportadas en el PDB (Protein Data Bank) se han obtenido a partir de microorganismos, en su mayoría bacterias.

La familia PL6 se caracteriza por su plegamiento tipo hélice- β y que contiene un ion Ca^{2+} que ayuda en su actividad enzimática. Un ejemplo es la condroitina-B liasa (ChonB), en esta enzima el ion Ca^{2+} está localizado dentro de un “parche ácido” formado por Asn, Glu, Glu y dos moléculas de agua. El ion Ca^{2+} actúa como neutralizador de cargas, un residuo de Lys se usa como base Brønsted y una Arg como ácido.¹⁸ Dentro de esta familia pocas alginasas se han caracterizado y todas provienen de microorganismos. AlyMG caracterizada a partir de *Stenotrophomas maltophilia*¹⁹, AlyP de *Pseudomona* sp²⁰, OalS6 de *Shewanella*²¹, AlyGC de *Glaciecola chathamensis*²² y AlyF de *Vibrio* OU02²³, entre las que solamente las últimas dos corresponden a estructuras cristalográficas reportadas en el PDB. En

los estudios de secuenciación y estructura de todas las alginasas anteriores se observa una alta similitud y conservación de los residuos que coordinan al Ca^{2+} en los sitios activos, lo que sugiere mecanismos catalíticos similares. Además de coincidir entre ellas también coinciden con la ChonB (figura 7).²³

Tabla 2. Familias de polisacárido liasas en las que se incluye a las alginato liasas. Tipos de plegamiento y residuos implicados en el mecanismo de catálisis asociados a cada familia.^{13,16}

Familia PL	Número EC	Plegamiento	Tipo de eliminación Sin/anti	Base	Ácido	Neutralizante
5	4.2.2.3	Barril (α/α) ₆	Sin/anti	Tyr	Tyr	Asn
6	4.2.2.3	β -Hélice paralela	Anti/sin	Lys	Arg	Ca^{2+}
	4.2.2.11					
7	4.2.2.3	β -Jelly roll	Sin/anti	His	Tyr	Arg
	4.2.2.11					
14	4.2.2.3	β -Jelly roll	Sin/anti	Tyr	Tyr	N.D.
15	4.2.2.3	Toroide (α/α) ₆ + hoja β antiparalela	Sin/anti	His	Tyr	His/Arg
17	4.2.2.3	Toroide (α/α) ₆ + hoja β antiparalela	Anti	Tyr	Tyr	His/Asn
18	4.2.2.3	β -Jelly roll	Sin/anti	Tyr	Tyr	Gln
	4.2.2.11					
31	4.2.2.3	β -Hélice paralela	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
32	4.2.2.3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
34	4.2.2.-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
36	4.2.2.3	β -Jelly roll	N.D.	Lys	Lys	Arg/Tyr

N.D.: Información estructural no determinada.

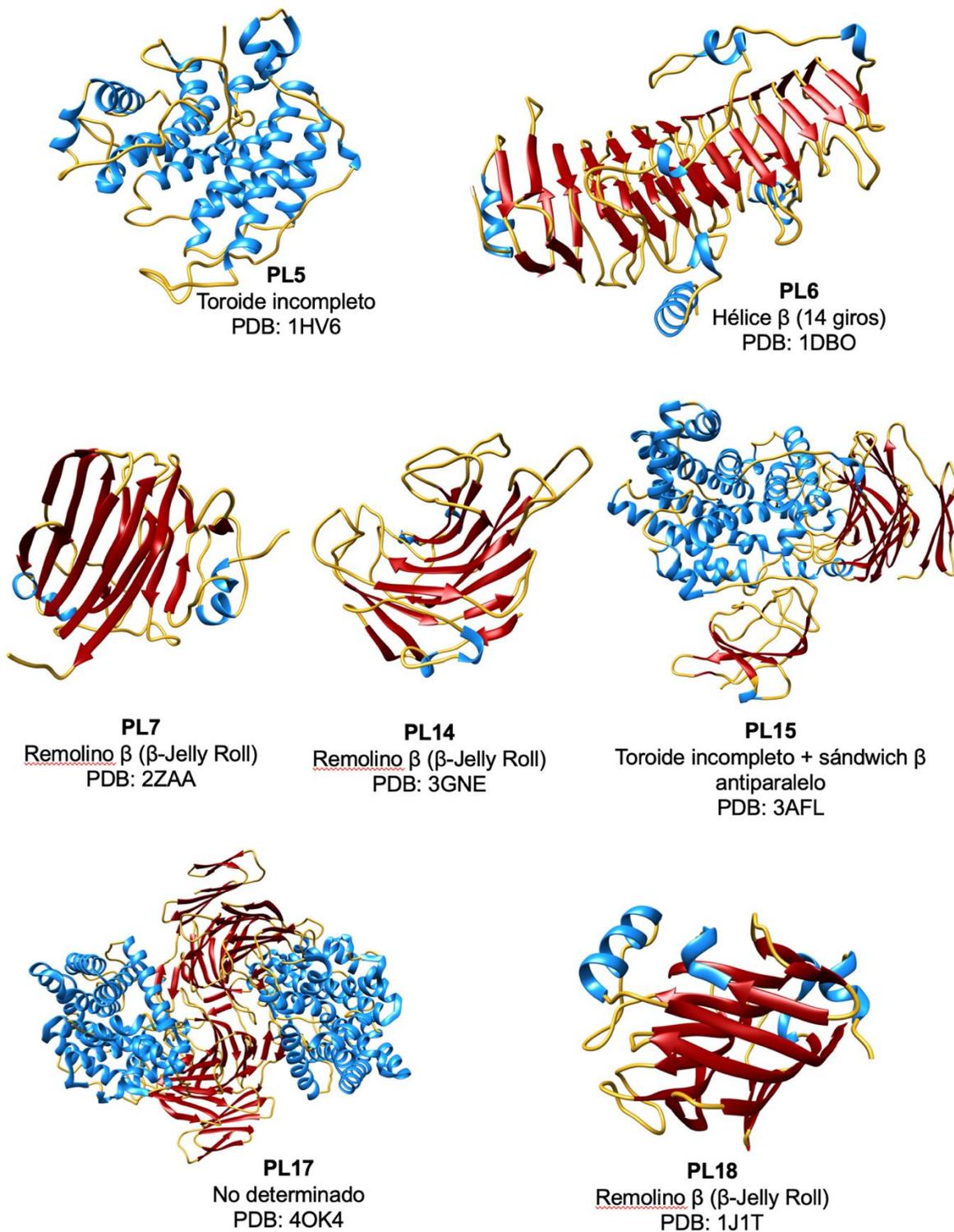


Figura 6. Ejemplo de alginasas de cada una de las familias para las que se ha determinado al menos una estructura y sus coordenadas depositadas en el PDB.

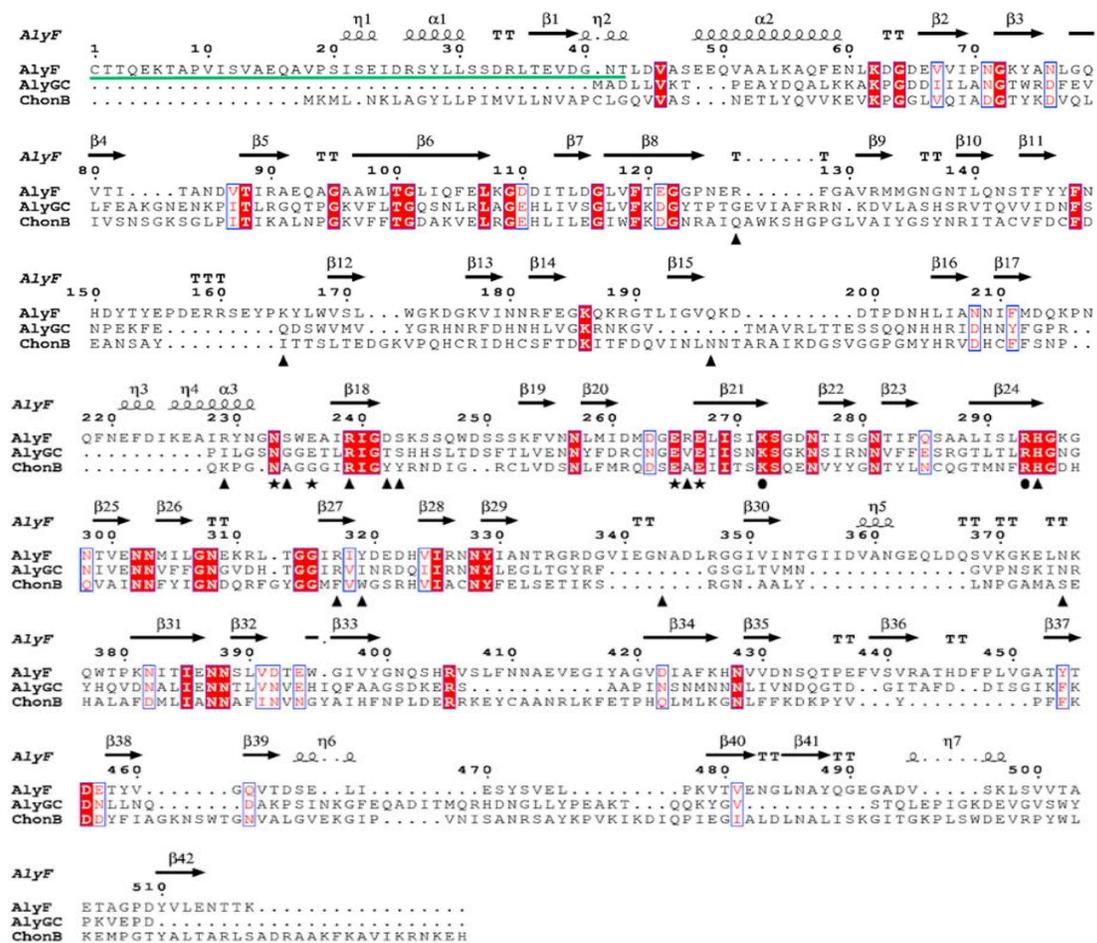


Figura 7. Alineamiento de las secuencias de AlyF, AlyCG y ChonB. Los residuos idénticos se encuentran resaltados en color rojo, los residuos homólogos se encuentran en los cuadros azules. Los residuos que intervienen en la reacción catalítica están marcados con un círculo negro (●), los residuos que coordinan al Ca^{2+} están marcados con una estrella (★), las flechas representan las hebras β (→) y los giros β se representan con TT. (figura tomada de Qianqian Lyu *et al.*)²³.

3.8 Aplicaciones de las alginasas

El uso de las alginasas para la eficiente despolimerización del alginato ha permitido mejorar o crear nuevas tecnologías aplicables en diferentes industrias. Un ejemplo de cómo las alginasas pueden ayudar a mejorar tratamientos terapéuticos es el caso de la fibrosis quística. En pacientes con fibrosis quística la bacteria *P. aeruginosa*

puede proliferar y empeorar la condición del paciente ya que el alginato producido por la bacteria provoca que las secreciones del pulmón (esputo) sean más viscosas y difíciles de expulsar; la capacidad de las alginasas para despolimerizar el alginato podría contribuir a la mejora de medicamentos para que los pacientes puedan expulsar las secreciones pulmonares con mayor facilidad y tener una vía respiratoria más limpia.^{4,24,25} El alginato despolimerizado por alginasas puede ayudar en el crecimiento de bifidobacterias, bacterias anaerobias gram-positivas que predominan en el tracto intestinal y que ayudan en la digestión, eliminan bacterias que pueden dañar el tramo intestinal y causar enfermedades como la gastroenteritis e incluso tumores.^{26,27} Además, promueve el crecimiento de las bifidobacterias y de los queratinocitos, células que se encuentran en la epidermis (la capa más superficial de la piel) y producen una proteína llamada queratina.^{28,29}

Las algas cafés poseen un 40% de peso seco de alginato, no se necesitan plantar en amplios terrenos o cuidados especiales para su cultivo, así que se han considerado como materia prima en la producción de biocombustibles. Debido a que estas algas no contienen lignina, los azúcares pueden ser liberados por simple molienda, esto propicia el aumento de los rendimientos y evita tratamientos antes de la fermentación. Un estudio del Departamento de Energía de los Estados Unidos (DOE) asevera que las algas tienen el doble de productividad que la caña de azúcar para producir etanol y cinco veces más que el maíz. Para que los azúcares de las algas puedan ser fermentados primero deben ser hidrolizados por enzimas, es aquí donde entran las alginasas que pueden degradar el alginato que predomina en las algas cafés.³⁰⁻³³

3.9 *Haliotis rufescens*, abulón rojo

El abulón rojo, *H. rufescens* (figura 8), es un molusco marino (gasterópodo) que habita en las zonas intermareales y submareales rocosas, en profundidades de hasta 65 m. Estos moluscos tienen un cuerpo suave, rodeado de un manto, una cabeza anterior y un pie grande o músculo abductor el cual tiene un fuerte succión que habilita al abulón adherirse a las superficies rocosas. Su concha es gruesa, oval y convexa con poros respiratorios y con una coloración rojiza de la cual deriva su

nombre común. En su hábitat natural su principal fuente de alimentación es el alga marrón *Macrocystis pyrifera*, aunque también puede incluir en su dieta otras algas como *Gracilaria* sp. y *Egregia* sp.^{34,35} En México, el abulón rojo se encuentra distribuido desde las Islas Coronado hasta Punta Blanca en Baja California, con mayor abundancia cerca de Bahía El Rosario donde tiene una gran importancia comercial. Este organismo se recolecta o se cultiva para su venta, el músculo con el que se adhieren a las rocas es comestible así que se vende fresco, congelado o enlatado, la concha también es vendida con fines artesanales.³⁶



Reino: Animalia
Filo: Mollusca
Clase: Gastropoda
Superfamilia: Haliotoidea
Familia: Haliotidae
Género: *Haliotis*
Especie: *H. rufescens*

Figura 8. Abulón rojo, *H. rufescens*. A la izquierda se muestra la concha de este molusco, al centro se observa en su hábitat. A la derecha se muestra la clasificación zoológica del molusco.

