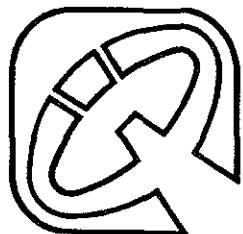


11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO



INSTITUTO DE QUIMICA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

13

**Caracterización fisicoquímica y estructural de  
glicohidrolasas del abulón azul, *Haliotis fulgens***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

PRESENTA

Alejandra Hernández Santoyo

Directora de tesis: Dra. Adela Rodríguez Romero



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

# DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

## INSTITUTO DE QUÍMICA


pdcb/grad/035Jur/2000

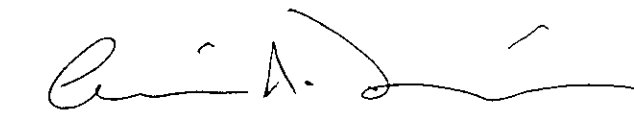
**ING. LEOPOLDO SILVA**  
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN  
ESCOLAR DE LA UNAM  
PRESENTE

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité Académico del Doctorado en Ciencias Biomédicas que se llevó a cabo el día 17 de octubre del presente año, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la M. en C. ALEJANDRA HERNÁNDEZ SANTOYO, con número de expediente 89972002 y número de cuenta 97843027, con la tesis titulada "Caracterización fisicoquímica y estructural de glicohidrolasas del abulón azul *Haliotis fulgens*", dirigida por la Dra. Adela Rodríguez Romero.

PRESIDENTE:	DRA. MARIETTA TUENA
SECRETARIO:	DRA. ADELA RODRÍGUEZ
VOCAL:	DR. EDUARDO HORJALES
VOCAL:	DR. ARTURO ROJO
VOCAL:	DR. DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ
SUPLENTE:	DR. EDGAR ZENTENO
SUPLENTE:	DRA. ROSARIO MUÑOZ

Atentamente,  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria D.F., a 23 de octubre de 2000

  
Dra. Adela Rodríguez Romero  
Responsable  
Instituto de Química

  
Dr. César A. Domínguez Pérez Tejeda  
Coordinador  
Doctorado en Ciencias Biomédicas

c.c.p. Biól. Francisco Javier Incera, Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado  
Coordinación del Doctorado

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Adela Rodríguez Romero, en el laboratorio de Bioquímica del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mis padres y hermanos, por estar siempre cerca cuando los he necesitado, por todo el apoyo que me han dado y por ser como son.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios doctorales (registro 80518), y a la DGEP por los apoyos otorgados.

Mi mas sincero agradecimiento a la Dra Adela Rodríguez Romero por compartir conmigo sus conocimientos, por el apoyo que siempre me brindó y por la dirección tan entusiasta del presente trabajo. Fue un gran honor el haber trabajado bajo su dirección.

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial: Dr. Abel Moreno Cárcamo, Dra. Adela Rodríguez Romero y Dr. Eduardo Horjales Reboredo, por las valiosas aportaciones que fueron enriqueciendo el presente trabajo.

Agradezco a los miembros del jurado que con sus valiosas observaciones enriquecieron esta tesis.

Al Instituto Nacional de la Pesca (INP) y al Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP) de la Paz, B.C. por proporcionarme los abulones con los que se trabajó en esta tesis.

A mi familia, por todo el apoyo que siempre me han brindado, cada uno muy a su manera, GRACIAS.

A mis compañeros del laboratorio de Bioquímica del Instituto de Química de la UNAM, por hacer de las horas de laboratorio, momentos muy agradables.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron para que este trabajo pudiera realizarse.

## RESUMEN

Se purificaron y caracterizaron 7 glicohidrolasas del hepatopáncreas del abulón azul; tres de ellas mostraron actividad celulolítica, dos alginolítica y dos agarolítica. Estas fueron denominadas Cel I, Cel II, Cel III, Alg I, Alg II, Ag I y Ag II, respectivamente. Todas son proteínas ácidas con puntos isoeléctricos de 4.9, 4.0, 3.6, 4.3, 4.9, 4.2 y 3.0. Las masas moleculares que presentaron fueron de 17 900, 22 500, 30 300, 25 000, 23 500, 29 000 y 32 500 Da, respectivamente. Las alginasas, agarasas y dos de las celulasas (Cel II y III) son glicoproteínas. Según los estudios de especificidad, Cel I es una endocelulasa, Cel II es una endo y exocelulasa mientras que Cel III tiene actividad de endo, exo y  $\beta$  glucosidasa. Alg I despolimeriza alginatos no acetilados, mientras que la Alg II tiene actividad sobre alginatos no acetilados y acetilados, siendo mayor su actividad sobre los no acetilados. Además, Alg I mostró preferencia por alginatos ricos en bloques de  $\beta$ -D-manuronato, por lo que podría ser clasificada como poli(M) liasa. Por otra parte, Alg II actuó preferentemente sobre bloques de  $\alpha$ -L-guluronato, aunque también hidrolizó los de  $\beta$ -D-manuronato, y de acuerdo a esto podría ser clasificada como poli(G) y (M) liasa. Ag I actuó como  $\beta$  agarasa, mientras que Ag II como  $\alpha$  agarasa. El óptimo de actividad para las celulasas fue obtenido a 45 °C y pH 5.5 utilizando carboximetilcelulosa y salicina como sustratos, mientras que utilizando papel fue de 37 °C y pH 8. En el caso de las agarasas el óptimo de actividad se encontró a 45 °C y pH 5.5. Las alginasas mostraron un óptimo de actividad a 45 °C y pH 8. El contenido de aminoácidos fue muy similar entre las diferentes glicohidrolasas, predominando los aminoácidos ácidos e hidrofóbicos. Los tres tipos de glicohidrolasas mostraron una fuerte tendencia a agregarse, como se observó con los estudios de dispersión dinámica de la luz. Dicha agregación se evitó con la adición de aditivos como el polietilenglicol 6000, manitol y NaCl. Sin embargo, los estados agregados mostraron ser más activos. Por otra parte, se observó que para algunas de estas enzimas, los cambios en la agregación daban lugar a cambios conformacionales. Tal es el caso de las agarasas y alginasas, en las que se observó que un incremento en la agregación producía cambios en el contenido de estructura secundaria, determinada por dicroísmo circular. Analizando los espectros de CD se observó que en las 3 celulasas había un predominio de hoja  $\beta$ , perteneciendo a la clase  $\beta$ , mientras que las agarasas y alginasas pertenecen a la clase  $\alpha/\beta$ . Los tres grupos de enzimas mostraron un efecto sinérgico al

mezclarlas, lo que puede indicar que estas enzimas trabajan en sistemas multienzimáticos para hidrolizar sustratos complejos tales como la celulosa, el agar y el alginato.



## SUMMARY

In this work we purified and characterized 7 glycohydrolases from the hepatopancreas of the blue abalone, *Haliotis fulgens*; three of them showed cellulase activity, two alginase and two agarase activities. They were named Cel I, Cel II, Cel III, Alg I, Alg II, Ag I and Ag II, respectively. All of them were acidic proteins with isoelectric points of 4.9, 4.0, 3.6, 4.3, 4.9, 4.2 and 3.0. Their molecular masses were of 17 900, 22 500, 30 300, 25 000, 23 500, 29 000 and 32 500 Da, respectively. The alginases, agarases and two cellulases (Cel II and III) showed to be glycoproteins. According to specificity studies, Cel I showed endocellulase activity, Cel II had endo and exocellulase activities, while Cel III showed endo, exo and  $\beta$  glucosidase activities. Alg I depolymerized deacetylated alginate, while Alg II depolymerized deacetylated and acetylated alginate, but preferred the deacetylated one. Alg I also showed preference for  $\beta$ -D-manuronato-rich alginates and therefore could be classified as a poly(M) lyase. On the other hand Alg II preferred  $\alpha$ -L-guluronato-rich alginates, although it also hydrolyzed  $\beta$ -D-manuronato; accordingly it could be classified as poly(G) and (M) lyase. Ag I showed activity of  $\beta$  agarase and Ag II of  $\alpha$  agarasa. The optimum activity for the cellulases was obtained at 45 °C and pH 5.5 over carboxymethylcellulose and salicin, while for paper was of 37 °C and pH 8. The agarases had an optimum of 45 °C and pH 5.5. The alginases showed optimum activity at 45 °C and pH 8. The amino acid content was very similar among the different glycohydrolases, prevailing the acidic and hydrophobic residues. The dynamic light scattering studies showed that the three groups of glycohydrolases had a strong tendency to form aggregates. This aggregation was avoided with the addition of polyetilenglicol 6000, manitol and NaCl. However, the aggregate forms showed to be more active. On the other hand, we observed that the agarasas and alginasas suffer significant conformational changes upon aggregation. These aggregation produced changes in the secondary structure content, determined by circular dichroism techniques. The CD spectra indicated that the three cellulases belong to the  $\beta$  class, while the agarasas and alginasas belong to the  $\alpha/\beta$  class. The three groups of enzymes showed synergistic interactions, indicating that to hydrolyze complex substrates such as cellulose, agar and alginate, they could probably work in multienzymatic systems.

## ABREVIATURAS

Å: Angstrom  
Ag I: Agarasa 1  
Ag II: Agarasa 2  
Alg I: Alginasa 1  
Alg II: Alginasa 2  
BCA: Acido bicinconínico  
BSA: Albúmina de suero de bovino  
CD: Dicroísmo circular  
Cel I: Celulasa 1  
Cel II: Celulasa 2  
Cel III: Celulasa 3  
CMC: Carboximetilcelulosa  
DEAE: Dietilaminoetil  
DLS: Dispersión dinámica de luz  
DNS: Acido 3,5 dinitrosalicílico  
EDTA: Acido etilendiamino tetracético  
g: Fuerza centrífuga relativa  
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución  
IEF: Enfoque isoelectrico  
 $\lambda$ : longitud de onda  
PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida  
PEG: Polietilenglicol  
SDS: Dodecil sulfato de sodio  
Tris: Tris (hidroximetil) amino-metano  
UV: Ultravioleta  
*p*NPC: *p*-Nitrofenil  $\beta$ -D-celobiósido  
*p*NPL: *p*-Nitrofenil  $\beta$ -D-lactósido  
*p*NPG: *p*-Nitrofenil  $\beta$ -D-glicopiranosido  
M:  $\beta$ -D-manuronato  
G:  $\alpha$ -L-guluronato

## CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>4</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>5</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>7</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>CONTENIDO</b> .....	<b>9</b>
<b>INTRODUCCION</b> .....	<b>11</b>
<b>POLISACÁRIDOS</b> .....	<b>11</b>
<b>POLISACÁRIDOS ALGALES</b> .....	<b>11</b>
<i>Celulosa</i> .....	<i>12</i>
<i>Acido algínico</i> .....	<i>12</i>
<i>Agar</i> .....	<i>14</i>
<b>ENZIMAS QUE HIDROLIZAN CARBOHIDRATOS</b> .....	<b>14</b>
<b><i>Celulasas</i></b> .....	<b><i>14</i></b>
Endo-1,4- $\beta$ -glucanasas .....	14
Exo-1,4- $\beta$ -glucanasas .....	15
$\beta$ -glucosidasas .....	15
<b><i>Alginasas</i></b> .....	<b><i>15</i></b>
<b><i>Agararasas</i></b> .....	<b><i>16</i></b>
<b>DESCRIPCIÓN DEL ABULÓN AZUL HALIOTIS FULGENS</b> .....	<b>16</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>17</b>
<b>CELULASAS</b> .....	<b>17</b>
<b>ALGINASAS</b> .....	<b>18</b>
<b>AGARASAS</b> .....	<b>19</b>
<b>OBJETIVO GENERAL:</b> .....	<b>20</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES:</b> .....	<b>20</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>21</b>
<b>COLECTA Y ALMACENAMIENTO</b> .....	<b>21</b>
<b>EXTRACCIÓN DE GLICOHIDROLASAS</b> .....	<b>21</b>
<b>DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA</b> .....	<b>22</b>
<b>DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ALGINOLÍTICA</b> .....	<b>22</b>
<b>DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD AGAROLÍTICA</b> .....	<b>23</b>
<b>ESTUDIOS DE SINERGIA</b> .....	<b>24</b>
<b>PURIFICACIÓN DE LAS GLICOHIDROLASAS DEL ABULÓN AZUL, H. FULGENS</b> .....	<b>24</b>
<i>Cromatografía de intercambio aniónico de baja presión</i> .....	<i>24</i>
<i>Cromatografía de alta resolución</i> .....	<i>24</i>
<b>CARACTERIZACIÓN DE LAS ENZIMAS PURIFICADAS</b> .....	<b>25</b>
<i>Cuantificación de proteínas</i> .....	<i>25</i>