4. ANTECEDENTES

Las alginasas se han encontrado en organismos que sintetizan y que no sintetizan alginato. En los primeros, las alginasas ayudan a una biosíntesis efectiva y también a la degradación, en los segundos las alginasas ayudan a estos organismos a la asimilación del alginato como fuente de carbono.¹⁷ Uno de los primeros estudios acerca de las alginasas fueron los descritos por Preiss y Ashwell en 1962, quienes encontraron actividad alginolítica en bacterias.³⁷ Después, estas enzimas fueron detectadas en algas, hongos y moluscos marinos.

En 1999, en la universidad de Kioto, Yoon *et al.* obtuvieron la primera estructura cristalográfica de una alginasa proveniente de la bacteria *Sphingomonas* sp. Esa bacteria produce tres tipos de alginasa: A1-I, A1-II y A1-III, en las que la alginasa A1-II degrada alginatos no acetilados como los que se encuentran en las algas

pardas, mientras que la alginasa A1-III degrada alginato acetilado producido por otras bacterias. La estructura cristalográfica que lograron obtener pertenece a la alginasa A1-III (figura 9).³⁸ Posteriormente, se obtuvieron las estructuras de alginasas provenientes de otros organismos como *Vibrio splendidus*, *Defluviitalea phaphyphilia*, *Saccharophagus degradans* y *Pseudomonas aeruginosa*.

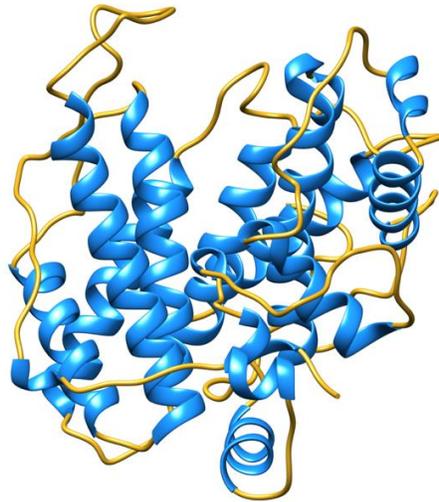


Figura 9. Estructura cristalográfica de la alginasa A1-III de *Sphingomonas* sp. (código PDB, 1QAZ)

A pesar de que se ha reportado la presencia de alginasas en el tracto digestivo de moluscos marinos, estos han sido muy poco estudiados y, a la fecha, solo se cuenta con la estructura de una alginasa del molusco marino *Aplysia kurodai* (código PDB, 5GMT).³⁹ En 1968, Nisizawa *et al.* encontraron la primera manuronato liasa en el hepatopáncreas del molusco marino *Dolabella auricula*.⁴⁰ Más adelante, se reportó la presencia de alginasas en otros moluscos como *Orconectes rusticus*⁴¹, *Littorina brevicula*⁴¹, *Omphalius rusticus*⁴¹, *Aplysia californica*⁴², *Aplysia kurodai*⁴², *Turbo cornutus*⁴³, entre otras. Dentro del género *Haliotis*, se han encontrado alginasas en el hepatopáncreas de *Haliotis corrugata*⁴⁴, *Haliotis iris*⁴¹, *Haliotis discus hannai*^{45,46} y *Haliotis tuberculata*⁴⁷; estas alginasas se han purificado parcialmente, debido a que pierden su actividad en periodos de tiempo muy cortos. Con la finalidad de aportar nueva información sobre alginasas, en nuestro equipo de trabajo se

desarrolló un método para poder purificar enzimas de este tipo sin comprometer su actividad y estabilidad. En este método se aprovecha la capacidad del aginato de gelificar en presencia de calcio para preparar perlas insolubles de alginato de sodio que funcionan como matriz en una cromatografía de afinidad. Para obtener las perlas con las propiedades idóneas para este fin, se probaron diferentes concentraciones de CaCl_2 desde 5 mM hasta 500 mM y se realizaron estudios de microscopia de fuerza atómica para conocer la estructura y porosidad de las perlas formadas (figura 10), determinando que las perlas formadas a una concentración de 100 mM de CaCl_2 son las más apropiadas para emplearlas como matriz.³

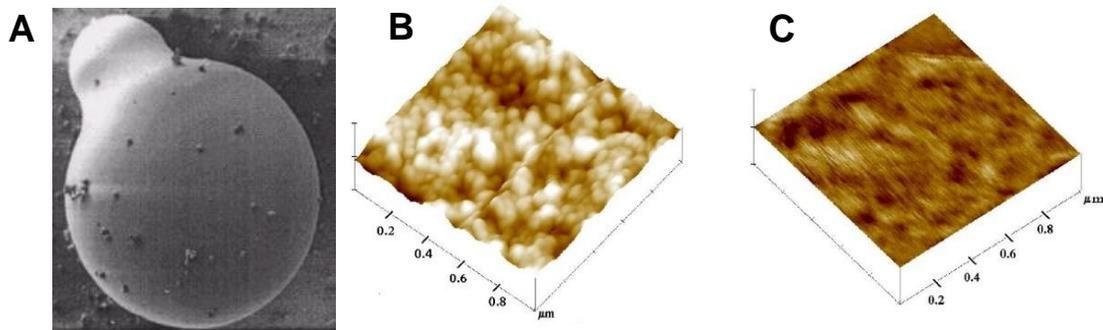


Figura 10. A) Perla obtenida a partir de la interacción de alginato de sodio con CaCl_2 . B) Imagen de microscopia de fuerza atómica de la película de alginato con CaCl_2 100 mM. C) Imagen de microscopia de fuerza atómica de la película de alginato con CaCl_2 500 mM.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar bioquímica y estructuralmente a una alginasa obtenida del hepatopáncreas del molusco marino *H. rufescens*.

5.1. Objetivos Particulares

- 1) Purificar una alginasa de *H. rufescens* utilizando perlas de alginato de sodio.

- 2) Determinar la masa molecular de la proteína mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y evaluar los óptimos de actividad en función del pH y temperatura.
- 3) Determinar las condiciones óptimas de estabilidad de la enzima mediante ensayos de fluorimetría diferencial de barrido.
- 4) Estimar el contenido de estructura secundaria de la alginasa mediante estudios de dicroísmo circular en el UV lejano.
- 5) Obtener la secuencia de aminoácidos mediante digestión enzimática.
- 6) Obtener un modelo de la estructura terciaria de la alginasa.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material Biológico

En el presente estudio se trabajó con el abulón rojo *H. rufescens*. Estos moluscos fueron colectados y transportados vivos desde la bahía Todos Santos en Ensenada, Baja California hasta el Instituto de Química de la UNAM, donde se congelaron a -55°C hasta su uso.

6.2 Purificación de la alginasa

6.2.1 Extracción de la alginasa

Se desprendió la concha del músculo y se separó el hepatopáncreas, éste se homogenizó con un amortiguador de Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM utilizando una batidora de inmersión. El homogenizado se centrifugó a 12000 rpm durante 20 min para remover restos de tejido. El sobrenadante se almacenó a 4°C .

6.2.2 Perlas de alginato

Las perlas de alginato se prepararon disolviendo alginato de sodio de media viscosidad ($> 2,000$ cP.) en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8 a una concentración 2% m/v. Una vez disuelto, la disolución de alginato se goteó en una disolución de

CaCl₂ 100 mM en constante agitación. Las perlas formadas se lavaron con Tris-HCl 50 mM pH 8 para eliminar el exceso de calcio y se almacenaron a 4°C hasta ser utilizadas.

6.2.3 Purificación

El extracto homogenizado se incubó con las perlas de alginato a 4°C durante 45 min. El extracto se retiró de las perlas y éstas se lavaron con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8 con diferentes concentraciones de NaCl (0 M, 0.2 M, 0.5 M, 1.0 M) esto con el fin de eluir proteínas que no interaccionaron con las perlas. Al final, las perlas se almacenaron a 4°C con Tris-HCl 50 mM pH 8 NaCl 1.5 M por una noche para eluir a la alginasa que estaba fuertemente unida a las perlas. Después se separaron las perlas del sobrenadante que contenía a la alginasa pura. Debido a que el sobrenadante tenía restos de alginato fuertemente unido a la enzima, fue necesario dializarlo contra una disolución de Tris-HCl 50 mM pH 5 NaCl 2 M con una membrana Spectra/Por® de 3.5 kDa, con recambios frecuentes para que al cambiar el pH y aumentar la fuerza iónica lograr que la interacción proteína alginato se rompiera. Posteriormente la enzima se filtró a través de un filtro Millipore de 0.22 µm y el alginato quedó en el filtro. Al final, la enzima se dializó contra amortiguador de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 NaCl 150 mM, para regresarla a sus condiciones de máxima actividad y estabilidad.

6.3 Determinación de la actividad alginolítica

Para determinar la actividad de alginasa se utilizó el método colorimétrico del ácido dinitrosalicílico (DNS), que se utiliza ampliamente para cuantificar azúcares reductores (figura 11). Este método consiste en la reacción simultánea de la oxidación del grupo aldehído del azúcar a un ácido carboxílico y la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico en un medio básico y en presencia de calor.⁴⁸

El ácido 3,5-dinitrosalicílico posee un color amarillo brillante, cuando se reduce a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico cambia a color marrón. La intensidad del color marrón es directamente proporcional a la cantidad de azúcares reductores presentes, esta señal de color puede medirse con un espectrómetro a 550 nm.

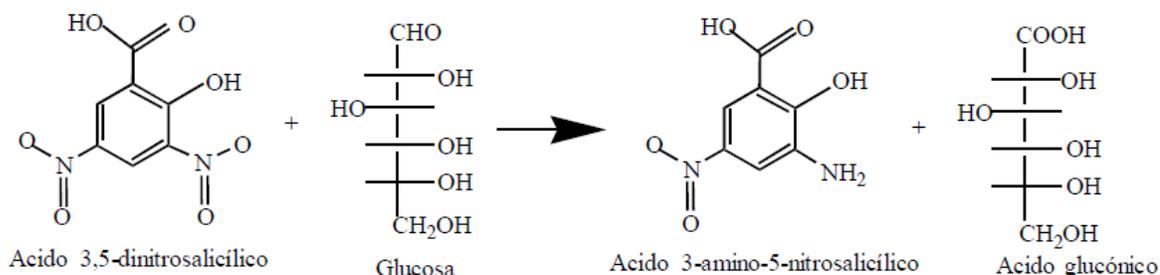


Figura 11. Reacción de oxido-reducción entre el ácido 3,5-dinitrosalicílico y la glucosa.

6.3.1. Protocolo para la determinación de actividad alginolítica

El reactivo del DNS se preparó disolviendo 7.06 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico en 944 mL de agua destilada, posteriormente se agregaron 13.2 g de NaOH, 204 g de tartrato de sodio y potasio, 5.52 g de metabisulfito de sodio y 4.6 mL de fenol. La disolución resultante se almacenó a 4°C en un frasco ámbar.

Para determinar la actividad de la alginasa en la muestra se realizó un ensayo que consiste en preparar tres tubos de reacción con las siguientes características:

- Blanco de muestra: 400 µL de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8 y 100 µL de la muestra.
- Blanco Sustrato: 250 µL de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8 y 250 µL de alginato al 0.5% m/v.
- Muestra: 150 µL de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8, 250 µL de alginato al 0.5% m/v y 100 µL de muestra.

Los tubos se incubaron a 45°C durante 45 minutos, al terminar este tiempo se agregaron 500 µL del DNS a cada tubo y se llevaron a ebullición (100°C) durante

15 minutos. Después los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro.

El blanco de muestra y el blanco de sustrato se prepararon con la finalidad de descartar azúcares reductores en la muestra y en el alginato. Cada ensayo se realiza por triplicado.

6.3.2. Curva de calibración DNS

Los resultados de las pruebas de actividad alginolítica se extrapolaron a una curva de calibración. Para construir esta curva se preparó una disolución stock de ácido glucurónico, a partir de ésta se prepararon seis disoluciones con diferentes concentraciones. Estas se incubaron a 45°C durante 45 minutos, posteriormente se agregaron 500 µL de DNS y se llevó a ebullición durante 15 minutos. Se midió la absorbancia de cada tubo a 550 nm (figura 12).

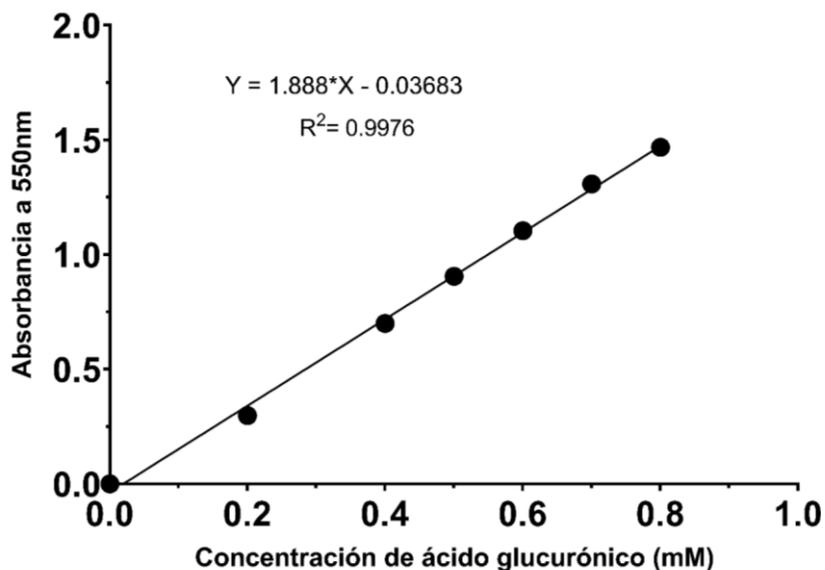


Figura 12. Curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores, utilizando ácido glucurónico como estándar.

6.4 Cuantificación de la enzima purificada

Para cuantificar la enzima se utilizó el kit Pierce™ BCA Protein Assay, que se basa en la reacción de Biuret, en la cual el Cu^{2+} se reduce a Cu^{1+} en presencia de una proteína en medio alcalino, posteriormente el ácido bicinconíco (BCA) forma un complejo al quelar al Cu^{1+} (figura 13) este complejo de color púrpura presenta absorbancia a 562 nm^{49} .

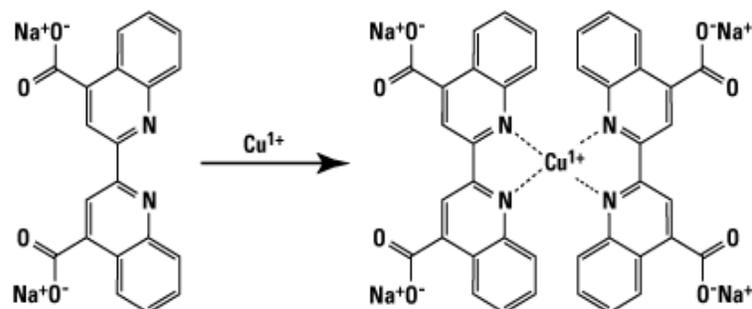


Figura 13. Reacción entre el ácido bicinconínico (BCA) y el Cu^{1+} para formar el complejo de color púrpura.

Para cuantificar la enzima se siguió la metodología descrita en este mismo kit. Se preparó una disolución 50:1 del reactivo A con el reactivo B, esta disolución se mezcló con la muestra de la enzima purificada y se incubó a 60°C durante 30 minutos, se enfrió y posteriormente se leyó la absorbancia a 562 nm .

6.4.1. Curva de calibración cuantificación de proteína

La curva de calibración (figura 14) se construyó conforme lo descrito en el protocolo del kit, utilizando como guía la tabla 3, en donde el stock es la albúmina de suero bovino a una concentración de 2 mg/mL y el diluyente es amortiguador de Tris-HCl 50 mM pH 8.

Tabla 3. Esquema de dilución de BSA para construir la curva de calibración para la cuantificación de la enzima.

Vial	Volumen de diluyente (µL)	Volumen y fuente de BSA (µL)	Concentración final de BSA (µg/mL)
A	700	100 del stock	250
B	400	400 del vial A	125
C	450	300 del vial B	50
D	400	400 del vial C	25
E	400	100 del vial C	5
F	400	0	0 = blanco

Se preparó el reactivo de trabajo utilizando el reactivo A y el reactivo B en relación 50:1, a cada tubo de reacción se agregó 500 µL de este reactivo y 25 µL de la albúmina de suero bovino en la concentración correspondiente. Los tubos de reacción se incubaron a 60°C durante 30 minutos. Se enfriaron y se leyó la absorbancia de la disolución a 562 nm.

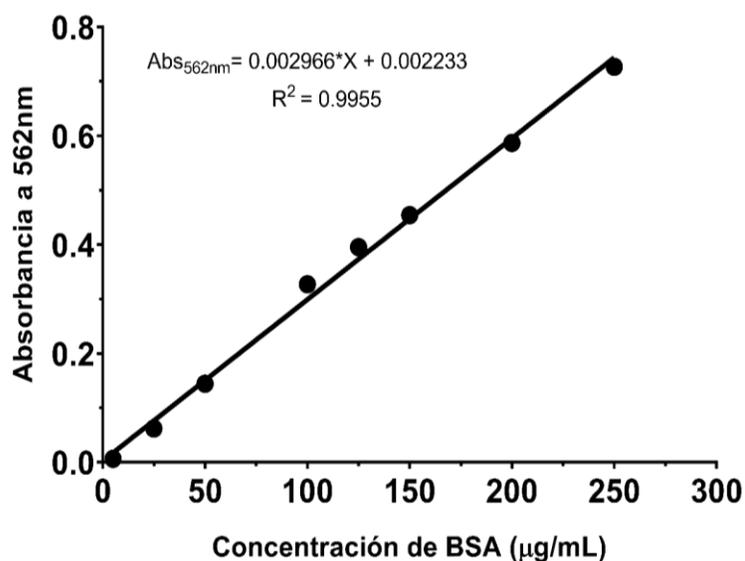


Figura 14. Curva de calibración para la cuantificación de proteína con el método del ácido bicinónico y utilizando BSA como estándar.

6.5 Determinación del peso molecular de la enzima

6.5.1. Electroforesis SDS-PAGE

La técnica de electroforesis SDS-PAGE es ampliamente utilizada para conocer el peso molecular de proteínas. El SDS (dodecilsulfato de sodio) es un detergente que desnatura a la enzima y le proporciona carga negativa, así la enzima puede migrar a través del gel poliacrilamida hacia un electrodo de la carga opuesta.^{50,51}

Se evaluó la pureza y masa molecular de la alginasa mediante electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras en un gel de poliacrilamida al 12%. La separación se realizó utilizando una corriente constante de 90 V, con un sistema electroforético de BioRad® (Mini-PROTEAN Tetra Cell®). Se utilizaron los marcadores de masa molecular de 200 kDa a 6.5 kDa de BioRad® (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range, #161-0317) y de Sigma® (SigmaMarker®, wide range, S8445). Los geles se fijaron con una solución fijadora-desteñidora (50 mL de metanol, 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua) y se tiñeron con una solución de InstantBlue™.

6.5.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF

La masa molecular de la amilasa fue analizada por espectrometría de masas MALDI-TOF. Esta es una técnica que puede ionizar y analizar compuestos de masa molecular grande como, por ejemplo, proteínas. Esta técnica se caracteriza por la cocrystalización de la muestra en presencia de un exceso de una matriz absorbente de radiación UV. La ionización del analito ocurre cuando se aplican impulsos láser que excitan la muestra. La detección de iones generalmente se logra mediante el uso de un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF). El propósito de la matriz es principalmente diluir la muestra y absorber la energía del láser e intercambiar protones con la muestra, lo que resulta en su ionización.⁵²

En el presente estudio se usó ácido sinapínico como matriz, la cual se preparó a saturación en una solución de ácido trifluoroacético 0.1 %, acetonitrilo 30 % y agua desionizada 30 %, se cocrystalizó con la alginasa y se analizó en un equipo Microflex Bruker daltonics.

6.6. Determinación de parámetros óptimos para la actividad de la alginasa

6.6.1 Efecto del pH

Para conocer el pH en el cual existe mayor actividad alginolítica, se colocó a la enzima purificada en amortiguador universal (Britton-Robinson) con valores de pH entre 3 y 12. Para cada valor de pH se prepararon tres tubos de reacción con las siguientes características:

- Blanco muestra: 50 μL de la enzima purificada y 450 μL de amortiguador universal.
- Blanco sustrato: 250 μL de alginato de sodio 0.5% y 250 μL de amortiguador universal.
- Muestra: 250 μL de alginato de sodio 0.5%, 50 μL de enzima purificada y 200 μL de amortiguador universal.

Los tubos se incubaron a 45°C durante 45 minutos, posteriormente se agregaron 500 μL de DNS y se llevó a ebullición (100°C) durante 15 minutos. Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia de la muestra a 550nm.

El amortiguador universal, Britton-Robinson, se preparó mezclando 3 ácidos diferentes: ácido bórico 0.04 M, ácido fosfórico 0.04 M y ácido acético 0.05 M. El valor del pH se ajustó desde 2 hasta 12 utilizando una disolución de NaOH 0.2 M⁵³

6.6.2 Efecto de la temperatura

Para conocer la temperatura en la cual la enzima tiene mayor actividad alginolítica se utilizó la muestra de la enzima al pH óptimo y se incubó a varias temperaturas, desde 4°C hasta 90°C. Para cada valor de temperatura se prepararon tres tubos de reacción con las siguientes características:

- Blanco muestra: 90 μL de la enzima purificada y 410 μL de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.5

- Blanco sustrato: 250 μL de alginato de sodio 0.5% y 250 μL de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.5
- Muestra: 250 μL de alginato de sodio 0.5%, 90 μL de enzima purificada y 160 μL de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.5

Los tubos se incubaron a las temperaturas estudiadas, de 4°C a 90°C durante 45 minutos, posteriormente se agregaron 500 μL de ácido dinitrosalicílico (DNS) y se llevó a ebullición (100°C) durante 15 minutos. Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia de la muestra a 550 nm.

6.7. Determinación de la estructura secundaria por dicroísmo circular

La aplicación de la espectroscopía de dicroísmo circular (DC), en la determinación de la estructura secundaria de proteínas, se basa en la quiralidad de los aminoácidos que la conforman. La teoría de dicroísmo circular fue desarrollada por Neumann y Shtatzke en 1990.⁵⁴ La técnica utiliza las propiedades de la luz polarizada que se forma por dos componentes polarizados circulares, uno a la izquierda y otro a la derecha. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. La interacción de la radiación con la muestra (en este caso una proteína), provoca un desfase y un cambio de amplitud en ambos componentes circularmente polarizados. Estos fenómenos provocan una rotación del plano de polarización en un ángulo α y, como resultado de la distorsión, los componentes vertical y horizontal de la rotación de la luz adquieren una magnitud distinta, dando lugar a un tornillo de sección elíptica, cuyos ejes mayor y menor describen un triángulo rectángulo. El ángulo entre el eje mayor y la hipotenusa de dicho triángulo se denomina elipticidad y se suele reportar en radianes. La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados varían de acuerdo con la longitud de onda (λ), la concentración molar de las sustancias ópticamente activas y la longitud de paso de la celda empleada, así, el valor de elipticidad se normaliza dividiéndolo por

la concentración de proteína y la longitud de paso, dando lugar a elipticidad molar, cuyas unidades tradicionales son $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$.⁵⁵

Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm), de la radiación electromagnética. En la región del ultravioleta cercano, los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptofano, tirosina y fenilalanina. La asimetría en estos grupos químicos se debe exclusivamente a su entorno ya que los residuos aromáticos se encuentran presentes en casi todas las proteínas. Los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína y las señales obtenidas son sensibles a los cambios en la misma. Por otro lado, los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano, se deben principalmente a los enlaces peptídicos que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presente, es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices alfa, hojas beta, giros y lazos); (figura 15).⁵⁵

El contenido de estructura secundaria de la alginasa se determinó por su espectro de dicroísmo circular. La alginasa se dializó con una membrana Spectra/Por® de 3.5 kDa contra un amortiguador de Tris-HCl 5 mM pH 7.4 NaCl 50 mM. Una vez dializada se filtró con filtros Millipore de 0.22 μm y se corrieron los espectros. También se evaluó el efecto del CaCl_2 y ZnSO_4 5 mM en su estructura. Dichos espectros se obtuvieron a 20 °C en un espectropolarímetro JASCO J-700. Los experimentos se realizaron en una celda de 1 mm de paso de luz para la región del ultravioleta (UV) lejano (185-260 nm) y las lecturas fueron registradas cada 1 nm. Los resultados se expresan como elipticidad molar por residuo medio $[\theta]$. Además, se realizó un barrido de temperatura de 20°C a 80°C y de 80°C a 20°C para observar la estabilidad térmica.