<i>Determinación de los valores óptimos de pH y temperatura para cada glicohidrolasa</i> ..	25
<i>Determinación del peso molecular</i> .....	26
<i>Espectrometría de masas</i> .....	26
<i>Determinación del punto isoeléctrico</i> .....	26
<i>Análisis de carbohidratos</i> .....	26
<i>Determinación de la composición de aminoácidos</i> .....	27
<i>Determinación de la estructura secundaria</i> .....	27
<i>Estudios de dispersión dinámica de la luz</i> .....	27
CRISTALIZACIÓN DE LAS GLICOHIDROLASAS.....	29
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	<b>30</b>
PURIFICACIÓN.....	30
<i>Celulasas</i> .....	30
<i>Alginasas</i> .....	33
<i>Agarosas</i> .....	36
CARACTERIZACIÓN .....	38
<i>Determinación de la masa molecular y punto isoeléctrico</i> .....	38
<i>Pruebas de especificidad</i> .....	40
<i>Efecto de la temperatura y pH en la actividad de las glicohidrolasas purificadas</i> .....	42
<i>Contenido de carbohidratos</i> .....	44
<i>Estimación del contenido de aminoácidos</i> .....	44
<i>Estudios de dispersión dinámica de la luz</i> .....	46
<i>Estudios conformacionales</i> .....	49
CRISTALIZACIÓN DE LAS GLICOHIDROLASAS.....	53
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>58</b>
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>59</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>60</b>

## INTRODUCCION

### *Polisacáridos.*

Los polisacáridos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, pueden actuar como materiales de reserva como el almidón, glicógeno, algunos  $\beta$ -D glucanos, fructanos y algunos galactomananos. Estos también pueden tener una función estructural, clasificándose en: fibrosos como la celulosa, quitina, 1,3- $\beta$ -D xilanos y 1,4- $\beta$ -D mananos y de matriz, los que se caracterizan por su capacidad de formar geles (agar, carragenano, alginato, etc.), o bien, pueden actuar como sustancias protectoras (polisacáridos extracelulares antigénicos e inmunogénicos). Además, diversas macromoléculas que contienen unidades de carbohidratos, están ampliamente distribuidas en organismos vivos e incluyen a) polisacáridos; b) glicoproteínas, proteoglicanos y peptidoglicanos; c) glicolípidos y lipopolisacáridos; d) ácidos teóicos y macromoléculas relacionadas que contienen unidades de oligosacáridos con enlaces fosfodiéster y e) ácidos nucleicos [1].

Los polisacáridos pueden estar formados por un solo tipo de residuo (homopolisacárido), tal es el caso de la celulosa, cuya estructura consta de unidades de  $\beta$ -D-glucosa. Si dos o más clases de residuos están considerados, el polímero es un heteropolisacárido. En contraste con las proteínas y los ácidos nucleicos, los cuales son de una longitud definida, las cadenas de polisacáridos pueden crecer hasta tamaños indeterminados [2].

### *Polisacáridos algales*

Las algas marinas, principal alimento del abulón, constituyen una fuente importante de polisacáridos. Estos se encuentran distribuidos en los 11 phyla algales reconocidos a la fecha [3]. Las macroalgas poseen una pared celular, química y estructuralmente más compleja y heterogénea que la de plantas terrestres, la que está compuesta por mezclas de polisacáridos ramificados y sulfatados los cuales están asociados a proteínas y a iones como el calcio y el potasio. Los principales polisacáridos presentes en la mayoría de las macroalgas son la celulosa, el ácido algínico, el carragenano y el agar [4].

## Celulosa

La celulosa es el polímero más abundante en la biosfera, está formada por residuos de glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 y es el constituyente principal de la pared celular de las plantas. Esta puede estar presente en un estado relativamente puro o en asociación con otros compuestos como la hemicelulosa y las ligninas. También se encuentra como constituyente de las algas y tunicados y es sintetizada por algunas bacterias como *Acetobacter xylinum* y por hongos [5]. La despolimerización de este polisacárido tiene una gran importancia ecológica, industrial y económica.

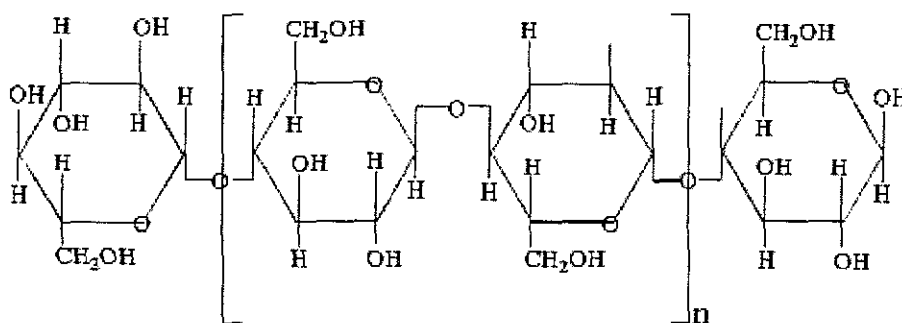


Figura 1. Estructura de la celulosa

## Acido algínico

El alginato es un copolímero de  $\alpha$ -L-guluronato (G) y su C5 epímero  $\beta$ -D-manuronato (M). Todos los alginatos están compuestos de cuatro elementos estructurales: bloques de residuos consecutivos G o poliguluronato [poli(G)], bloques M o polimanuronato [poli(M)], o bien pueden estar alternados los bloques GM o como un arreglo aleatorio heteropolimérico G/M. Aunque algunos alginatos pueden existir predominantemente como un tipo de bloque, todos los tipos de bloques pueden estar presentes dentro de una molécula de alginato. Sólo los polímeros que contengan bloques G arriba de una cierta longitud son capaces de formar geles iónicos. La fracción de M en tales geles afecta la elasticidad y tamaño de poro del gel [6-9]. El alginato se encuentra en gran abundancia como parte de la pared celular y como material intracelular en algas cafés. La mayoría de los alginatos usados comercialmente son obtenidos de 3 géneros, *Macrocystis*, *Laminaria* y *Ascophyllum*. El alginato también es producido por dos familias de bacterias heterotróficas, *Pseudomonas* y *Azotobacter*. En contraste con los

alginatos producidos por algas, los bacteriales pueden estar acetilados en la posición 2 y/o 3 del residuo M, esta acetilación afecta las propiedades del polímero [10,7]. Como los residuos M prefieren una conformación  ${}^4C_1$  mientras que los residuos G prefieren la conformación  ${}^1C_4$ , la cantidad relativa y distribución de los residuos G tienen un gran efecto en la estructura y propiedades de los polímeros. Los alginatos algales contienen los tres tipos de bloques, y la cantidad y distribución de cada tipo varía con la especie y con la parte del alga de donde se extraiga [8]. Los alginatos de *Pseudomonas* no contienen bloques G y debido a esto no pueden formar geles iónicos [10]. *Azotobacter vinelandii* produce alginato capsular que contiene mayor cantidad de bloques M y MG.

El alginato es ampliamente utilizado en la industria de los alimentos, farmacéutica, textil y del papel debido a su capacidad para formar soluciones viscosas, su facilidad para formar geles termoestables con cationes divalentes y para unir agua. Es también usado para la inmovilización y encapsulación de células y enzimas, como transportador de fármacos y más recientemente como soporte para el cultivo de células específicas como condrocitos [7,11-15]. Su habilidad para formar geles se incrementa con la presencia de iones divalentes como el  $Ca^{2+}$  [7,13,15]. No obstante sus aplicaciones, al alginato también se le ha asociado un efecto patógeno cuando es producido por la bacteria *P. aeruginosa*. Este efecto incluye: adhesión de mucoide al epitelio traqueal, interferencia en la penetración efectiva de antibióticos contra las bacterias e interferencia con los leucocitos polimorfonucleares. También incrementa la resistencia a la fagocitosis; suprime los mecanismos de defensa del huésped, afectando las funciones de neutrófilos y linfocitos, e incrementa la capacidad epifítica. Además, el alginato ha sido implicado en los síntomas conocidos como “remojoamiento”, en donde tejidos intercelulares de plantas infectadas comienzan a llenarse de agua. [13-18].

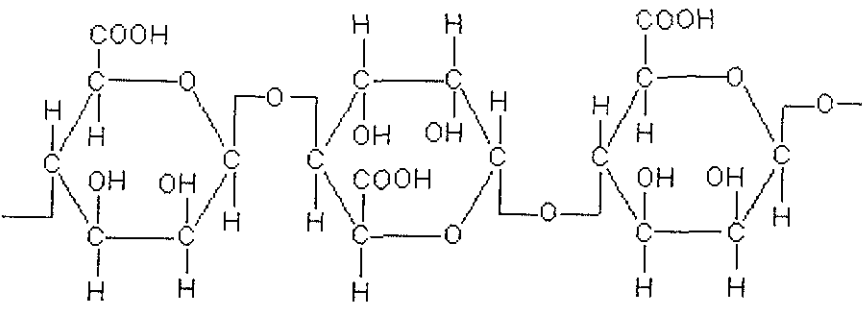


Figura 2. Estructura del ácido alginico

## Agar

Este es un nombre genérico que se aplica a una familia de galactanos extraídos de algas rojas (Rodofitas) como son *Gelidium*, *Gracilaria*, *Pterocladia*, etc. Este polisacárido constituye uno de los más ampliamente caracterizados, con una estructura que consiste de residuos alternados de  $\alpha(1-4)$ -3,6-anhidro-L-galactosa y  $\beta(1-3)$ -D-galactosa, con pequeñas cantidades de ésteres sulfatados, piruvato acetales y metil ésteres; los cuales afectan las propiedades del polímero. El agar tiene una composición heterogénea, con dos fracciones principales: la agarosa (polímero neutro), que constituye la fracción gelificable y la agarpectina (polímero ácido) que no gelifica. Presenta además 6-O-metil-D-galactosa en una proporción que varía con relación a la agarosa, según el tipo de agarofita analizada [19-23].

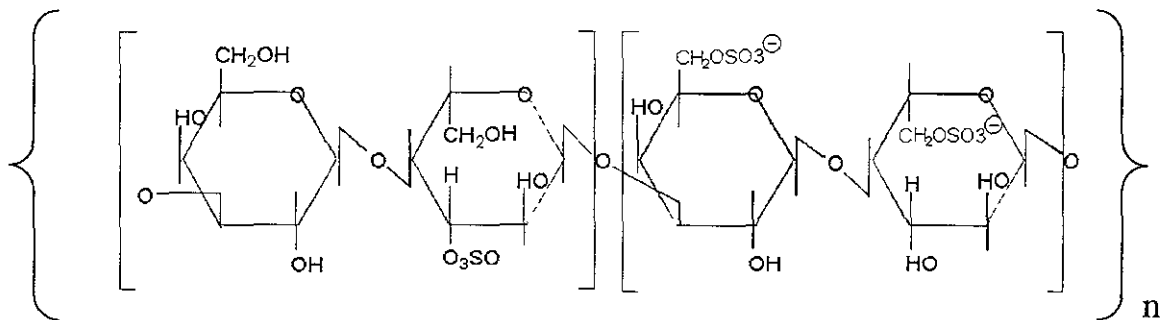


Figura 3. Estructura del agar

### *Enzimas que hidrolizan carbohidratos.*

A las enzimas que hidrolizan polisacáridos se les conoce como glicohidrolasas, glicanhidrolasas o glicanasas. Estas hidrolizan los enlaces glicosídicos, liberando agua.

### **Celulasas.**

En general, tres categorías de enzimas forman los sistemas celulolíticos: 1) endocelulasas (endoglucanasa o 1,4- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohidrolasa; E.C. 3.2.1.4), 2) exocelulasas (celulosa 1,4- $\beta$ -D-celobiosidasa o 1,4- $\beta$ -D-glucan celobiohidrolasa; E.C. 3.2.1.91) y 3)  $\beta$ -D-glucosidasas ( $\beta$ -D-glucosido glucohidrolasa; E.C. 3.2.1.21.) [24-26].

### *Endo-1,4- $\beta$ -glucanasas*

Las endo-1,4- $\beta$ -glucanasas rompen los enlaces glicosídicos internos de la celulosa en forma aleatoria, lo que provoca una rápida disminución en la longitud de la cadena de los  $\beta$ -glucanos,



con un incremento lento de los grupos reductores [27]. Las endoglucanasas han sido clasificadas en familias de acuerdo a sus propiedades hidrofóbicas [28] y a su dominio catalítico [29]. Sus sustratos *in vitro* incluyen a la carboximetilcelulosa y a la celulosa amorfa tratada con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> o álcali. La celobiosa es el principal producto de la reacción [26].