La desconvolución de los espectros para la determinación del contenido de estructura secundaria se realizó con el servidor BeStSel (<http://bestsel.elte.hu/>). BeStSel (Beta Structure Selection) es un servidor web creado para la determinación del contenido de estructura secundaria a partir de los espectros de CD.⁵⁶

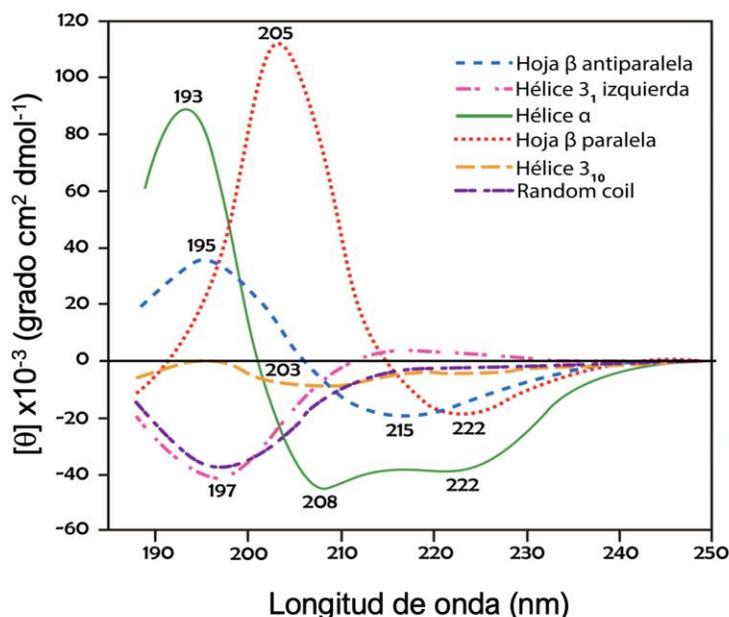


Figura 15. Espectros característicos asociados a cada una de las estructuras secundarias.

6.8. Estudios de fluorimetría diferencial de barrido

La fluorimetría diferencial de barrido (Differential Scanning Fluorimetry, DSF) es una técnica que se realiza utilizando un instrumento de PCR en tiempo real y que permite seguir el despliegue térmico de proteínas en presencia de un fluoróforo que se encuentra apagado en solución acuosa pero que fluoresce intensamente en un entorno no polar.⁵⁷ En esta técnica, el fluoróforo se agrega a una solución de proteína que se calienta gradualmente, lo cual provoca que la proteína se despliegue y, a medida que esto ocurre, se exponen partes hidrofóbicas con las que el fluoróforo interactúa, produciendo un aumento de la fluorescencia. La intensidad de la fluorescencia detectada se representa en función de la temperatura, generando una curva sigmoide que puede describirse mediante una transición de dos estados, siendo el punto de inflexión de la curva la temperatura de fusión (T_m),

definida como la temperatura a la cual se ha completado el 50% del proceso de desplegamiento⁵⁸. Un cambio en las condiciones en las que se encuentra la proteína (incluido el pH, la fuerza iónica y la presencia de iones, aditivos o ligandos específicos) y/o la formación de complejos con otras moléculas puede estabilizarla, lo que resulta en un aumento en la T_m . Las mediciones de la T_m de una proteína en distintas condiciones dan como resultado una estimación del cambio térmico (ΔT_m) derivado de estas diferencias (figura 16). Entre las aplicaciones de la DSF se encuentran la optimización del amortiguador en el cual se encuentra la proteína durante el almacenamiento, la evaluación en algún ensayo y para la cristalización, también se ha utilizado para la optimización de amortiguadores de replegamiento de proteínas. Además de su efecto como estabilizadores de proteínas, las interacciones proteína-ligando pueden ser de gran valor para estudios funcionales como los de especificidad.⁵⁸

Para evaluar la estabilidad térmica de la alginasa, en el presente estudio se utilizó 1 mL de la proteína a una concentración de 0.1 mg/mL en Tris-HCl 50 mM pH 7.5, a la que se le adicionó 1 μ L del fluoróforo SYPRO® Orange (una dilución 1:1000). Se colocaron 10 μ L de la proteína con el fluoróforo en cada uno de los 96 pozos de una placa (MicroAmp Fast 96-well reaction plate 0.1 mL; Applied biosystems) y después se adicionaron 10 μ L de las soluciones a evaluar dentro del kit de aditivos Additive Screen HT, Hampton Research. La placa se selló con una película ópticamente inerte (Greiner VIEWseal de Jena Bioscience), se centrifugó a 300 rpm por 2 min a 25 °C y al final se colocó en un equipo de PCR en tiempo real (Applied Biosystems StepOne) siguiendo un programa de inicio de 25 °C por 2 min, seguido del incremento de temperatura hasta 98 °C en un lapso de un minuto, para mantenerse en esa temperatura durante 15 s.

Después de obtener el gráfico de la intensidad de fluorescencia en función de la temperatura para cada condición, se determinó el intervalo de temperatura en el que ocurre la transición del estado nativo al desnaturalizado, para lo cual se utilizó el programa StepOne v2.3 (Life Technologies, USA), los datos de la transición fueron normalizados. Finalmente, se ajustaron al modelo sigmoide de Boltzmann

utilizando el programa GraphPad 8 (GraphPad Software Inc., USA) con el cual se obtuvo el punto de inflexión que corresponde al valor de T_m .

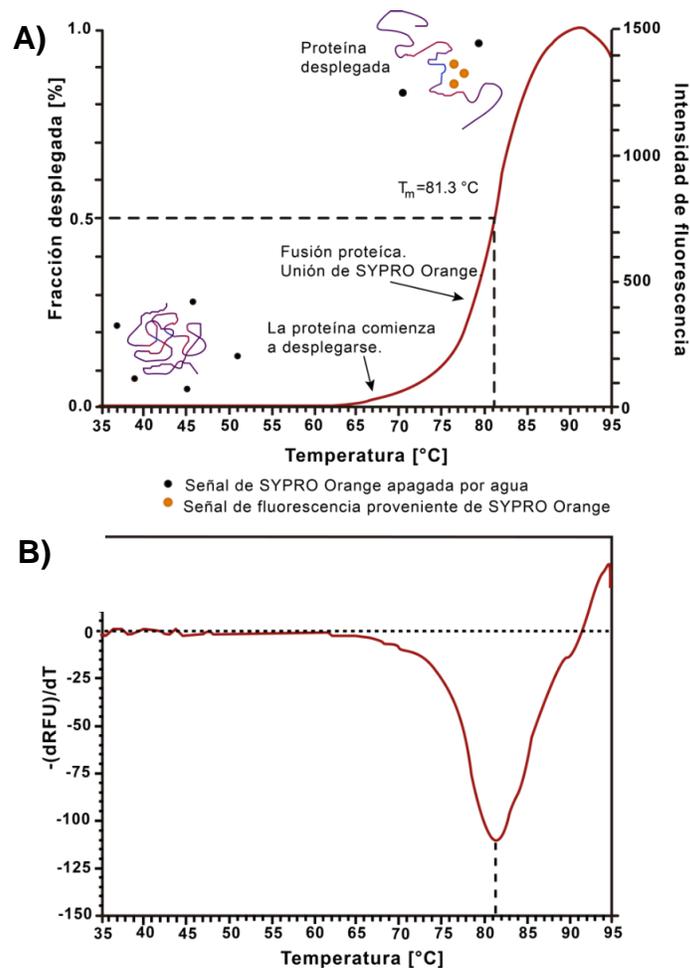


Figura 16. Representación esquemática de los fluorogramas que se obtienen en los ensayos de fluorimetría diferencial de barrido (Modificado de S. Boivin et al.⁵⁸). A) fluorograma normalizado del desplegamiento de una proteína al incrementar la temperatura en presencia del fluoróforo SYPRO Orange. En el eje Y de la derecha se observa que la señal de fluorescencia aumenta debido a que el fluoróforo se une a las regiones hidrófobas que la proteína expone en el desplegamiento de su estructura. A la mitad de la curva sigmoide (0.5%) se puede obtener la T_m de la proteína. B) representación alternativa para la curva de desnaturalización usando la primera derivada $(dRFU)/(dT)$ de los datos crudos, en este caso la T_m corresponde al mínimo.

6.9. Secuenciación de la alginasa de *H. rufescens*

Para la secuenciación de la enzima se realizó una electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12% colocando en todos los carriles a la alginasa pura. Posterior a la electroforesis, el gel se tiñó con InstanBlue™ y se trató de acuerdo con el procedimiento descrito en el kit Protease Profiler Kit (Sigma-Aldrich) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

6.9.1. Procedimiento para la digestión en gel

Después de la electroforesis, las bandas de proteína teñidas se cortaron cuidadosamente del gel, se destiñeron (NH_4HCO_3 250 mM en ACN al 50% v / v), se redujeron (TCEP 50 mM, 10 min a 60 °C), se alquilaron (Iodoacetamida 100 mM, 1 hora a 25 °C en la oscuridad), deshidrataron (ACN) y se sometieron a reacciones de escisión proteolítica. Estos últimos se realizaron con 0,4 μg de proteasa en 120 μL de NH_4HCO_3 40 mM en ACN al 9% (v / v) a 30 °C durante 20 horas. Las proteasas utilizadas se muestran en la tabla 4. Los péptidos producidos se extrajeron y se secaron al vacío. Luego se disolvieron con 10 μL de la solución de matriz y se colocaron en la placa MALDI. La matriz utilizada fue una solución saturada de α -CHCA (Sigma-Aldrich) disuelta en TFA al 0,1% (v/v) y ACN al 30% (v/v). Se utilizó un espectrómetro de masas Microflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics) y el software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics) para el registro de espectros de masas y la detección de picos. Antes de la adquisición, el espectrómetro se calibró usando una mezcla de péptidos comercial (Tubo 4: Estándar de calibración de péptidos del Starter Kit para MALDI-TOF MS, Bruker Daltonics). Los espectros se registraron en modo reflector de iones positivos. Para la identificación de proteínas se utilizó la base de datos UniProt. El análisis fue realizado usando el servidor MASCOT 2.4 (Matrix Science) instalado en un servidor local.

Tabla 4. Proteasas utilizadas para la digestión enzimática.

Proteasa	Escisión específica
Tripsina	Extremo carbonilo de residuos de lisina y arginina
Lys-C	Extremo carbonilo de los residuos de lisina.
Glu-C	Extremo carbonilo de los residuos de ácido glutámico y ácido aspártico.
Asp-N	Extremo amino de los residuos de ácido aspártico y ácido cistéico.
Arg-C	Extremo carboxilo de los residuos de arginina.

6.10. Modelado estructural

El modelo de la estructura terciaria de la alginasa se generó con base en su secuencia de aminoácidos utilizando el servidor Robetta (<https://rosetta.bakerlab.org/>)^{59,60} el cuál utiliza un método *ab initio* combinado con modelado comparativo, usando una estructura cristalográfica de referencia, seleccionada automáticamente por homología (con semejanza de secuencia superior a 20%). Una vez que las estructuras fueron generadas se utilizó el programa COOT v0.8.9.2⁶¹ para corregir cualquier error de parámetros geométricos o bien de conectividad de la cadena polipeptídica. Finalmente, estereoquímica del modelo estructural fue evaluada utilizando el programa PROCHECK.⁶² Las representaciones gráficas estructurales se realizaron con el programa UCSF Chimera v.1.15.⁶³

7. Resultados y Discusión

7.1 Purificación de la alginasa

La mayoría de las alginasas estudiadas a la fecha se han obtenido a partir de microorganismos, principalmente bacterias, siendo muy pocos los estudios de estas enzimas en invertebrados marinos. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se encontró un método eficiente para purificar alginasas contenidas en extractos del tracto digestivo de moluscos marinos que permite mantener a las enzimas estables.³ Este método se utilizó en el presente estudio para purificar una alginasa de *H. rufescens*. Observamos que la alginasa se une fuertemente al alginato y eluye con Tris-HCl 50 mM pH 8 NaCl 1.5 M (figura 17) sin embargo, una

gran cantidad de la alginasa permanece unida a las perlas después de la elución. Fue interesante notar que no consumía por completo a dichas perlas porque se inhibía por producto, por lo que se adicionó más amortiguador y se dejó incubando toda la noche para eluir por completo a la alginasa. La fracción eluída que contiene a la alginasa, también contiene una gran cantidad de alginato residual, esto se observó al realizar las pruebas de actividad en donde el blanco de muestra tenía una gran cantidad de azúcares reductores que interferían con la estimación. Esto era lógico dado que habíamos dejado que las alginasas degradaran las perlas con la consecuente liberación de azúcares como producto, lo que provocó la inhibición de la proteína. Un caso muy común de regulación de la actividad de una enzima es la inhibición por el producto final, también llamada retro inhibición o *control feedback*. En ella, el producto final de una reacción inhibe a la enzima la que recupera su actividad una vez que el producto es eliminado de la solución⁶⁴. Estos fragmentos del alginato interferían en casi todas las técnicas utilizadas en la caracterización de proteínas por lo que resultaba necesario eliminarlo. Para esto buscamos la forma de romper la interacción proteína-alginato dializando esta fracción contra una disolución de Tris-HCl 50 mM pH 5 NaCl 2 M, y de esta forma al cambiar el pH y aumentar la fuerza iónica, romper dicha interacción. Posteriormente, separamos el alginato filtrando la muestra con filtros de 0.2 μm . Este procedimiento resultó exitoso, lo que nos permitió continuar con la caracterización de la proteína. En la tabla 5 se muestran los pasos de purificación y el rendimiento, observamos que de un solo hepatopáncreas obtenemos 6 mg de proteína. Esto resulta importante ya que se han reportado purificaciones de alginasas de otras especies del género *Haliotis* en donde se utilizan de 50 a 100 organismos para extraer el hepatopáncreas, estas purificaciones se realizaron utilizando los métodos convencionales como la precipitación fraccionada con sulfato de amonio, seguida de intercambio iónico, sin embargo sus rendimientos son muy bajos.^{46,47} Utilizando las perlas de alginato logramos mantener a las alginasas estables y gracias a esto se obtuvo un buen rendimiento. Además, con un solo paso de purificación logramos obtener a la proteína.

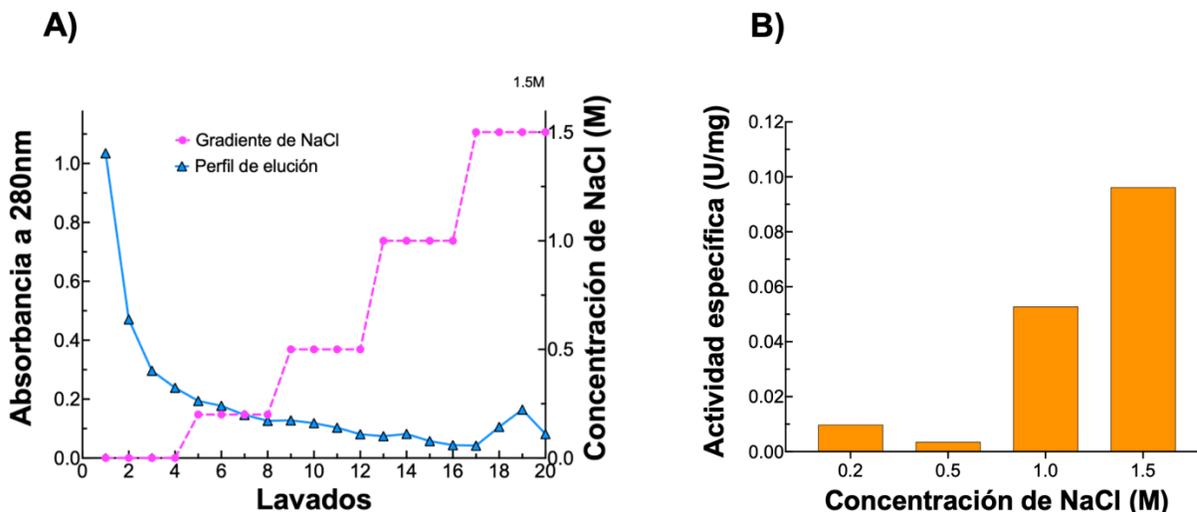


Figura 17. Purificación de la alginasa de *H. rufescens* por cromatografías de afinidad utilizando perlas de alginato. A) Perfil de elución de la alginasa de las perlas, B) Actividad de las fracciones eluidas con cada concentración de NaCl.

Tabla 5. Rendimiento de la purificación de una alginasa de *H. rufescens*. Para el cálculo se utilizó el hepatopáncreas de un organismo. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Actividad total (U) ^a	Actividad específica (U/mg) ^b	Factor de purificación	Rendimiento
Extracción	382 ± 7	7 ± 1	0.02	1	100
Cromatografía de afinidad	13 ± 0.5	2 ± 0.6	0.19	11	37
Diálisis	6 ± 1	4 ± 0.3	1 ± 0.1	36	55

^aLa actividad se definió como los μmol de ácido glucurónico liberados por minuto bajo las condiciones del experimento.

^bLa actividad específica se definió como la actividad sobre los mg de proteína.

7.2 Determinación de la pureza y de la masa molecular

Para determinar la pureza y la masa molecular de la alginasa utilizamos dos técnicas, electroforesis SDS-PAGE y espectrometría de masas. En el gel de electroforesis observamos una banda con una masa aproximada de 18 kDa. Por espectrometría de masas observamos que la masa es de 17.69 kDa (figura 18). Fue interesante notar la fuerte tendencia que tiene la proteína de oligomerizar, ya que en el espectro de masas se puede observar la presencia del dímero y del trímero.

Esta alginasa presenta una de las masas más pequeñas reportadas para este tipo de enzimas; se han reportado alginasas desde 24 kDa en microorganismos como *Pseudomonas alginovora*⁶⁵ y *Azotobacter chroococcum*⁶⁶ hasta una alginasa de 110 kDa proveniente de *Alginovibrio aquailis*.⁶⁷ En moluscos marinos con una dieta similar a la del *H. rufescens*, se han encontrado alginasas con masas mayores, como la HdAlex de *Haliotis discus hannai* con una masa de 32 kDa,⁴⁶ HiAly de *Haliotis iris* con una masa de 34 kDa⁴¹ y OrAly de *Orcunectes rusticus* con masa de 34 kDa.⁴¹

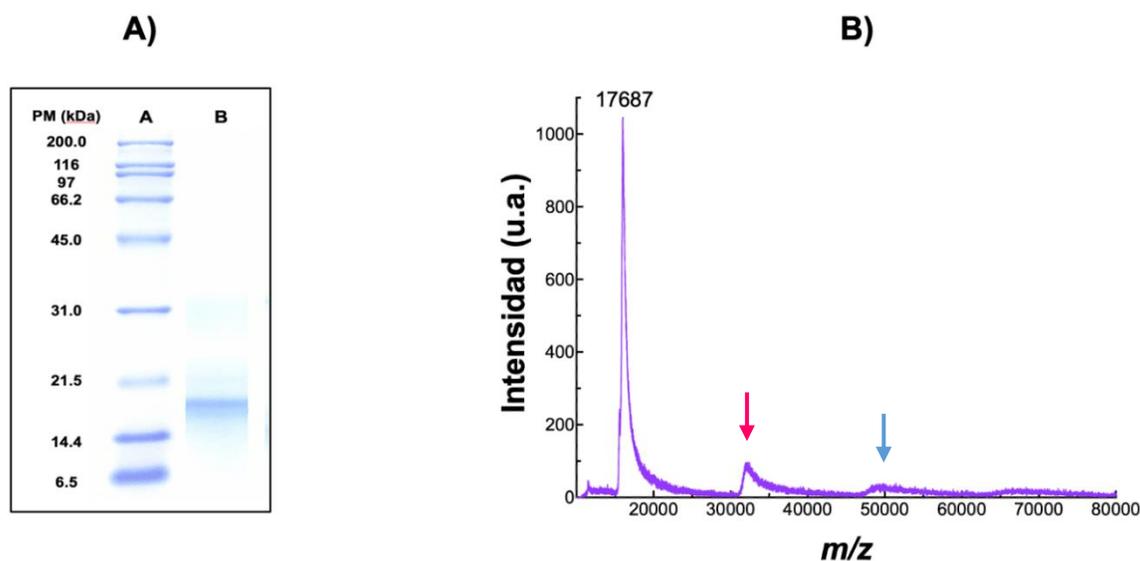


Figura 18. Pureza y masa molecular de la alginasa de *H. rufescens*. A) Gel de poliacrilamida al 12%. El carril A corresponde a los marcadores de masa molecular conocida. El carril B corresponde a la alginasa. B) Espectro de masas MALDI-TOF de la alginato liasa de *H. rufescens*; la flecha rosa indica el dímero y la flecha azul al trímero de la enzima.

7.3. Máximos de actividad alginolítica

7.3.1 Máximo de actividad en función de pH

Con el fin de poder utilizar un solo amortiguador y evitar el efecto de las sales de los amortiguadores en la actividad de la enzima, utilizamos el amortiguador universal, Britton-Robinson que amortigua en un amplio intervalo de valores de pH (2-12). Se pudo observar una mayor actividad alginolítica en el intervalo de pH 7.5 y 8.0, siendo el máximo en 7.5 como se observa en la figura 19. Este resultado concuerda con los máximos reportados para alginasas parcialmente purificadas de otros invertebrados como *Haliotis discus hannai*⁴⁶, *Haliotis iris*⁴¹, *Orconectes rusticus*⁴¹, *Littorina brevicula*⁴¹ y *Dolabella auricula*⁴⁰, cuyos pHs óptimos para su actividad son 8, 9, 8.5, 7.5 y 7, respectivamente. Incluso alginasas purificadas a partir de microorganismos presentan óptimos similares como la OalS6 de *Shewanella*²³ con un óptimo de pH 7 o la AlyMG de *Stenotrophomas maltophilia*²¹ con un máximo en pH 8, por mencionar algunas.

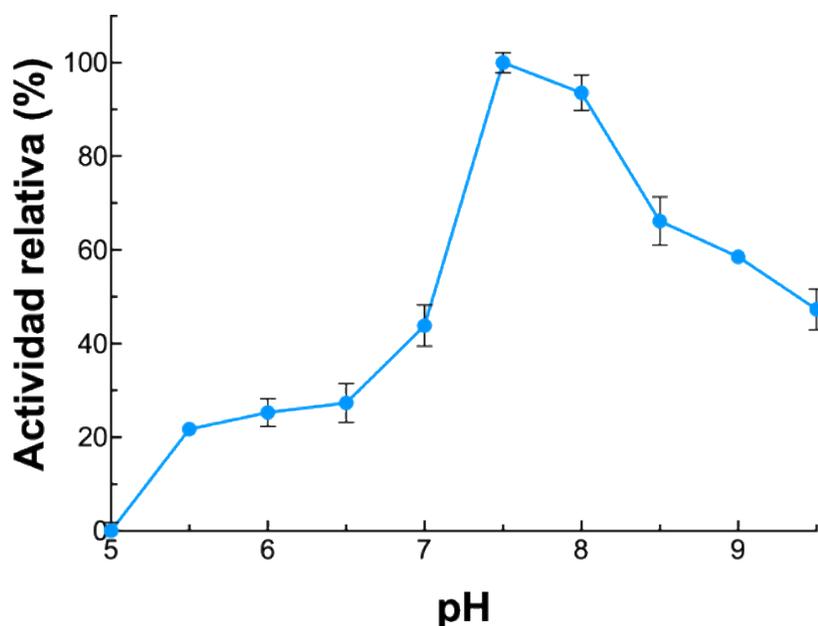


Figura 19. Efecto del pH sobre la actividad alginolítica de la enzima purificada de *H. rufescens*.