### ***Exo-1,4-β-glucanasas***

Las exo-1,4-β-glucanasas, también llamadas celobiohidrolasas, actúan cortando la celobiosa en el extremo no reductor de la cadena. El porcentaje de hidrólisis de la celobiosa y de celooligosacáridos de cadenas largas se incrementa con el grado de polimerización de las mismas [26].

### ***β-glucosidasas***

En el caso de las β-glucosidasas, no se habla propiamente de celulasas. No obstante, son componentes muy importantes de los sistemas celulolíticos, ya que completan la hidrólisis hasta glucosa de la celobiosa, liberada por la acción de otras celulasas. Los sistemas celulolíticos con niveles bajos de β-glucosidasa tienen una baja actividad, debido a la inhibición de las endoglucanasas y las celobiohidrolasas por la celobiosa [26].

### **Alginasas.**

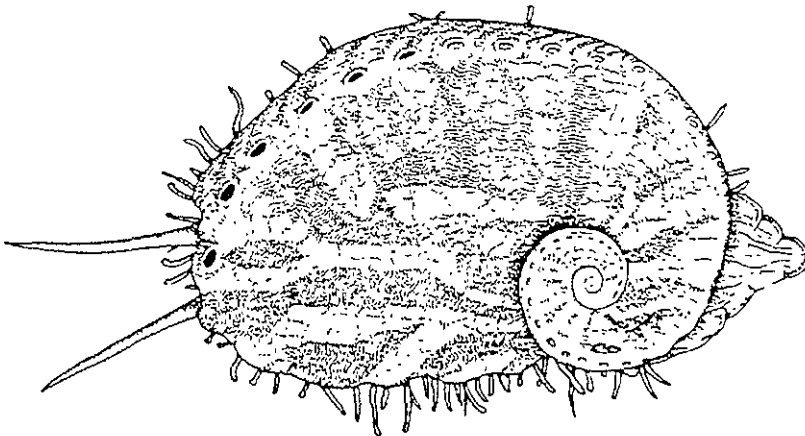
Las alginasas, también conocidas como alginato liasas o alginato despolimerasas, hidrolizan el alginato por medio de un mecanismo de eliminación β, provocando la formación de un doble enlace entre C-4 y C-5, la eliminación del enlace glicosídico 4-O y la producción de 4-desoxi-α-L-eritro-hex-4-enepiranosiluronato en el extremo no reductor. Este mecanismo aún no está completamente estudiado. Las alginasas se diferencian por sus características individuales, por su preferencia por alginatos acetilados o no acetilados y por el tipo de bloque que hidrolizan con mayor facilidad M o G [7,9,30,31]. Si prefieren alginatos ricos en bloques M, se clasifican como EC 4.2.2.3, poli (M) liasa [(1-4)-β-D-manuronan liasa], si prefieren los G, se clasifican como EC 4.2.2.11, poli (G) liasa [(1-4)-α-L-guluronan liasa]. Aunque la mayoría de los organismos producen sólo una alginasa con una especificidad definida, algunos invertebrados marinos y bacterias producen dos o más enzimas y por lo menos una bacteria, *Alteromonas* sp. H-4 produce una liasa con múltiples especificidades [7].

## Agarasas.

Las agarasas son enzimas capaces de hidrolizar el agar. Están clasificadas en dos grupos según su modo de acción sobre agarosa; las  $\alpha$ - agarasas rompen el enlace  $\alpha$ -1,3 de la agarosa y las  $\beta$ -agarasas hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1,4 [20-22,32].

### *Descripción del abulón azul Haliotis fulgens*

El abulón azul, *Haliotis fulgens*, es un gasterópodo marino hervívoro que habita en aguas poco profundas (de 3 a 7 m), aunque pueden localizarse entre los 17 y 20 m de profundidad (Figura 4). Se distribuye desde Point Conception, California, EUA, hasta Bahía Magdalena, Baja California Sur, México; llega a medir hasta 25 cm de longitud, aunque la mayoría de los individuos oscilan entre 12.5 y 20 cm. La concha es oval, gruesa y la superficie tiene numerosos bordes. El borde de la concha es muy delgado, tiene generalmente un color verde oliva o café con 5-7 orificios abiertos y con una banda roja a lo largo de los poros respiratorios [33,34]. Según Ortiz y León [35] existen 5 especies comerciales cada una con características propias, aunque presentan semejanzas considerables. Estas especies varían en su preferencia por un determinado intervalo de temperatura, profundidad, hábitat físico y alimento, siendo el abulón azul el que ocupa el primer sitio en capturas, con porcentajes por arriba del 80 % [36]. En el medio natural su dieta consiste de algas, siendo el alga café *Macrocystis* sp. la que más consume. [37]. Casi el 100 % de la producción de abulón se destina al proceso de enlatado y el 97 % de éste se destina a exportación. Las vísceras son eliminadas durante el proceso de enlatado y exportación. Sin embargo, éstas contienen una gran cantidad de enzimas hidrolíticas que pueden ser utilizadas en diferentes áreas de la investigación y de la industria.



Reino: Animalia  
Phylum: Mollusca  
Clase: Gasteropoda  
Subclase: Prosobranchia  
Orden: Archeogastropoda  
Suborden: Zygobranchia  
Superfamilia. Pleurotomariacea  
Familia: Haliotidae  
Género: *Haliotis*

Figura 4. Clasificación sistemática del abulón azul, *Haliotis fulgens* [33].

## ANTECEDENTES

En general las glicohidrolasas presentan 3 dominios, uno catalítico, uno que se une al sustrato y un dominio de enlace, que une al catalítico y al de unión al sustrato, el que está formado por un péptido flexible. En muchos casos estos péptidos son fácilmente reconocidos porque son ricos en prolina y treonina, serina o glutamina. Estos dominios se han encontrado en amilasas, celulasas, quitinasas y xilanasas.

Todas las glicohidrolasas estudiadas a la fecha presentan un sitio activo que contiene varios sitios de unión para azúcares monoméricos. Estas enzimas parecen utilizar mecanismos que involucran dos cadenas laterales carboxílicas con valores de pKa diferente. Se piensa que uno de estos grupos carboxilo dona un protón al azúcar, mientras que el otro, que está ionizado, estabiliza el ion carbonio presente en el estado de transición, o bien, forma un enlace covalente con el resto del sustrato. En algunas enzimas, el agua puede reemplazar a uno de los grupos carboxilos en este mecanismo [38].

Los polisacáridos como la celulosa, el alginato y el agar son degradados por enzimas celulolíticas, alginolíticas y agarolíticas, respectivamente. En general estas enzimas han sido aisladas en su mayoría a partir de microorganismos como bacterias y hongos [20-22,26,39,40].

### *Celulasas*

De estas enzimas, las más estudiadas han sido las celulasas. Aunque la unidad repetitiva de la celulosa es un disacárido (celobiosa), esta molécula está organizada en un complicado estado paracristalino y, debido a esta complejidad estructural, una sola enzima no puede degradarla [24,25].

Los microorganismos que crecen en celulosa producen diferentes celulasas las cuales actúan sinérgicamente en un sistema celulolítico llamado celulosoma. La interacción sinérgica entre celulasas se ha estudiado en diversos sistemas celulolíticos de bacterias y hongos [24,25]. El concepto de sinergia en la despolimerización enzimática de la celulosa fue introducido por primera vez en 1950 por Reese *et al.* [41]. En 1954, Gilligan y Reese [42] proporcionan una evidencia experimental de este fenómeno utilizando mezclas de celulasas de hongos y cuantificando los azúcares reductores, producto de la hidrólisis de la celulosa. A partir de entonces, numerosos estudios se han realizado, incluyendo la interacción sinérgica entre endo y exo celulasas homólogas, es decir, producidas por el mismo organismo; la sinergia cruzada

obtenidos de varias especies de algas caféas, incluyendo a *Laminaria digitata*, *Pelvetia canaliculata* y *Undaria pinnatifida*. Esta actividad también ha sido detectada en la glándula digestiva de *Turbo cornutus*, el hepatopáncreas de *Littorina sp* y *Dollabella auricola*, en el estilete cristalino de los moluscos marinos *Chromytilus meridionalis* y *Perna perna* [7]. También han sido aisladas de una variedad de bacterias incluyendo bacterias marinas [55-57], *Bacillus circulans* [58], *Sphingomonas sp* [59,60], *Klebsiella sp* [61] y *Pseudomonas sp* [13,30]. Davidson *et al.* [62] describen una alginasa de la bacteria *Azotobacter vinelandii*, la cual tiene preferencia por sustratos ricos en bloques M. Posteriormente Kennedy *et al.* [63], reportaron la purificación de una alginasa periplásmica de *A. vinelandii* y *A. chroococcum*, la que también prefiere alginatos ricos en bloques M. Este tipo de enzimas también se han reportado en hongos marinos [64] y en moluscos [65]. En 1999, se reportó la primer estructura cristalina de una alginasa proveniente de *Sphingomonas sp* [31] y recientemente, un gen de alginasa fue encontrado asociado con el virus *Chlorella sp* [7]. Sin embargo, a pesar de que han sido identificadas en numerosas fuentes, sólo se han caracterizado unas cuantas y de moluscos y hongos, ninguna.

### **Agararas**

Las agararas han sido estudiadas más superficialmente que las celulasas y alginasas. Diferentes tipos de  $\beta$  agararas han sido encontradas en especies de *Cytophaga sp* [66], *Pseudomonas atlantica* [67], *Vibrio sp* [21,22,68], *Streptomyces sp* [69], *Littorina mandshurica* [70] y moluscos marinos [71]. Las  $\alpha$  agararas sólo han sido reportadas para *Alteromonas agarlyticus* [32]. No obstante que se han reportado en los organismos ya mencionados, *P. atlantica* y *A. agarolyticus* son los únicos en los que se ha estudiado con más detalle a estas enzimas. A la fecha, no se ha logrado purificar o caracterizar agararas de fuentes diferentes a la bacteriana. En el caso de moluscos, se determinó actividad agarolítica en un extracto; sin embargo, no se logró purificar a la enzima ya que perdía su actividad en un tiempo muy corto [70].

En 1993, Gómez y García [71] midieron la actividad alginolítica, celulolítica y agarolítica de extractos crudos de algunos ficófitos que degradan la pared celular de algas, incluyendo al abulón (*Halotis sp*). Sin embargo, sólo trabajaron extractos.

El aislamiento, caracterización y determinación de la estructura molecular de estas glicohidrolasas tiene una gran importancia debido a la aplicación tan amplia que pueden tener

obtenidos de varias especies de algas cafés, incluyendo a *Laminaria digitata*, *Pelvetia canaliculata* y *Undaria pinnatifida*. Esta actividad también ha sido detectada en la glándula digestiva de *Turbo cornutus*, el hepatopáncreas de *Littorina sp* y *Dollabella auricola*, en el estilete cristalino de los moluscos marinos *Chromytilus meridionalis* y *Perna perna* [7]. También han sido aisladas de una variedad de bacterias incluyendo bacterias marinas [55-57], *Bacillus circulans* [58], *Sphingomonas sp* [59,60], *Klebsiella sp* [61] y *Pseudomonas sp* [13,30]. Davidson *et al.* [62] describen una alginasa de la bacteria *Azotobacter vinelandii*, la cual tiene preferencia por sustratos ricos en bloques M. Posteriormente Kennedy *et al.* [63], reportaron la purificación de una alginasa periplásmica de *A. vinelandii* y *A. chroococcum*, la que también prefiere alginatos ricos en bloques M. Este tipo de enzimas también se han reportado en hongos marinos [64] y en moluscos [65]. En 1999, se reportó la primer estructura cristalina de una alginasa proveniente de *Sphingomonas sp* [31] y recientemente, un gen de alginasa fue encontrado asociado con el virus *Chlorella sp* [7]. Sin embargo, a pesar de que han sido identificadas en numerosas fuentes, sólo se han caracterizado unas cuantas y de moluscos y hongos, ninguna.