7.3.2 Máximo de actividad en función de la temperatura

Se determinó que la actividad de la alginasa se mantiene en un amplio intervalo de temperaturas, a 4°C la proteína mantiene más del 70% de su actividad y a 80 °C mantiene casi el 90%; siendo su óptimo a 70°C (figura 20). A estas enzimas que presentan actividad entre los 50°C y 70°C, aproximadamente, se les denomina como enzimas termofílicas.⁶⁸ La mayoría de las alginasas reportadas a la fecha tienen máximos de actividad de temperatura entre 30°C y 50°C, a excepción de la alginasa de *Pseudomonas* que presenta un óptimo de 70°C³⁸, pero ninguna alginasa reportada presenta actividad en un intervalo tan amplio de temperaturas. El intervalo de temperatura en el cual la alginasa de *H. rufescens* presenta actividad puede presentar ventajas para su utilización en diferentes sectores industriales. Estudios sugieren que la resistencia a altas temperaturas que presentan algunas enzimas puede deberse a la presencia de azúcares que favorecen interacciones que aumentan la estabilidad en la estructura, también puede haber estabilidad generada a partir de procesos de oligomerización que protegen zonas lábiles dentro de la enzima.⁶⁸⁻⁷⁰

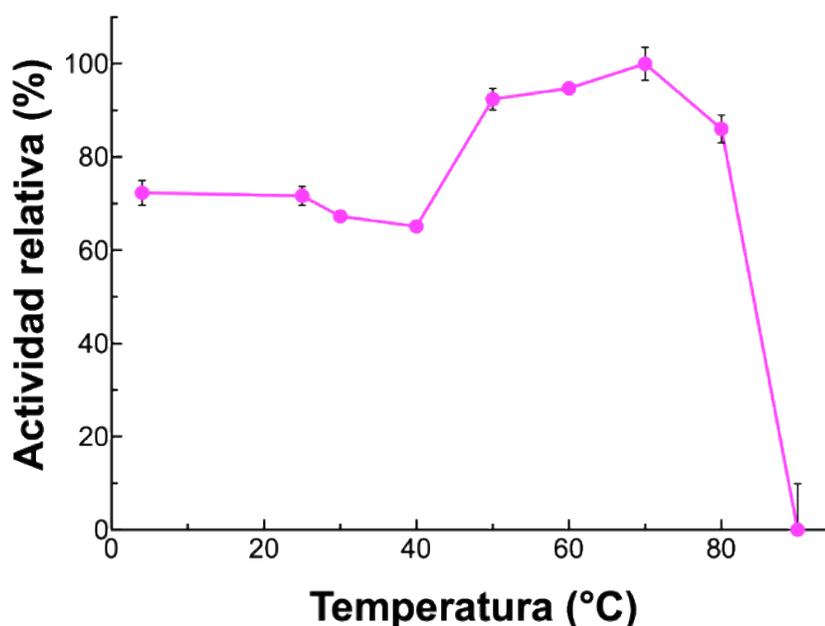


Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la actividad alginolítica de la enzima purificada de *H. rufescens*.

7.4 Estabilidad de la alginasa de *H. rufescens*

Durante los estudios de estabilidad utilizando la termofluorescencia, observamos que la alginasa es muy estable en un amortiguador de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 NaCl 150 mM, ya que en todo el intervalo de temperaturas evaluado no se observó una señal de fluorescencia, lo que implica que la enzima no se desplegó para poder interactuar con el fluoróforo. Esto es acorde a los ensayos para determinar el máximo de actividad en función de la temperatura, sin embargo, hubiera sido interesante analizar la estabilidad de la enzima incubándola a cada una de las temperaturas evaluadas (figura 20), después tomar una alícuota a diferentes tiempos y medir la actividad residual para graficarla; ajustar la gráfica a un decaimiento exponencial para determinar las constantes aparentes de desnaturalización.

De los 96 aditivos evaluados solo 8 presentan señal de fluorescencia en el intervalo de temperatura aplicado; de este conjunto destacan la sacarosa y el cloruro de manganeso que tienen una T_m mayor con respecto a los otros aditivos (figura 21). Lo más probable es que estos aditivos solubilizan a la enzima (evitan la oligomerización), ya que como se observó en el espectro de masas, la enzima tiende a formar oligómeros. Debido a la oligomerización algunas proteínas pueden tener algunas ventajas funcionales como, estabilizar su estructura, regular o incrementar su actividad y resistencia a la desnaturalización la concentración, el pH y la temperatura del entorno en el que se encuentre la enzima pueden influir en el proceso de oligomerización.^{71,72}

Para poder corroborar el estado oligomérico de la alginasa de *H. rufescens* se requieren hacer estudios de dispersión dinámica de la luz, y también, observar la influencia de los aditivos antes mencionados sobre ese estado.

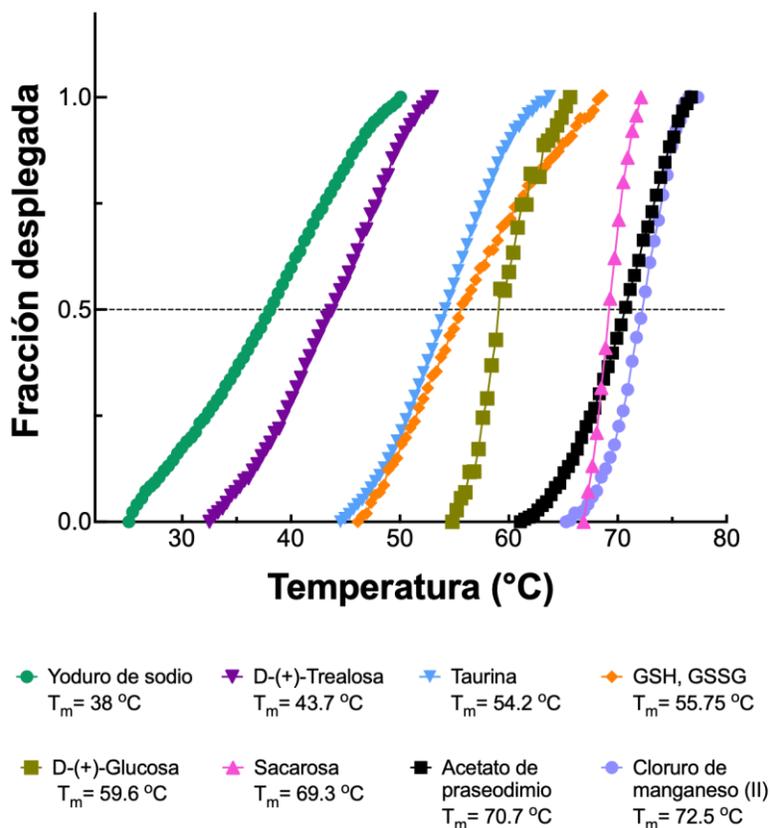


Figura 21. Estabilidad térmica estructural de la alginasa pura utilizando los reactivos del kit de Additive Screen™, Hampton Research.

7.5. Estudios de dicroísmo circular de la alginasa de *H. rufescens*

Los estudios de dicroísmo circular en el UV lejano mostraron que la alginasa presenta un espectro con un solo mínimo negativo alrededor de 216 nm que indica la predominancia de hebras beta en su estructura (figura 22A), como se corrobora al estimar el contenido de estructura secundaria con el servidor BestSel (tabla 6). Con el fin de reafirmar la estabilidad estructural de la alginasa, que los ensayos de termofluorescencia nos habían indicado decidimos realizar un barrido de temperatura de 20°C a 80°C manteniendo fija la longitud de onda en 216 nm (figura 22B). En ninguno de los barridos se observa algún un cambió en la estructura, para verificar esto, se volvió a correr un espectro en el UV lejano con la muestra después de calentar. En efecto, la alginasa no sufre ningún cambio significativo en su estructura secundaria después de calentar. Una señal muy interesante se observó

cerca de 245 nm, donde generalmente la señal es de 0. Se ha determinado que generalmente esta señal indica que en la proteína existen interacciones π - π o que coordina iones.

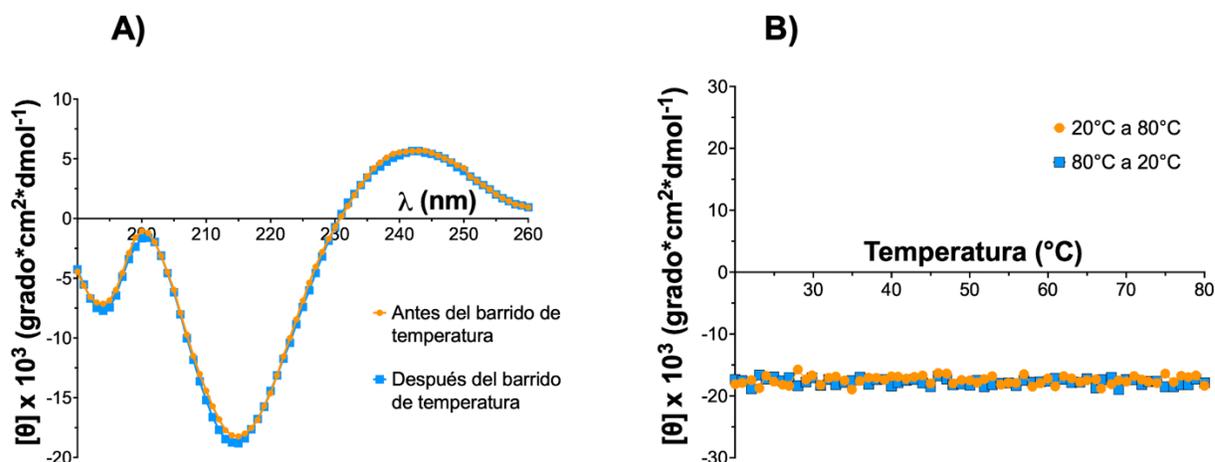


Figura 22. Espectros de dicroísmo circular de la alginasa purificada. A) Espectro en el UV lejano de la alginasa antes y después del tratamiento térmico, donde se observa el predominio de hebras beta en la estructura. B) Barrido de temperatura manteniendo fija la longitud de onda de 216 nm.

Tabla 6. Contenido de estructura secundaria de la alginasa de *H. rufescens*.

Tipo de Estructura	Contenido de estructura secundaria (%)
Hélice	4.0
Hebra beta antiparalela	31.2
Hebra beta paralela	27.7
Giro	0
Otro	37.1

Con el fin de evaluar el efecto de iones como el Zn^{2+} y el Ca^{2+} en la estructura de esta alginasa se le agregó a la proteína una disolución de $ZnSO_4$ 5 mM y $CaCl_2$ 5 mM, se corrió el espectro en el UV lejano observando que los espectros no cambiaban (figura 23). Es probable que se hubiera observado una diferencia notable

en la estructura si hubiéramos pasado la alginasa por una resina quelante para eliminar los iones que ya tenía unidos antes de realizar este ensayo.

Algunas alginasas con las que se encontró similitud en la estructura son la ALY-1 de *Corynebacterium* sp de la familia PL 7,⁷³ PA1167 de *Pseudomona aeruginosa* también de la familia 7⁷⁴ y con AkAly30 de *Aplysia kurodai* perteneciente a la familia PL 14.³⁹ Esta última es la única alginasa que se ha caracterizado estructuralmente que proviene de un organismo marino.

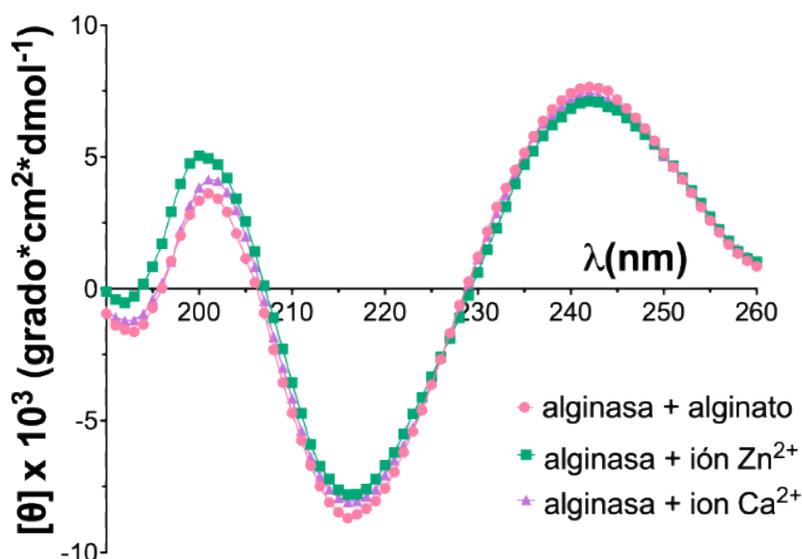


Figura 23. Espectro de dicroísmo circular de la alginasa purificada en presencia de alginato y de los iones Zn^{2+} y Ca^{2+} .

7.6 Secuencia de la alginasa de *H. rufescens*

El análisis de la secuencia de la alginasa reveló que la cadena polipeptídica consta de 150 aminoácidos con un punto isoeléctrico de 8.36 y una masa calculada de 16.8 kDa (figura 24) que es menor a la obtenida por electroforesis y MALDI-TOF. Es posible que la alginasa tenga alguna modificación postraduccional. Otras enzimas purificadas de estos organismos han mostrado estar glicosiladas; se requieren más estudios para poder saber qué tipo de modificación está presente en esta alginasa. Al realizar un análisis de la secuencia con el servidor BLAST observamos que corresponde a la alginato liasa 2 de *H. rufescens* con un número de acceso AFX62892.1 y del servidor UniProt de K7WSC9. Esta tiene una identidad del 88%

con una alginasa de *Haliotis tuberculata* (AFQ98374.1) y del 87.3% con una alginasa de *Haliotis gigantea* (AFQ98373.1) y de *Haliotis discus discus* (AKK25357.1). Sin embargo, no existe ningún estudio estructural de ninguna de ellas. Realizando otro análisis con el servidor BLAST, considerando aquellas proteínas que tengan una estructura reportada en el PDB encontramos solo dos estructuras, una alginato liasa PL 14 de *Aplysia kurodai*³⁹ con 44.67% de identidad (código PDB 5GMT) y una del virus *Chlorella*⁷⁵ con 36% de identidad (código PDB 3A0N).