### **Agarasas**

Las agarasas han sido estudiadas más superficialmente que las celulasas y alginasas. Diferentes tipos de  $\beta$  agarasas han sido encontradas en especies de *Cytophaga sp* [66], *Pseudomonas atlantica* [67], *Vibrio sp* [21,22,68], *Streptomyces sp* [69], *Littorina mandshurica* [70] y moluscos marinos [71]. Las  $\alpha$  agarasas sólo han sido reportadas para *Alteromonas agarolyticus* [32]. No obstante que se han reportado en los organismos ya mencionados, *P. atlantica* y *A. agarolyticus* son los únicos en los que se ha estudiado con más detalle a estas enzimas. A la fecha, no se ha logrado purificar o caracterizar agarasas de fuentes diferentes a la bacteriana. En el caso de moluscos, se determinó actividad agarolítica en un extracto; sin embargo, no se logró purificar a la enzima ya que perdía su actividad en un tiempo muy corto [70].

En 1993, Gómez y García [71] midieron la actividad alginolítica, celulolítica y agarolítica de extractos crudos de algunos ficófitos que degradan la pared celular de algas, incluyendo al abulón (*Halotis sp*). Sin embargo, sólo trabajaron extractos.

El aislamiento, caracterización y determinación de la estructura molecular de estas glucosidasas tiene una gran importancia debido a la aplicación tan amplia que pueden tener

en áreas como la acuicultura, la industria del reciclaje de papel y del algodón, el tratamiento de desechos, en la determinación estructural de polisacáridos y en estudios biosintéticos. Además, estas enzimas, son utilizadas en el aislamiento y producción de protoplastos, como herramienta de diagnóstico en muchas áreas de la ciencias biomédicas, en el tratamiento de enfermedades como la endocarditis y las infecciones pseudomonales entre otras. Por otro lado, el estudio de proteínas relacionadas que catalizan diferentes reacciones es de gran importancia para el entendimiento de la evolución natural de las enzimas y de sus rutas metabólicas. Además, es muy poco lo que se sabe de las agarasas y alginasas, no existe a la fecha ningún estudio de comportamiento en solución, conformación y las actividades agarolíticas y alginolíticas de origen diferente al bacteriano y de hongos sólo han sido detectadas en extractos, sin llegar a la purificación y caracterización de las mismas. Todo esto, unido al hecho de que se trata de un molusco marino de los más primitivos en forma y estructura, hace que la caracterización fisicoquímica y molecular de este tipo de enzimas tenga una gran relevancia.

### **OBJETIVO GENERAL:**

Purificar y caracterizar fisicoquímica y estructuralmente a tres tipos de glicohidrolasas presentes en el hepatopáncreas del abulón azul, *H. fulgens*.

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- a) Caracterizar bioquímicamente a las glicohidrolasas del abulón, esto es, determinar peso molecular, punto isoeléctrico, estabilidad a diferentes temperaturas y valores de pH, análisis de aminoácidos, la especificidad por el sustrato y el tipo de enlace que rompen.
- b) Realizar análisis conformacionales de las enzimas en solución utilizando la técnica de dicroísmo circular.

en áreas como la acuicultura, la industria del reciclaje de papel y del algodón, el tratamiento de desechos, en la determinación estructural de polisacáridos y en estudios biosintéticos. Además, estas enzimas, son utilizadas en el aislamiento y producción de protoplastos, como herramienta de diagnóstico en muchas áreas de la ciencias biomédicas, en el tratamiento de enfermedades como la endocarditis y las infecciones pseudomonales entre otras. Por otro lado, el estudio de proteínas relacionadas que catalizan diferentes reacciones es de gran importancia para el entendimiento de la evolución natural de las enzimas y de sus rutas metabólicas. Además, es muy poco lo que se sabe de las agarasas y alginasas, no existe a la fecha ningún estudio de comportamiento en solución, conformación y las actividades agarolíticas y alginolíticas de origen diferente al bacteriano y de hongos sólo han sido detectadas en extractos, sin llegar a la purificación y caracterización de las mismas. Todo esto, unido al hecho de que se trata de un molusco marino de los más primitivos en forma y estructura, hace que la caracterización fisicoquímica y molecular de este tipo de enzimas tenga una gran relevancia.

### **OBJETIVO GENERAL:**

Purificar y caracterizar fisicoquímica y estructuralmente a tres tipos de glicohidrolasas presentes en el hepatopáncreas del abulón azul, *H. fulgens*.

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- a) Caracterizar bioquímicamente a las glicohidrolasas del abulón, esto es, determinar peso molecular, punto isoeléctrico, estabilidad a diferentes temperaturas y valores de pH, análisis de aminoácidos, la especificidad por el sustrato y el tipo de enlace que rompen.
- b) Realizar análisis conformacionales de las enzimas en solución utilizando la técnica de dicroísmo circular.

- c) Realizar estudios del comportamiento de las enzimas en solución por técnicas de dispersión dinámica de luz.
- d) Determinar las condiciones óptimas de cristalización de las hidrolasas, para futuros estudios cristalográficos.

## **MATERIALES Y METODOS**

### ***Colecta y almacenamiento***

Se colectaron las vísceras de 20 abulones de la especie *H. fulgens* en Isla Magdalena, Baja California Sur, esto gracias a la colaboración del Instituto Nacional de la Pesca y su delegación regional CRIP de La Paz, B.C. Estas vísceras se congelaron a -25 °C para su traslado al Instituto de Química de la UNAM, donde se mantuvieron a -30 °C en un congelador Forma Scientific Modelo 8419, hasta su uso.

### ***Extracción de glicohidrolasas***

Con el fin de evitar la desnaturalización y evitar alteraciones del comportamiento en solución de las proteínas, todos los pasos descritos a partir de esta sección fueron realizados a 4 °C. Los hepatopáncreas de los abulones se molieron en un amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 8 con un homogenizador de tejidos Ultra-Turrax TP 18/10 S2 durante 8 min, con intervalos de 1 min de descanso por 1 de molienda para evitar la desnaturalización de las enzimas por calor. Para inhibir a las proteasas presentes en el hepatopáncreas [72], se adicionó un coctel de inhibidores (Complete de Boeringher). Con el fin de eliminar los residuos sólidos, el homogenado se centrifugó a 30 100 x g durante 30 min en una centrífuga Beckman Modelo J2-21 y el sobrenadante se filtró para eliminar la capa de lípidos formada en la superficie. Con el sobrenadante filtrado se realizó una precipitación fraccionada con sulfato de amonio sólido. Primero se llevó a una saturación de 0-35 % (194 g/l), se dejó reposar por 10 h y se separó el precipitado por centrifugación bajo las condiciones ya descritas. El sobrenadante obtenido se llevó a una saturación de 35-65 % (184 g/l), se dejó reposar por 12 h y se separó el precipitado por centrifugación. El sobrenadante obtenido, se llevó a una saturación de 65-100 % (244 g/l).



- c) Realizar estudios del comportamiento de las enzimas en solución por técnicas de dispersión dinámica de luz.
- d) Determinar las condiciones óptimas de cristalización de las hidrolasas, para futuros estudios cristalográficos.

## MATERIALES Y METODOS

### *Colecta y almacenamiento*

Se colectaron las vísceras de 20 abulones de la especie *H. fulgens* en Isla Magdalena, Baja California Sur, esto gracias a la colaboración del Instituto Nacional de la Pesca y su delegación regional CRIP de La Paz, B.C. Estas vísceras se congelaron a -25 °C para su traslado al Instituto de Química de la UNAM, donde se mantuvieron a -30 °C en un congelador Forma Scientific Modelo 8419, hasta su uso.

### *Extracción de glicohidrolasas*

Con el fin de evitar la desnaturalización y evitar alteraciones del comportamiento en solución de las proteínas, todos los pasos descritos a partir de esta sección fueron realizados a 4 °C. Los hepatopáncreas de los abulones se molieron en un amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 8 con un homogenizador de tejidos Ultra-Turrax TP 18/10 S2 durante 8 min, con intervalos de 1 min de descanso por 1 de molienda para evitar la desnaturalización de las enzimas por calor. Para inhibir a las proteasas presentes en el hepatopáncreas [72], se adicionó un coctel de inhibidores (Complete de Boeringher). Con el fin de eliminar los residuos sólidos, el homogenado se centrifugó a 30 100 x g durante 30 min en una centrífuga Beckman Modelo J2-21 y el sobrenadante se filtró para eliminar la capa de lípidos formada en la superficie. Con el sobrenadante filtrado se realizó una precipitación fraccionada con sulfato de amonio sólido. Primero se llevó a una saturación de 0-35 % (194 g/l), se dejó reposar por 10 h y se separó el precipitado por centrifugación bajo las condiciones ya descritas. El sobrenadante obtenido se llevó a una saturación de 35-65 % (184 g/l), se dejó reposar por 12 h y se separó el precipitado por centrifugación. El sobrenadante obtenido, se llevó a una saturación de 65-100 % (244 g/l).

Los precipitados se resuspendieron con el amortiguador Tris y se dializaron por 8 h contra agua destilada para eliminar el sulfato de amonio. Posteriormente se continuó con la diálisis contra un amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 8 por 10 h. Debido a que la actividad celulolítica era muy grande y provocaba el rompimiento de las membranas de diálisis, fue necesario cambiar dichas membranas cada 2 h. Las membranas empleadas fueron Spectrapor con una retención de pesos moleculares de 3500.

### ***Determinación de la actividad celulolítica***

Con el fin de determinar la familia a la que pertenecían las celulasas del abulón, se cuantificó la actividad sobre diferentes sustratos. Para esto se midieron los azúcares reductores liberados por la hidrólisis sobre carboximetilcelulosa (CMC), salicina y papel filtro Whatman No. 1. Para la cuantificación de los azúcares reductores se empleó la técnica del DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) según Wood y Bhat [26]. La reacción fue realizada utilizando 0.95 ml de sustrato al 1.0 % p/v para CMC y salicina o tiras de papel filtro (4x1 cm). Después de la adición de 50 µl de enzima, las muestras se incubaron por 20 min a 45 °C para CMC y salicina y 37 °C para papel filtro. La concentración de azúcares reductores liberados fue determinada con una curva de calibración de glucosa. Una unidad de actividad (U) fue definida como la cantidad de enzima que produce un µmol de glucosa por minuto a 45 °C y pH 5.5. La actividad específica es definida como U/mg de proteína. Asimismo, se probaron sustratos sintéticos cromogénicos para poder determinar con mayor precisión la familia a la que pertenecía cada celulasa purificada. Así, la hidrólisis de *p*NPC, *p*NPL y *p*NPG fue cuantificada con métodos espectrofotométricos a 410 nm por la liberación de *p*-nitrofenol [73], utilizando amortiguador de acetatos 0.05 M, pH 5.5.

### ***Determinación de la actividad alginolítica***

Para cuantificar la actividad alginolítica se utilizaron 3 diferentes métodos reportados en la literatura:

1) Método del periodato-tiobarbiturato. Se incubaron 0.1 ml de alginato de sodio 1.2 %, 0.1 ml de KCl 0.5 M, 0.3 ml de Tris-HCl 1.0 M, pH 7.5 y la enzima hasta dar un volumen de 1 ml por 8 min a 35 °C. Una unidad de actividad alginolítica fue definida como la cantidad de

enzima requerida para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de  $\beta$ -formilpiruvato por minuto por ml (0.01  $\mu\text{mol}$  produce un incremento en la densidad óptica de 0.29 a 545 nm) [55].

## 2) Incremento en la densidad óptica.

La cuantificación de la actividad alginolítica se puede realizar midiendo el incremento en la densidad óptica a 235 nm. En este caso, la enzima se incubaba con el alginato de sodio 0.5 % en presencia de  $\text{MgCl}_2$  10 mM y fosfato de sodio 10 mM, pH 8.0 y 37 °C. Una unidad de actividad causa el incremento de 0.001 unidades de densidad óptica a 235 nm, por minuto a 37 °C [58].

3) Además, se cuantificaron los azúcares reductores producto de la hidrólisis del alginato de sodio (alginato de sodio 0.5 % en Tris-HCl 0.05 M, pH 8), utilizando el DNS [26]. La concentración de azúcares liberados fue determinada con una curva de calibración, utilizando ácido galacturónico como estándar. Una unidad de actividad (U) fue definida como la cantidad de enzima que produce un  $\mu\text{mol}$  de ácido galacturónico por min a 45 °C. Con el fin de determinar la especificidad de las alginasas, se hicieron pruebas de actividad sobre alginato de sodio sin acetilar (de *Macrocystis pyrifera*) y con alginato acetilado (de *Pseudomonas sp.*). Además se probaron las actividades con alginato donde predominan los bloques M y donde predominan los bloques G.

## ***Determinación de actividad agarolítica***

Para determinar la actividad agarolítica se cuantificaron los azúcares reductores producto de la hidrólisis del agar (agar 1.0 % en amortiguador de acetatos pH 5.5), con la técnica del DNS [26]. La reacción fue realizada en 0.95 ml de sustrato al 1.0 % p/v. Después de la adición de 50  $\mu\text{l}$  de enzima (0.8 mg/ml), las muestras se incubaron por 20 min a 45 °C. La concentración de azúcares reductores liberados fue determinada con una curva de calibración de galactosa. Una unidad de actividad (U) es definida como la cantidad de enzima que produce un  $\mu\text{mol}$  de galactosa por minuto a 45 °C y pH 5.5. La actividad específica es definida como U/mg de proteína. Para determinar la especificidad de las agarasas, se probaron los sustratos sintéticos: *p*-nitrofenol  $\alpha$ -galactósido y *p*-nitrofenol  $\beta$ -galactósido. La hidrólisis de estos sustratos fue cuantificada espectrofotométricamente a 410 nm por la liberación de *p*-nitrofenol [32].

### ***Estudios de sinergia***

Se conoce que en celulasas de origen bacteriano y de hongos hay un efecto sinérgico entre ellas [24,25]. El término sinergia implica la acción conjunta de diferentes enzimas para hidrolizar un determinado sustrato complejo. Dicha actividad es mayor que la suma de las actividades individuales de las enzimas involucradas. De manera estricta, este término se aplica para enzimas semejantes, es decir que hidrolizan el mismo tipo de enlaces. En cuanto a la sinergia entre glicohidrolasas, este término ha sido aplicado para enzimas que hidrolizan de manera diferente un sustrato, tal es el caso de la sinergia entre celulasas, donde por ejemplo, se evalúa el efecto sinérgico entre endo y exocelulasas. En este trabajo se manejó el término sinergia según este último criterio. Para determinar si las glicohidrolasas del abulón tienen este comportamiento, se realizaron estudios de sinergia entre cada grupo de enzimas purificadas. Con este fin, se determinó la actividad de cada enzima por separado y después de la mezcla de ellas (ver la determinación de las actividades celulolítica, alginolítica y agarolítica).

### ***Purificación de las glicohidrolasas del abulón azul, *H. fulgens****

#### **Cromatografía de intercambio aniónico de baja presión**

El extracto correspondiente al precipitado de 35-60 % de saturación de sulfato de amonio, y que contenía las actividades glicohidrolíticas, se dializó y aplicó en una columna de intercambio aniónico de DEAE-Sepharose (57 x 1.6 cm), equilibrada con amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 8. La cromatografía se llevó a cabo en un sistema LKB que consiste de: Un colector Ultrarac II, una bomba peristáltica Varioperpex, un monitor de absorbancia con filtro para 280 nm modelo Uvicord S y un registrador Pharmacia REC 2. La muestra se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0.0 a 1.0 M en el mismo amortiguador, a una velocidad de flujo de 9.5 ml/h, colectándose fracciones de 3 ml. Se siguió el mismo procedimiento con el precipitado de 65-100 % de saturación.

#### **Cromatografía de alta resolución**

Para la última etapa de purificación se empleó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) en un equipo Hewlett Packard 1100. Las fracciones con actividad glicohidrolítica que

se separaron por la columna de DEAE-Sepharose se aplicaron a una columna de intercambio aniónico POROS H/Q (4.6 x 100 mm) equilibrada con amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 8. Para la elución se usaron los gradientes de NaCl apropiados. La velocidad de flujo se ajustó a 3 ml/min.

### *Caracterización de las enzimas purificadas*

#### **Cuantificación de proteínas**

Se utilizó el método de Smith *et al.* [74], el cual emplea el reactivo BCA Protein Assay Reagent, que es muy sensible en la determinación espectrofotométrica de la concentración de proteína en soluciones acuosas, siguiendo el protocolo de PIERCE. Este sistema de reactivos combina la reacción de proteínas con  $\text{Cu}^{+2}$  en un medio alcalino (produciendo  $\text{Cu}^{+1}$ ), con un reactivo altamente selectivo y sensible de detección para  $\text{Cu}^{+1}$  llamado ácido bicinconínico. Este reactivo es estable y compatible con detergentes iónicos y no iónicos. El color púrpura del producto de la reacción es formado por la interacción de dos moléculas de BCA con un ion cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ), este es soluble en agua y exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm.

La cantidad de proteína contenida en la muestra se determinó interpolando el dato de absorbancia en una curva tipo elaborada con estándares de albúmina de bovino a diferentes concentraciones.

#### **Determinación de los valores óptimos de pH y temperatura para cada glicohidrolasa**

Para determinar el pH óptimo de cada glicohidrolasa purificada, se construyeron curvas de actividad sobre diferentes sustratos a diferentes valores de pH (2.5-10.0 con intervalos de 0.5 de unidad). Debido a que se observó que Cel I tenía mas afinidad por CMC, Cel II por papel filtro y Cel III por salicina, los sustratos utilizados fueron CMC, papel filtro y salicina para Cel I, II, y III respectivamente y alginato de sodio y agar para las alginasas y agarasas. Los amortiguadores empleados fueron: glicina-HCl (pH de 2.5-3.5), citrato de sodio-ácido cítrico (pH 3.0-6.0), Tris-HCl (pH 7.0-8.0) y glicina-NaOH (9.0-10.0). Después, se obtuvo una curva de actividad *versus* temperatura a los valores de pH óptimos encontrados. Los tiempos de incubación utilizados fueron de 20 min.

### **Determinación del peso molecular**

El peso molecular de las enzimas puras se determinó por electroforesis en microgeles homogéneos de SDS-poliacrilamida al 20 %, siguiendo el protocolo de Pharmacia. Para obtener la curva de calibración se emplearon patrones con masas moleculares conocidas desde 14,400 hasta 94,000 daltones (Pharmacia electrophoresis calibration kit). El procedimiento para fijar, teñir y desteñir fue el reportado por Neuhoff *et al.* [75]. La absorción y posición de las bandas se leyó en un densitómetro modelo GS-690 de Bio-Rad.

### **Espectrometría de masas**

Los espectros de masas de las diferentes glicohidrolasas fueron obtenidos por la Dra. Catherine Stacey de la compañía Bruker Daltonics Inc, Billirica, MA., U.S.A., utilizando la técnica de nanoelectrospray en un espectrómetro de masas de trampa de iones Esquiere (Brukers-Flanzen Analytical GmbH) como se describe en Jensen *et al.* [76]. De esta manera, se obtuvieron las masas moleculares de las glicohidrolasas y la secuencia de los primeros 29 residuos de Alg I.

### **Determinación del punto isoelectrico**

Se utilizaron geles de poli(acrilamida) (0.35 x 0.43 x 50 mm) con gradiente de pH de 3-9 en un equipo de electroforesis Phast System de Pharmacia. Para obtener la curva patrón se emplearon patrones con puntos isoelectricos conocidos de 3-9 (Pharmacia electrophoresis calibration kit). La absorción y posición de las bandas se determinó en un densitómetro modelo GS-690 de Bio-Rad.

### **Análisis de carbohidratos**

El contenido de azúcares de las enzimas puras fue estimado por el método del fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois *et al.* [77]. El fenol en presencia de ácido sulfúrico puede ser utilizado para la microdeterminación colorimétrica de azúcares y sus derivados metilados, oligosacáridos y polisacáridos. Este método es particularmente útil para la determinación de pequeñas cantidades azúcares. La cantidad de color producido a una concentración de fenol constante es proporcional a la cantidad de azúcar presente

### **Determinación de la composición de aminoácidos**

Los residuos presentes en las enzimas se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un equipo Hewlett Packard, utilizando una columna ODS-DABS C-18 (dp 5 m y 4.6 mm x 25 cm). Las muestras se hidrolizaron con HCl 6 N y 1 % de fenol (para evitar la degradación de la tirosina) a 110 °C por 24 h en una cámara de hidrólisis (Beckman), cerrada al vacío en presencia de argón.

A las muestras secas se les realizó la dabsilación con los protocolos y reactivos de Beckman (Dabs-Amino Acid Kit, Fullerton, CA, USA.) para análisis de aminoácidos por cromatografía de fase reversa. Con este método, la asparagina y glutamina son cuantitativamente hidrolizados hasta ácido aspártico y ácido glutámico además de existir una pérdida de serina y treonina de 10 % y 5 % respectivamente. Debido a que el triptofano es destruido por una hidrólisis ácida en HCl, para su determinación se realizó paralelamente una hidrólisis con ácido metanosulfónico 4 M en presencia de triptamina.

### **Determinación de la estructura secundaria**

La estructura secundaria de las glicohidrolasas puras se determinó por sus espectros de dicroísmo circular (CD). Dichos espectros se obtuvieron a 25 °C en un espectropolarímetro JASCO J-700, el cual se calibró con ácido (+)-10-canforsulfónico [78]. Los experimentos se realizaron con soluciones cuya concentración era de 0.25 mg/ml, en una celda de 1 mm para la región del ultravioleta (UV) lejano (183-260 nm). La elipticidad por residuo medio [ $\square$ ], se calculó utilizando una masa molecular de 110 g mol<sup>-1</sup> por residuo. Se obtuvieron curvas múltiples independientes, variando el estado de agregación de las enzimas, para evaluar el efecto de este en la conformación y contenido de estructura secundaria de las glicohidrolasas purificadas. Los espectros fueron analizados por medio de dos programas de desconvolución: 1) CCA (algoritmo de constreñimiento convexo)[79] y 2) Hennessey-Johnson [80], esto con el fin de estimar la composición de estructura secundaria de las enzimas y para determinar la clase de estructura terciaria se utilizó el programa DEFCLASS [81].

### **Estudios de dispersión dinámica de la luz**

Las partículas en solución se desplazan debido a movimientos brownianos. Esta movilidad está relacionada con el coeficiente de difusión y éste con el radio de la partícula. Iluminando

la partícula con un rayo láser, la intensidad de la luz dispersada a un ángulo dado puede ser seguida en el tiempo. Como la partícula se mueve, la señal medida fluctuará. Midiendo las fluctuaciones y el camino en el cual ellas cambian, el coeficiente de difusión de las partículas y, a partir de éste, el radio de la partícula pueden ser determinados con la ecuación de Stokes-Einstein. La dispersión dinámica de la luz (DLS) es una técnica que permite medir el coeficiente de difusión traslacional ( $D_T$ ) de una molécula o agregados en solución [82]. La dispersión de luz monocromática causada por las partículas en movimiento presentará fluctuaciones en su intensidad debido al movimiento browniano de las moléculas o agregados en solución.

El análisis del decaimiento de la función de autocorrelación esto es, una medición de las fluctuaciones de la intensidad en función del tiempo correspondiente a la señal de la intensidad dispersada, proporcionará información cuantitativa acerca del comportamiento en solución de los agregados moleculares.  $D_T$  se relaciona con el radio hidrodinámico ( $R_H$ ) a través de la ecuación de Stokes-Einstein :

$$D_T = k_B T / 6\pi\eta R_H$$

Donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $\eta$  es la viscosidad de la solución,  $T$  es la temperatura absoluta y  $R_H$  el radio hidrodinámico [83-85].

Además, es posible determinar el peso molecular por medio de la ecuación de Mark Houwink  $D_T = A_0 M^{\nu}$  Ésta considera la relación directamente proporcional del coeficiente de difusión traslacional con el peso molecular  $M$ , elevado a una potencia específica. Así, la constante de proporcionalidad que surge de esta ecuación toma en cuenta las propiedades del disolvente y se representa por  $A_0$ . Esta ecuación requiere de una estimación adecuada del factor de estructura ( $\nu$ ), que para el caso particular de proteínas esféricas tiene un valor de 0.33 y se aplica también a modelos quasi-esféricos [86].

De esta manera, con técnicas de DLS es posible determinar: el coeficiente de difusión, el radio hidrodinámico, el peso molecular y la polidispersidad (pureza) de la proteína.

En este estudio se evaluó el comportamiento de las diferentes glicohidrolasas, a fin de caracterizar su comportamiento en solución, analizando los cambios en polidispersidad y en el peso molecular con respecto a factores como son pH, temperatura, concentración de la



proteína y el efecto de diferentes agentes como son el polietilenglicol 6000 (PEG-6000), sorbitol y manitol. Para este tipo de estudios se utilizó un equipo de dispersión dinámica de luz DynaPro-801 (Protein Solutions, Co.) y el paquete computacional Dynamics. Cada una de las enzimas puras (300 µl), en diferentes condiciones de concentración, pH y con diferentes aditivos como el PEG-6000, manitol y sorbitol, se inyectaron a través de filtros Anotop 10 de 0.02 µm (Wathman) en el equipo mencionado.