10	20	30	40	50	60
MHALTSNDYD	HGSGSVVTD	AGGSNHVLKV	WYEKGRYSSH	GPNEGVOFFA	TPTSSRTVMT
70	80	90	100	110	120
FSYDLYFDKN	FDLRRGGKLP	GLFGGWTNCS	GGRHSDNCF	TRFMWRADGD	GEVYGYIPDS
130	140	150			
HHQVSGYCDH	AVCNSVKGYS	MGRGNWRFKR			

Figura 24. Secuencia de aminoácidos de la alginasa de *H. rufescens* obtenida por digestión con enzimas proteolíticas y el posterior análisis de los péptidos por espectrometría de masas y el servidor MASCOT.

7.7 Modelado molecular

Con la secuencia obtenida se construyó un modelo de la estructura terciaria utilizando el servidor Robetta (figura 25). Este servidor utilizó como plantilla a la alginasa de *Aplysia kurodai* (código PDB, 5GMT) que pertenece a la familia 14 de las polisacárido liasas. El modelo coincide con los resultados obtenidos con el dicroísmo circular (figura 22) en el que se observa el predominio de la hebra beta. Al igual que en la alginasa de *A. kurodai*,³⁹ presenta un plegamiento de rollo beta (β -jelly roll) en el centro de la estructura y dos puentes disulfuro.

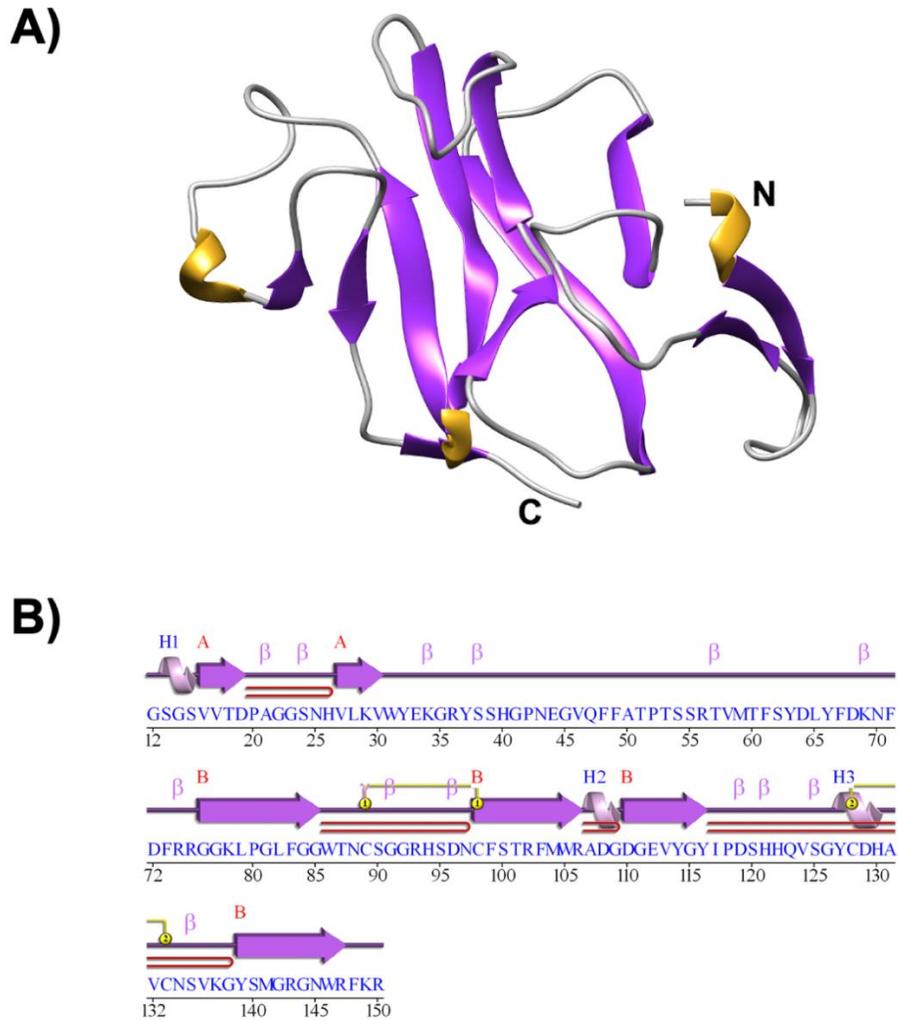


Figura 25. Modelo de la estructura terciaria de la alginasa de *H. rufescens* obtenido con el servidor Robetta. A) Modelo estructural donde se observa el predominio de la hebra beta. B) representación esquemática del contenido de estructura secundaria de la alginasa. Las laminas beta están representadas por la flecha de color morado, las hélices están marcadas con una H, β y γ y representan los giros, la línea de color rojo indica horquillas beta y los puntos amarillos señalan la unión de los puentes disulfuro.

En el centro de la estructura de la alginasa de *H. rufescens* se observan Y140, Y124 y K99 que son los residuos catalíticos en el sitio activo. En las alginasas con estructuras de tipo β -Jelly roll estos aminoácidos se conservan como podemos

observar en la estructura de la alginasa de *A. kurodai* (figura 26). La alginasa de *A. kurodai* es más grande con 279 aminoácidos y una masa de 31.12 kDa contra 150 aminoácidos de *H. rufescens* y una masa de 16.8 kDa. es por esto que *A. kurodai* puede formar dos hojas beta contra una de *H. rufescens*.

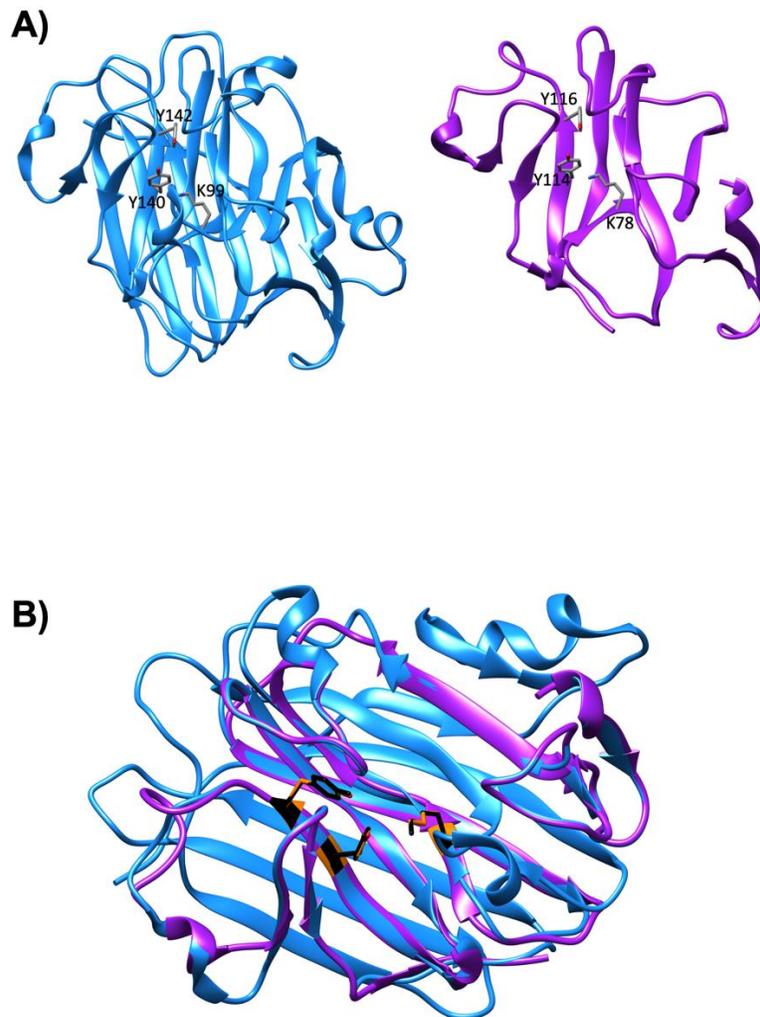


Figura 26. Comparación de la alginasa de *H. rufescens* con la de *A. kurodai* (código PDB 5GMT) A) Izquierda estructura de la alginasa de *A. kurodai* con los residuos catalíticos Y140, Y142 y K99 en barras. A la derecha la estructura de *H. rufescens* con los residuos catalíticos Y114, Y116 y K78 en barras. B) Superposición de ambas estructuras.

8. CONCLUSIONES

La alginasa de *H. rufescens* es la enzima de su clase con menor masa molecular de entre las reportadas a la fecha.

El valor de pH al que tiene su máxima actividad alginolítica es parecido al reportado para otras alginasas provenientes de moluscos marinos, en cambio, el intervalo de temperaturas al que esta alginasa presenta actividad no se había observado antes, por lo que se puede considerar como una enzima termofílica.

La masa calculada para la secuencia de aminoácidos es menor a la obtenida por espectrometría de masas, por lo que es posible que tenga algún tipo de modificación postraduccional.

El modelo estructural muestra la predominancia de hebras β , que es congruente con los estudios de dicroísmo circular en el UV lejano, formando un plegamiento tipo β -Jelly roll, que es característico de la familia 14 de las polisacadoliasas, en la que un par de tirosinas fungen como ácido y base para llevar a cabo el mecanismo de eliminación β .

9. REFERENCIAS

1. K. Y. Lee, D. J. Mooney, Alginate: Properties and biomedical applications, *Progress in Polymer Science*. 37, (2012) 106–126.
2. Q. Lyu, K. Zhang, Q. Zhu, Z. Li, Y. Liu, E. Fitzek, T. Yohe, L. Zhao, W. Li, T. Liu, Y. Yin, W. Liu, Structural and biochemical characterization of a multidomain alginate lyase reveals a novel role of CBM32 in CAZymes. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 1862 (2018) 1862–1869.
3. R. González Gatica, Caracterización fisicoquímica y estructural de las alginasas de *Astraea undosa*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México (2004).
4. K. Murata, T. Inose, T. Hisano, S. Abe, Y. Yonemot, T. Yamashita, M. Takagi, K. Sakaguchi, A. Kimura, T. Imanaka, Bacterial alginate lyase: enzymology, genetics and applications, *The Journal of Fermentation and Bioengineering*. 76 (1993) 427–437.
5. K. I. Draget, Alginates. *Handbook of Hydrocolloids*. Second Edition (2009) 807-828.
6. P. Gacesa, Alginates. *Carbohydrate Polymers*. 8 (1988) 161-182.
7. H. Liao, W. Ai, K. Zhang, M. Nakauma, T. Funami, Y. Fang, K. Nishinari, K. I. Draget, G. O. Phillips, Mechanisms of oligoguluronate modulating the calcium-induced gelation of alginate. *Polymer*. 74 (2015) 166–175.
8. A. Rees, R. Morris, D. Thom, Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific, primary dimerisation process in alginate gelation. *Carbohydrate Research*. 66 (1978) 145–154.
9. G. Berth, Methodical aspects of characterization of alginate and pectate by light scattering and viscometry coupled with GPC. *Carbohydrate Polymers*. 19 (1992) 1–9.
10. T. Y Wong, L. A. Preston, N. L. Schiller, Alginate Lyase: Review of Major Sources and Enzyme Characteristics, Structure-Function Analysis, Biological Roles, and Applications. *Annual Review Microbiology*. 54 (2000) 289–340.