### ***Cristalización de las glicohidrolasas***

Para el análisis estructural por rayos X se requiere que la molécula sea purificada a un alto grado de homogeneidad y sea cristalizada en forma adecuada para la obtención de datos. Esto es, se requiere obtener cristales mayores a 0.2 mm, que difracten adecuadamente los rayos X y que posean la suficiente estabilidad para que sus patrones de difracción no decaigan durante el tiempo que dura el experimento. De hecho, la obtención de los cristales es la etapa más crítica para la determinación de la estructura tridimensional de proteínas por el método de difracción de rayos X.

Para inducir la cristalización es necesario llevar muy lentamente el sistema soluto-disolvente a un estado de solubilidad mínima y así alcanzar un grado limitado de sobresaturación [87]. Para lograr esto es necesario considerar todas las variables que afectan la cristalización como son: concentración de la proteína, temperatura, pH, fuerza iónica, presencia de aditivos específicos y de agentes precipitantes. Estos últimos pueden ser de tres tipos, 1) sales como el sulfato de amonio, 2) precipitantes orgánicos de volatilidad baja como el 2-metil-2, 4-pentanodiol (MPD) y 3) polietilenglicol de diferentes pesos moleculares.

El método de difusión de vapor es el más popular y ha demostrado ser el más útil para el estudio de numerosas condiciones con cantidades mínimas de proteína. Existen dos técnicas que utilizan la difusión de vapor: la de la “gota asentada” y la de la “gota suspendida” [88]. Esta última fue la que se empleó para intentar la cristalización de las hidrolasas. Con este método, la solución de proteína y el agente precipitante se colocan en cubreobjetos siliconizado. Por otro lado, a un pozo o recipiente pequeño (generalmente se usan cajas Limbro) se agrega 1 ml de la solución de agente precipitante a una concentración del doble de la que se encuentra en la solución de proteína y se le aplica grasa de vacío en la parte superior del pozo. El cubreobjetos se coloca arriba del pozo, de tal forma que la gota de proteína queda

suspendida en el interior y finalmente se sella con la grasa. Al llegar a un equilibrio de presiones de vapor, la solución conteniendo a la proteína tiende a alcanzar un grado limitado de sobresaturación [89]. Estas condiciones pueden modificarse a fin de optimizarlas y lograr obtener cristales apropiados para los estudios de difracción de rayos X.

Las pruebas de cristalización de las diferentes glicohidrolasas se montaron utilizando una concentración de proteína de 2.5 mg/ml. Se colocaron gotas de 7  $\mu$ l las cuales no contenían agente precipitante, lo cual permitió que la saturación fuera más lenta. Además, sólo se colocaron 450  $\mu$ l del agente precipitante, en el receptáculo inferior, con el fin de aumentar aún más el tiempo en que se alcanzó la saturación. Estas pruebas se colocaron a 18 °C, en cámaras de temperatura controlada.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### *Purificación*

#### **Celulasas**

Las celulasas de bacterias y hongos han sido ampliamente estudiadas. Sin embargo, muy recientemente se empezaron a estudiar enzimas capaces de hidrolizar celulosa de otras fuentes como son los órganos digestivos de insectos [90] y moluscos [91,92]. En 1999, Xue y colaboradores describieron la purificación parcial de una celulasa del hervíboro marino *Cherax quadricarinatus* [93].

En un intento por profundizar en el conocimiento de este tipo de enzimas, en este trabajo se estudiaron las celulasas presentes en el hepatopáncreas del abulón azul, *H. fulgens*. Después de realizar la precipitación fraccionada con sulfato de amonio, se observó que la fracción de 35-65% de saturación contenía la actividad celulolítica. Esta fracción se aplicó en una columna de intercambio aniónico, obteniendo el perfil de elución que se muestra en la Figura 5. La actividad celulolítica sobre CMC se encontró en 3 fracciones, las que se nombraron Cel I, Cel II y Cel III. Posteriormente, estas fracciones fueron purificadas por cromatografía de intercambio aniónico, utilizando columnas de perfusión. Para obtener las fracciones puras, fue necesario recircular las fracciones en la misma columna, la Figura 7 muestra el perfil obtenido después de dicha recirculación. Cada celulasa purificada mostró una sola banda en los geles

suspendida en el interior y finalmente se sella con la grasa. Al llegar a un equilibrio de presiones de vapor, la solución conteniendo a la proteína tiende a alcanzar un grado limitado de sobresaturación [89]. Estas condiciones pueden modificarse a fin de optimizarlas y lograr obtener cristales apropiados para los estudios de difracción de rayos X.

Las pruebas de cristalización de las diferentes glicohidrolasas se montaron utilizando una concentración de proteína de 2.5 mg/ml. Se colocaron gotas de 7  $\mu$ l las cuales no contenían agente precipitante, lo cual permitió que la saturación fuera más lenta. Además, sólo se colocaron 450  $\mu$ l del agente precipitante, en el receptáculo inferior, con el fin de aumentar aún más el tiempo en que se alcanzó la saturación. Estas pruebas se colocaron a 18 °C, en cámaras de temperatura controlada.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### *Purificación*

#### **Celulasas**

Las celulasas de bacterias y hongos han sido ampliamente estudiadas. Sin embargo, muy recientemente se empezaron a estudiar enzimas capaces de hidrolizar celulosa de otras fuentes como son los órganos digestivos de insectos [90] y moluscos [91,92]. En 1999, Xue y colaboradores describieron la purificación parcial de una celulasa del hervívoro marino *Cherax quadricarinatus* [93].

En un intento por profundizar en el conocimiento de este tipo de enzimas, en este trabajo se estudiaron las celulasas presentes en el hepatopáncreas del abulón azul, *H. fulgens*. Después de realizar la precipitación fraccionada con sulfato de amonio, se observó que la fracción de 35-65% de saturación contenía la actividad celulolítica. Esta fracción se aplicó en una columna de intercambio aniónico, obteniendo el perfil de elución que se muestra en la Figura 5. La actividad celulolítica sobre CMC se encontró en 3 fracciones, las que se nombraron Cel I, Cel II y Cel III. Posteriormente, estas fracciones fueron purificadas por cromatografía de intercambio aniónico, utilizando columnas de perfusión. Para obtener las fracciones puras, fue necesario recircular las fracciones en la misma columna, la Figura 7 muestra el perfil obtenido después de dicha recirculación. Cada celulasa purificada mostró una sola banda en los geles

de SDS-PAGE (Figura 13A).

La Tabla 1 muestra los rendimientos y las actividades específicas en los diferentes pasos de purificación. El rendimiento fue similar para las tres celulasas y la cantidad (mg) obtenida de cada una fue alta comparada con las reportadas para celulasas de otras fuentes [94,95]. Las tres celulasas mostraron actividad sobre CMC, sin embargo, Cel I mostró la mayor afinidad por este sustrato. En general, estas enzimas mostraron actividades específicas que fueron de 2 a 10 veces mayores que las más altas reportadas para celulasas de otros organismos [94-96]. A las tres celulasas se les verificó su pureza por SDS-PAGE y enfoque isoelectrico, donde una sola banda fue observada para cada una de ellas. Cel II presentó una segunda banda muy diluida en el gel de SDS-PAGE con una masa molecular que corresponde al dímero (Figura 13A y 13B). La homogeneidad fue comprobada posteriormente por DLS.

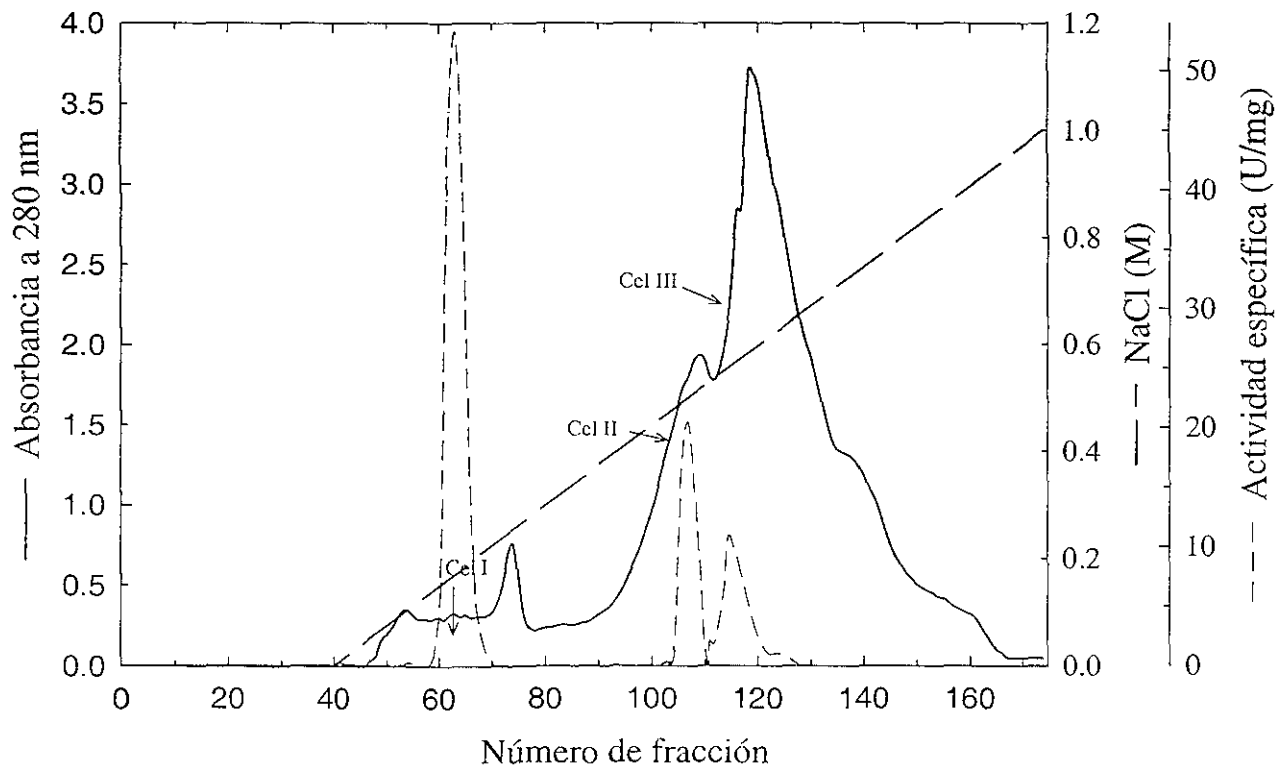


Figura 6. Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sepharose) de la precipitación con sulfato de amonio (35-65 % de saturación), del extracto del hepatopáncreas del abulón. Se encontraron tres fracciones con actividad sobre CMC (Cel I, Cel II y Cel III).

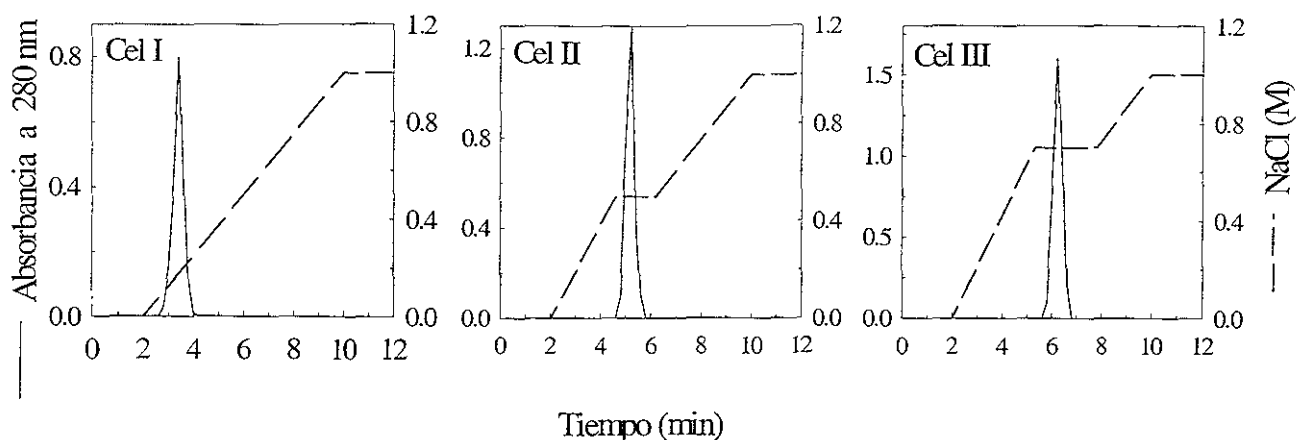


Figura 7. Purificación de las celulasas Cel I (A), Cel II (B) y Cel III (C) por cromatografía de intercambio aniónico en una columna POROS HQ/H (4.6 x 100 mm). Los perfiles de elución corresponden a la recirculación de cada una de la enzimas en la misma columna, pero variando el gradiente de NaCl.

Tabla 1. Purificación de las tres celulasas del abulón azul, *H. fulgens*.

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Actividad específica <sup>a</sup> (U/mg)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	1240	14.8	100
Precipitación con sulfato de amonio (35-65 % de saturación)	720	23.3	91.5
DEAE-Sepharose			
Cel I	110.3	53.3	32.0
Cel II	230.4	20.4	25.61
Cel III	239.6	13.7	17.86
HPLC-POROS HQ/H (recirculación)			
Cel I	8.0	433.3	18.9
Cel II	17.4	187.3	17.8
Cel III	20.2	102.6	11.3

<sup>a</sup>Una unidad fue definida como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa por minuto a 45 °C. Las actividades fueron determinadas usando CMC como sustrato.

## Alginasas

En el caso de las alginasas, éstas se han empezado a estudiar muy recientemente con mayor detalle debido a su amplia aplicación; sin embargo, son muy pocos los estudios que existen a la fecha sobre ellas y todas de origen bacteriano. Las alginasas de origen diferente al bacteriano sólo se han estudiado en extractos crudos, o con proteínas parcialmente purificadas [64,65].

En este estudio, se purificaron y caracterizaron fisicoquímica y estructuralmente 2 alginasas del hepatopáncreas de *H. fulgens*. La actividad alginolítica se detectó en la fracción de 35-65% de saturación de sulfato de amonio y en la de 65-100 %. Las Figuras 8 y 9 muestran los perfiles de elución obtenidos después de aplicar cada extracto en una columna de intercambio aniónico. Se encontró una sola fracción con esta actividad en cada extracto, a las que se nombró Alg I (a la extraída de la precipitación de 35-65 %) y Alg II (a la obtenida con el precipitado de 65-100 %). Posteriormente, estas fracciones se purificaron por cromatografía de intercambio aniónico utilizando columnas de perfusión (Figura 10). Cada alginasa purificada mostró una sola banda en los geles de SDS-PAGE (Figura 14A) después de haber sido recirculada en la misma columna. En la Tabla 2 se puede observar que los rendimientos fueron altos. La actividad específica es la mayor reportada a la fecha para alginasas de cualquier fuente, siendo ésta hasta 10 veces mayor que las alginasas de bacterias terrestres [10,58,59] y 2 veces mayor que la de la bacteria marina *Bacillus sp* [55]. Cabe señalar, que en ausencia de NaCl presente en el amortiguador de elución, era necesario adicionar sorbitol al 2%, de lo contrario la actividad se perdía en un período de 20 h a temperatura ambiente, y de 10 h a 4 °C, en el amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 8. Dicha pérdida de actividad era debida a fuertes fenómenos de agregación (ver estudios de dispersión dinámica de la luz).

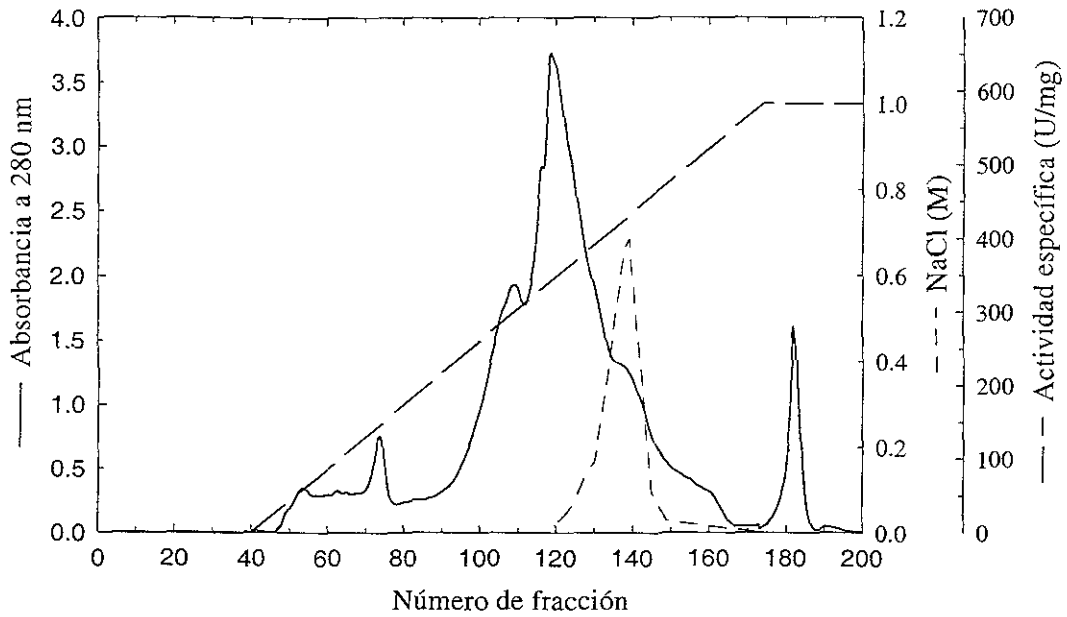


Figura 8. Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sepharose) de la precipitación con sulfato de amonio (35-65 % de saturación). Se encontró una fracción con actividad sobre alginato de sodio a la que se nombró Alg I.

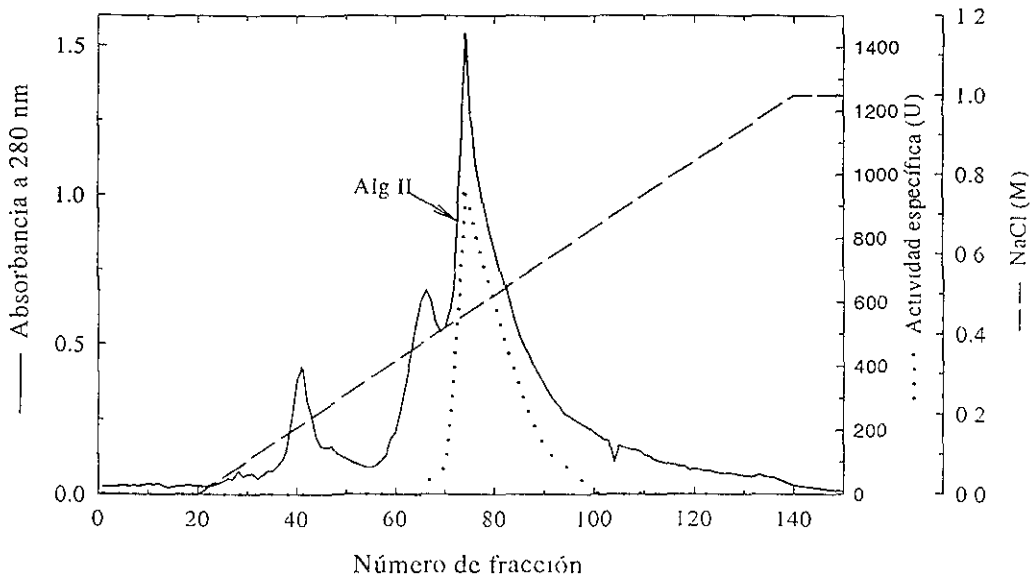


Figura 9. Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sepharose) de la precipitación con sulfato de amonio (100 % de saturación). Se encontró una fracción con actividad sobre alginato de sodio (Alg II).

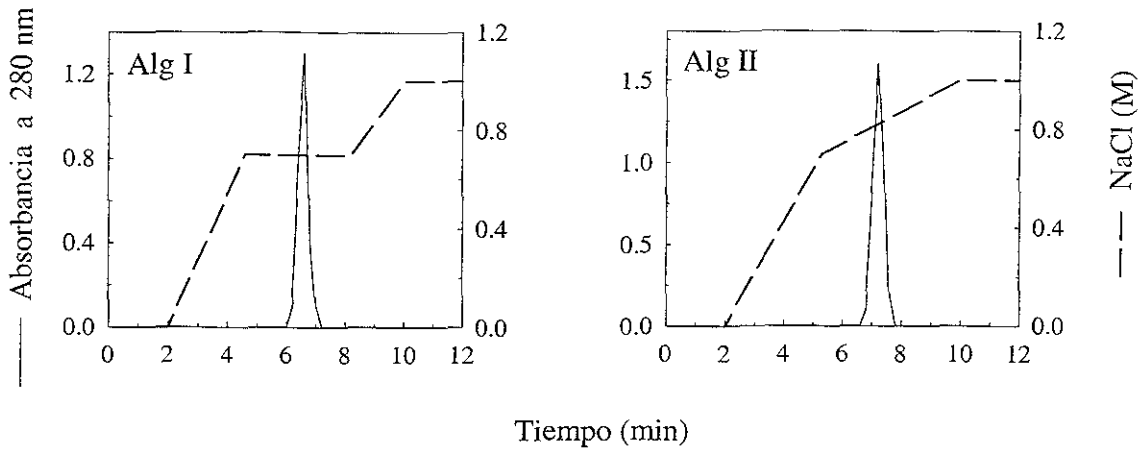


Figura 10. Purificación de las alginasas Alg I y Alg II por cromatografía de intercambio aniónico en una columna POROS HQ/H (4.6 x 100 mm). Los perfiles de elución corresponden a la recirculación de cada una de ellas en la misma columna.

Tabla 2. Purificación de las alginasas del abulón azul *H. fulgens*.

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Actividad específica <sup>a</sup> (U/mg)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	1240.0	50.6	100.0
Precipitación con sulfato de amonio (35-65 % de saturación)	720.0	60.2	55.0
Precipitación con sulfato de amonio (65-100 % de saturación)	410.0	72.4	43.0
DEAE-Sepharose			
Alg I	174.5	400.2	30.5
Alg II	148.9	523.5	35.4
HPLC-POROS HQ/H			
Alg I	39.1	813.4	25.4
Alg II	28.0	910.6	22.1

<sup>a</sup>Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima requerida para producir un  $\mu\text{mol}$  de  $\beta$ -formilpiruvato por min a 45 °C. Las pruebas de actividad se realizaron utilizando como sustrato alginato de sodio sin acetilar.



## Agarosas

Dentro de las glicohidrolasas purificadas en este trabajo, las agarosas son las menos estudiadas. A la fecha sólo existen algunos reportes de este tipo de enzimas y sólo las de *Pseudomonas atlantica*, *Alteromonas agarolyticus* y *Vibrio sp* han sido estudiadas más profundamente [18-20,30,66]. Las agarosas de origen diferente al bacteriano sólo han sido estudiadas en extractos crudos debido a la pérdida de actividad agarolítica en tiempos muy cortos. En el presente estudio, las agarosas de *H. fulgens*, fueron purificadas a partir del extracto de la precipitación de 35-65 % de saturación con sulfato de amonio. Las agarosas fueron purificadas en presencia de sorbitol debido a que se agregaban fuertemente y perdían la actividad en 4 h a 4 °C en el amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 8. En la Figura 11 se muestra el perfil de elución obtenido después de aplicar el extracto en una columna de intercambio aniónico. Se encontraron dos fracciones con actividad agarolítica las cuales se nombraron Ag I y Ag II. Estas fracciones fueron purificadas posteriormente por cromatografía de intercambio aniónico en columnas de perfusión. Fue necesario recircular las fracciones en la misma columna para obtenerlas puras. La Figura 12 muestra los perfiles de elución de dichas recirculaciones. Las agarosas purificadas mostraron una sola banda en los geles de SDS-PAGE (Figura 15A), después de haber sido recirculadas en la misma columna. En la Tabla 3 se puede observar que los rendimientos fueron bastante altos. La actividad específica es la mayor reportada a la fecha para agarosas de otras fuentes, siendo esta hasta 4 veces mayor que las agarosas de origen bacteriano [20,22,32,68].

En general, podemos decir que en cuanto a rendimiento y actividad específica, los tres tipos de glicohidrolasas del abulón, presentan valores altos, lo que las hace muy importantes desde el punto de vista de su aplicación y explotación. Es importante notar que para los cálculos de la tabla de rendimiento de éstas glicohidrolasas, se utilizó el hepatopáncreas de un sólo abulón, por lo que se pueden obtener grandes cantidades de estas enzimas de los desechos del procesado de este molusco tanpreciado.