- 11.A. Inoue, Characterization of PL-7 family alginate lyases from marine organisms and their applications. *Methods in Enzymology* 605 (2018) 499-524.
- 12.B. Zhu, H. Yin, Alginate lyase: Review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications, *Bioengineered* 6 (2015) 125–131.
- 13.M. L. Garron, M. Cygler, Structural and mechanistic classification of uronic acid-containing polysaccharide lyases, *Glycobiology*, 20 (2010) 1547–1573.
- 14.M. P. Kötzler, S. M. Hancock, S. G. Withers, Glycosidases: functions, families and folds, *eLS Encyclopedia of Life Sciences*, (2014) 1–13.
- 15.F. Dong, F. Xu, X.L. Chen, P.Y. Li, C.Y. Li, F. ChuanLi, Y. Chen, P. Wang, Y. Z. Zhang, Alginate lyase Aly36B is a new bacterial member of the polysaccharide lyase family 36 and catalyzes by a novel mechanism with lysine as both the catalytic base and catalytic acid, *Journal of Molecular Biology*, 431 (2019) 4897–4909.
- 16.V. Lombard, T. Bernard, C. Rancurel, H. Brumer, P. Coutinho, B. Henrissat, A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycogenomics, *Biochemical Journal* 432 (2010) 437–444.
- 17.H. S. Kim, C. G. Lee, E. Y. Lee, Alginate lyase: Structure, property, and application, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16 (2011) 843–851.
- 18.G. Michel, K. Pojasek, Y. Li, T. Sulea, R. Linhardt, R. Raman, V. Prabhakar, R. Sasisekharan, M. Cygler, The structure of chondroitin B lyase complexed with glycosaminoglycan oligosaccharides unravels a calcium-dependent catalytic machinery, *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (2004) 32882–32896.
- 19.S. I. Lee, S. H. Choi, E. Y. Lee, H. S. Kim, Molecular cloning , purification , and characterization of a novel polyMG-specific alginate lyase responsible for alginate MG block degradation in *Stenotrophomas maltophilia* KJ-2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95 (2012) 1643–1653.
- 20.H. Maki, A. Mori, S. Kinoshitaj, T. Yoshida, Cloning, sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of a gene encoding an alginate lyase from

- Pseudomonas* sp. from OS-ALG-9, *Journal of General Microbiology*, 139 (1993) 987–993.
21. S. Li, L. Wang, F. Han, Q. Gong, Cloning and characterization of the first polysaccharide lyase family 6 oligoalginate lyase from marine *Shewanella* sp. Kz7, *The Journal of Biochemistry*, 159 (2015) 77–86.
 22. F. Xu, F. Dong, P. Wang, H. Cao, C. Li, P. Li, X. Pang, Y. Zhang, X. Chen, Novel molecular insights into the catalytic mechanism of marine bacterial alginate lyase AlyGC from polysaccharide lyase family 6, *The Journal of Biological Chemistry*, (2017) 2-24.
 23. Q. Lyu, K. Zhang, Y. Shi, W. Li, X. Diao, W. Liu, Structural insights into a novel Ca^{2+} -independent PL-6 alginate lyase from *Vibrio* OU02 identify the possible subsites responsible for product distribution, *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1863 (2019) 1167–1176.
 24. R.J. Mrsny, B.A. Lazazzera, A.L. Daugherty, N.L. Schiller, T.W. Patapoff, Addition of a bacterial alginate lyase to purulent CF sputum *in vitro* can result in the disruption of alginate and modification of sputum viscoelasticity. *Pulmonary Pharmacology* 7 (1994) 357–366.
 25. R. J. Mrsny, A. Daugherty, S. Short, R. Widmer, M. Siegel, G. Keller, Distribution of DNA and alginate in purulent cystic fibrosis sputum: Implications to pulmonary targeting strategies, *Journal of Drug Targeting*, 4 (1996) 233–243.
 26. N. Ishibashi, T. Yaeshima H. Hayasawa, Bifidobacteria: their significance in human intestinal health, *Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology*, Second Edition, (1997) 741–748.
 27. H. Akiyama, T. Endo, R. Nakakita, K. Murata, Y. Yonemoto, K. Okayama, Effect of depolymerized alginates on the growth of bifidobacteria, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56 (1992) 355–356.
 28. A. Kawada, N. Hiura, M. Shiraiwa, S. Tajima, M. Hiruma, K. Hara, A. Ishibashi, H. Takahara, Stimulation of human keratinocyte growth by alginate oligosaccharides, a possible co-factor for epidermal growth factor in cell culture, *FEBS Letters*, 408 (1997) 43–46.

- 29.A. Inoue, Characterization of PL-7 family alginate lyases from marine organisms and their applications, *Methods in Enzymology*, 605 (2018).
- 30.L. L. Beer, E. S. Boyd, J. W. Peters, M. C. Posewitz, Engineering algae for biohydrogen and biofuel production, *Current Opinion in Biotechnology*, 20 (2009) 264–271.
- 31.A. J. Wargacki, E. Leonard, M. Nyan Win, D.D. Regitsky, C. N. Santos, P. Kim, S. Cooper, R. Raisner, A. Herman, A. Sivitz, A. Lakshmanaswamy, Y. Kashiyama, D. Baker, Y. Yoshikuni, An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae, *Science*, 335 (2012) 308–313.
- 32.N. Wei, J. Quarterman, Y. S. Jin, Marine macroalgae: An untapped resource for producing fuels and chemicals, *Trends Biotechnology*, 31 (2013) 70–77.
- 33.R. P. John, G. S. Anisha, K. M. Nampoothiri, A. Pandey, Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol, *Bioresource Technology*, 102 (2011) 186–193.
- 34.INAPESCA, Instituto Nacional de Pesca. Abulón Rojo. Diario Oficial de la Nación. Segunda Sección, (2013) 5–8.
- 35.M. Hernán, Los Abulones de México. Instituto Nacional de Ecología, (1987) 9-21.
- 36.M. Casas, G. Ponce, Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur, Secretaría del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca, Gobierno del Estado de Baja California Sur, (1996) 15-43.
- 37.J. Preiss, G. Ashwell, Alginic Acid Metabolism in Bacteria, *The Journal of Biological Chemistry*, 237 (1962) 309-316.
- 38.H. J. Yoon, B. Mikami, W. Hashimoto, K. Murata, Crystal structure of alginate lyase A1-III from *Sphingomonas* species A1 at 1.78 Å resolution, *Journal of Molecular Biology*, 290 (1999) 505–514.
- 39.H. M. Qin, T. Miyakawa, A. Inoue, R. Nishiyama, A. Nakamura, A. Asano, Y. Sawano, T. Ojima, M. Tanokura, Structure and polymannuronate specificity of a eukaryotic member of polysaccharide lyase family 14, *The Journal of Biological Chemistry*, 292 (2017) 2182-2190.

40. K. Nisizawa, S. Fujibayashi, Y. Kashiwabara, Alginate lyases in the hepatopancreas of a marine mollusc *Dolabella auricula* Solander, *The Journal of Biochemistry*, 64 (1968) 25–37.
41. M. Hata, Y. Kumagai, M. Rahman, S. Chiba, H. Tanaka, A. Inoue, T. Ojima, Comparative study on general properties of alginate lyases from some marine gastropod mollusks, *Fisheries Science*, 75 (2009) 755–763.
42. M. M. Rahman, A. Inoue, H. Tanaka, T. Ojima, Isolation and characterization of two alginate lyase isozymes, AkAly28 and AkAly33, from the common sea hare *Aplysia kurodai*, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 157 (2010) 317–325.
43. T. Muramatsu, S. Hirose, M. Katayose, Isolation and properties of alginate lyase from the mid-gut gland of wreath shell *turbo cornutus*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 41 (1977) 1939–1946.
44. H. I. Nakada, P. C. Sweeny, Alginate degradation by eliminases from abalone hepatopancreas, *The Journal of Biological Chemistry*, 242 (1967) 845–85.
45. E. Shimizu, T. Ojima, K. Nishita, cDNA cloning of an alginate lyase from abalone, *Haliotis discus hannai*, *Carbohydrate Research*, 338 (2003) 2841–2852.
46. H., Suzuki, K. Suzuki, A. Inoue, T. Ojima, A novel oligoalginate lyase from abalone, *Haliotis discus hannai*, that releases disaccharide from alginate polymer in an exolytic manner, *Carbohydrate Research*, 341 (2006) 1809–1819.
47. C. Boyen, B. Kloareg, M. Polne-Fuller, A. Gibor, Preparation of alginate lyases from marine molluscs for protoplast isolation in brown algae, *Phycologia*, 29 (1990) 173–181.
48. R. S. S. Teixeira, A. S. A. Da Silva, V. S. Ferreira-Leitão, E. P. Da Silva Bon, Amino acids interference on the quantification of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements, *Carbohydrate Research*, 363 (2012) 33–37.

49. P. K. Smith, R.I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goetze, B.J. Olson, D. C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical Biochemistry*, 150 (1985) 76–85.
50. J. L. Brunelle, R. Green, One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods in Enzymology*, 541 (2014) 151-159.
51. D. E. Garfin, One-dimensional gel electrophoresis, *Methods in Enzymology*, 463 (2009) 497–513.
52. A. E. Clark, E. J. Kaleta, A. Arora, D. M. Wolk, Matrix-Assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology, *Clinical Microbiology Reviews*, 26 (2013) 547–603.
53. J. E. Reynolds, M. Josowicz, P. Tyler, R. B. Vegh, K. M. Solntsev, Spectral and redox properties of the GFP synthetic chromophores as a function of pH in buffered media, *Chemical Communications*, 49 (2013) 7788–7790.
54. N. Neumann, G. Snatzke, Circular dichroism of proteins. In *Proteins: Form and Function*. R. A. Bradshaw and M. Purton, eds (Cambridge: Elsevier Trends Journals) (1990) 107-116.
55. S. M. Kelly, N. C. Price, The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1338 (1997) 161–185.
56. A. Micsonai, F. Wien, É. Bulyáki, J. Kun, É. Moussong, Y. H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, J. Kardos, BeStSel: A web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra, *Nucleic Acids Res*, 46 (2018) 315–322.
57. F. H. Niesen, H. Berglund, M. Vedadi, The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability, *Nature*, 2 (2007) 2212–222.

58. S. Boivin, S. Kozak, R. Meijers, Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens, *Protein Expression and Purification*, 91 (2013) 192–206.
59. S. Raman, R. Vernon, J. Thompson, M. Tyka, R. Sadreyev, J. Pei, D. Kim, E. Kellogg, F. DiMaio, O. Lange, L. Kinch, W. Sheffler, B.H. Kim, R. Das, N.V. Grishin, D. Baker, Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta Proteins. 77 (2009) 89-99.
60. Y.F. Song, F. DiMaio, R.Y.R. Wang, D. Kim, C. Miles, T.J. Brunette, J. Thompson, D. Baker, High-resolution comparative modeling with RosettaCM. *Structure*, 21 (2013) 1735-42.
61. P. Emsley, B. Lohkamp, W.G. Scottc, K. Cowtand, Features and development of Coot, *Acta Cryst*, D66 (2010) 486–501.
62. R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss, J. M. Thornton, PROCHECK a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. App. Cryst.*, 26 (1993) 283-291.
63. E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E Ferrin, UCSF Chimera- a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 25 (2004) 1605-12.
64. S. Takahashi, P.M. Pryciak, Membrane localization of scaffold proteins promotes graded signaling in the yeast MAP kinase cascade. *Curr Biol*. 18 (2008) 1184-91.
65. F. Chavagnat, C. Duez, M. Guinand, P. Potin, T. Barbeyron, B. Henrissat, J. Wallach, J. Ghuysen Cloning, sequencing and overexpression in *Escherichia coli* of the alginate-lyase-encoding *aly* gene of *Pseudomonas alginovora*: identification of three classes of alginate lyases, *Journal of Biochemistry*, 319 (1996) 575–583.
66. K. Kodama, T. Haraguchi, Purification and properties of poly (β -D-mannuronate) lyase from *Azotobacter chroococcum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44 (1996) 576–581.

67. R. A. Stevens, R. E. Levin, Purification and characteristics of an alginase from *Algino vibrio aquatilis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 3 (1977) 1156–116.
68. C. J. Reed, H. Lewis, E. Trejo, V. Winston, C. Evilia, Protein adaptations in archaeal extremophiles, *Archaea*, 2013 (2013) 2-14
69. D. C. Demirjian, F. Morís-Varas, C. S. Cassidy, Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5 (2001) 144–151.
70. R. J. Solá, K. Griebenow, Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98 (2009) 1223–1243.
71. M. H. Ali, B. Imperiali, Protein oligomerization: how and why, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13 (2005) 5013-5020.
72. J. M. Matthews, M. Sunde, Dimer, oligomers, everywhere, *Protein dimerization and oligomerization in biology*, (2012) 1-18.
73. T. Osawa, Y. Matsubara, T. Muramatsu, M. Kimura, Y. Kakuta, Crystal structure of the alginate (Poly α -L-guluronate) lyase from *Corynebacterium* sp. at 1.2 Å resolution, *Journal of Molecular Biology*, 345 (2005) 1111–1118.
74. M. Yamasaki, S. Moriwaki, O. Miyake, W. Hashimoto, K. Murata, B. Mikami, Structure and function of a hypothetical *Pseudomonas aeruginosa* protein PA1167 classified into family PL-7: A novel alginate lyase with a β -sandwich fold, *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (2004) 31863–31872.
75. K. Ogura, M. Yamasaki, T. Yamada, B. Mikami, W. Hashimoto, K. Murata, Crystal structure of family 14 polysaccharide lyase with pH-dependent modes of action, *The Journal of Biological Chemistry*, 284 (2009) 35572–35579.