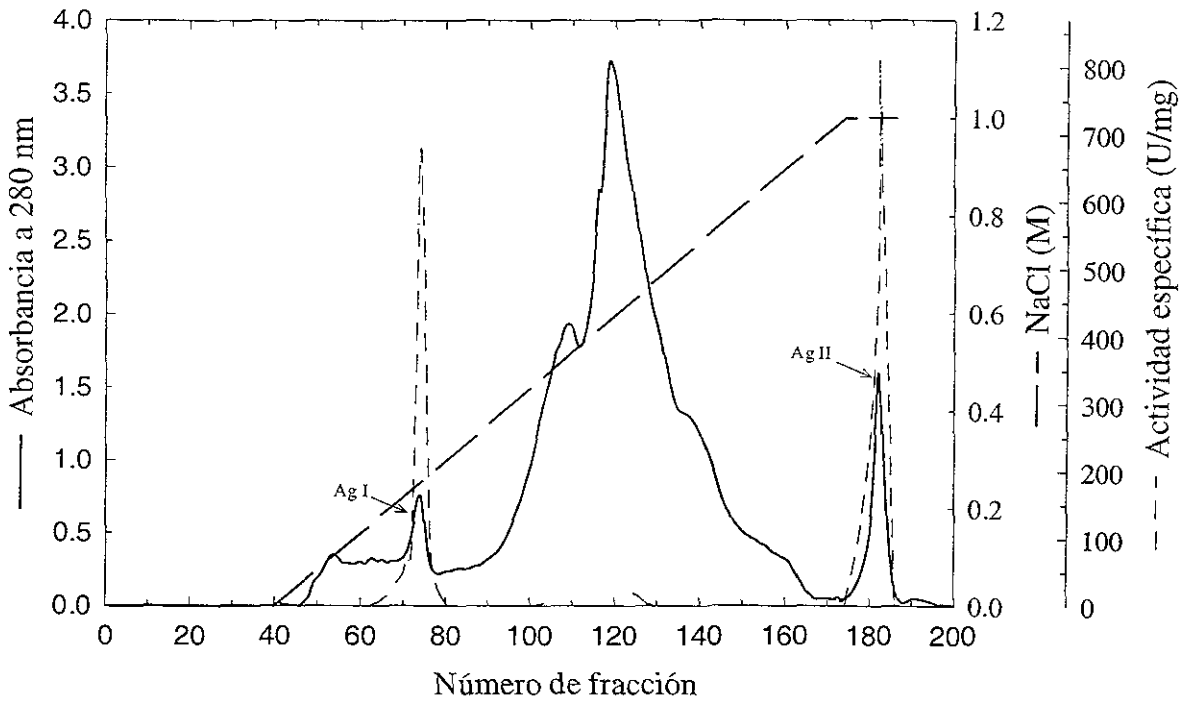


Figura 11. Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sepharose) de la precipitación con sulfato de amonio (35-65 % de saturación). Se encontraron dos fracciones con actividad sobre agar (Ag I y Ag II).

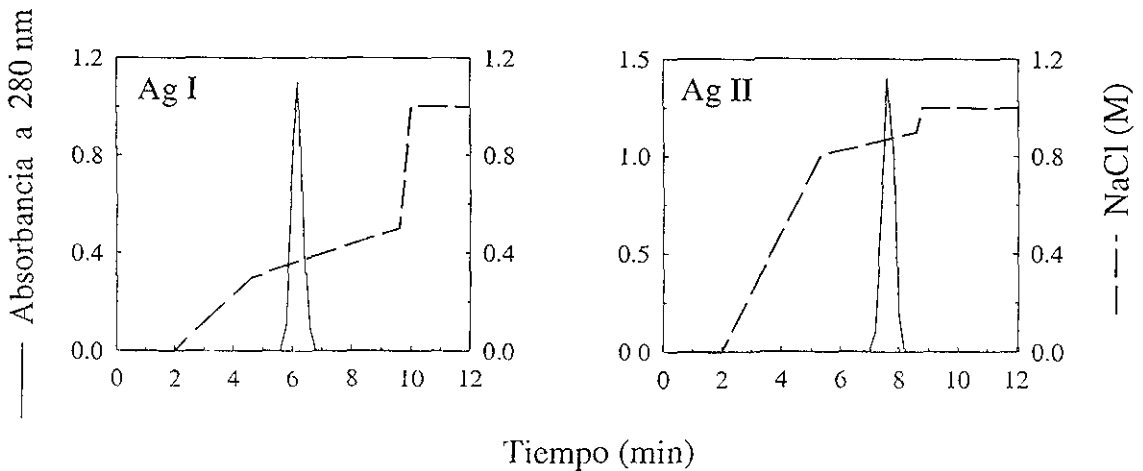


Figura 12. Purificación de las agarasas Ag I (A), y Ag II (B) por cromatografía de perfusión en una columna POROS HQ/H (4.6 x 100 mm).

Tabla 3. Purificación de las agarasas de *H. fulgens*.

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Actividad específica <sup>a</sup> (U/mg)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	1240.0	0.6	100.0
Precipitación con sulfato de amonio (35-65 % de saturación)	720.0	2.4	85.0
DEAE-Sepharose			
Ag I	187.7	7.8	32.2
Ag II	93.8	8.6	43.2
HPLC-POROS HQ/H (recirculación)			
Ag I	29.9	680.0	23.4
Ag II	16.8	810.0	32.2

<sup>a</sup>Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima requerida para producir un  $\mu\text{mol}$  de galactosa por min a 45 °C. Las pruebas de actividad se realizaron utilizando agar como sustrato.

## Caracterización

### Determinación de la masa molecular y punto isoeléctrico

El peso molecular de las glicohidrolasas purificadas se estimó por diferentes métodos. Cabe señalar que para determinar este parámetro utilizando DLS fue necesario hacer primero los estudios de desagregación. Como puede observarse en la Tabla 4, los valores de peso molecular obtenidos con las diferentes técnicas son muy similares. En el caso de la filtración en gel es necesario adicionar NaCl (0.3 M) al amortiguador, ya que de lo contrario las enzimas forman agregados de pesos moleculares muy elevados. Debido a esta agregación, fue imposible determinar el peso molecular de las agarasas y alginasas por éste método. Los valores de peso molecular, de estas enzimas son comparables a los obtenidos para celulasas de otros organismos [97-101]. Sin embargo, Cel I tiene uno de los pesos moleculares más bajos reportados a la fecha (17 300 Da).

Los valores de masa molecular de las alginasas son de los más pequeños reportados, aunque comparables con los obtenidos para *Sphingomonas sp* [59]. De igual manera, los valores de masas molecular de las agarasas (29 200 y 33 300 Da para Ag I y II respectivamente) son comparables a los obtenidos para agarasas de origen bacteriano [20,32,68], aunque están entre los más pequeños reportados a la fecha. Así mismo, se puede observar en esta Tabla que las 7 glicohidrolasas resultaron ser ácidas. Los puntos isoeléctricos de las celulasas son semejantes

a los reportados para celulasas de hongos [94,95,97]. En el caso de las agarasas los valores de punto isoeléctrico son semejantes a los de bacterias [20,32].

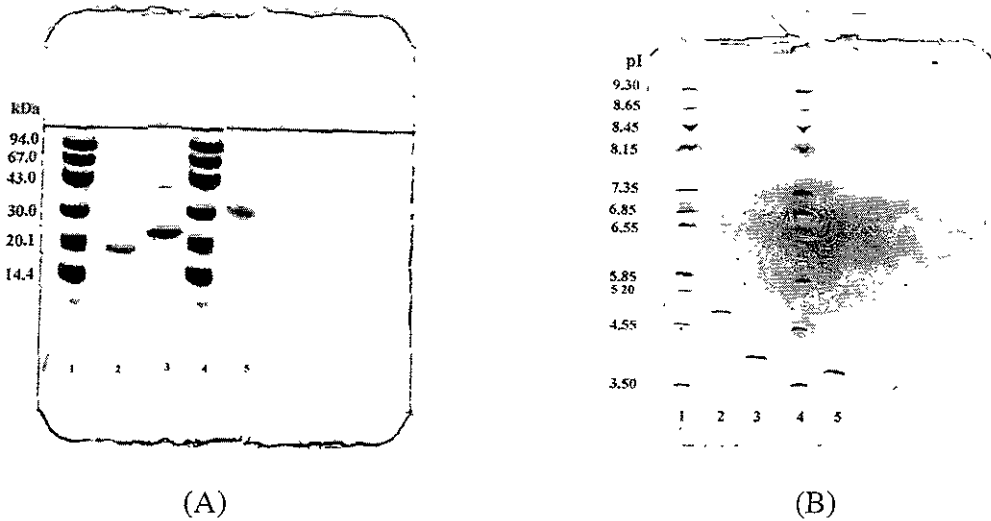


Figura 13. A) SDS-PAGE de las celulasas purificadas de *H. fulgens* B) Enfoque isoeléctrico. Los carriles 1 y 4 corresponden a los estándares de masa molecular conocida. Los carriles 2, 3 y 5 contienen Cel I (0.9  $\mu\text{g}$ ), Cel II (1.5  $\mu\text{g}$ ) y Cel III (1.25  $\mu\text{g}$ ) respectivamente.

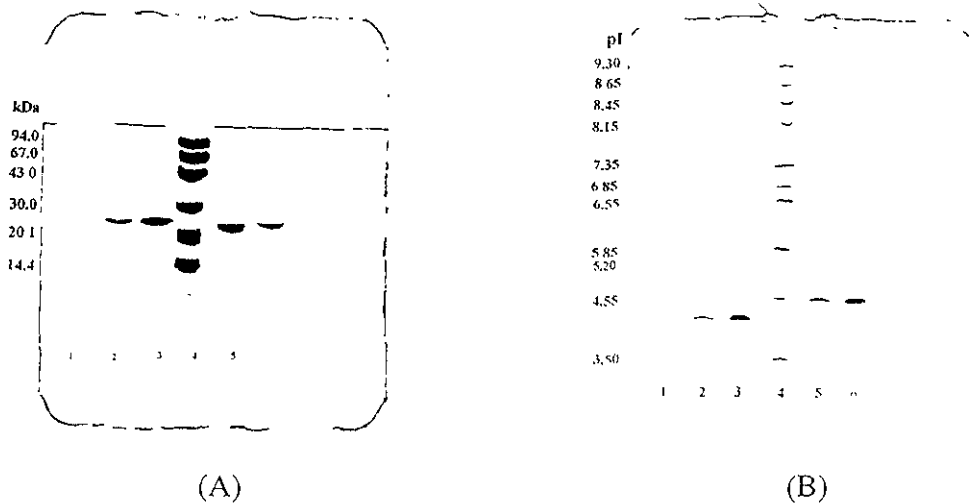
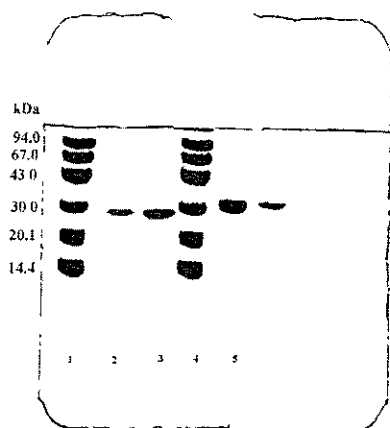
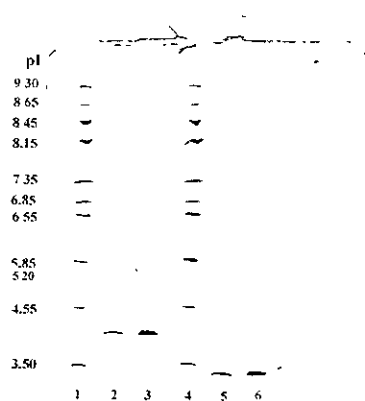


Figura 14. A) SDS-PAGE de las alginasas purificadas, B) Enfoque isoeléctrico. El carril 4 corresponde a los estándares de masa molecular conocida. Los carriles 2 y 3 contienen Alg I con concentraciones de 1.8 y 3.0  $\mu\text{g}$  respectivamente. Los carriles 5 y 6 contienen Alg II en las mismas concentraciones.



(A)



(B)

Figura 15. A) SDS-PAGE de las agarasas purificadas, B) Enfoque isoelectrico. Los carriles 1 y 4 corresponden a los estándares. Los carriles 2 y 3 contienen Ag I con concentraciones de 2.1 y 3.2  $\mu\text{g}$  respectivamente. Los carriles 5 y 6 contienen Ag II en las mismas concentraciones.

Tabla 4. Punto isoelectrico y masa molecular de las enzimas purificadas determinados por diferentes métodos

Enzima	Punto isoelectrico	Masa molecular (Da)			
		SDS-PAGE	Filtración en gel (HPLC)	Dispersión dinámica de luz	Espectrometría de masas
Cel I	$4.9 \pm 0.2$	$17\,900 \pm 100$	$17\,500 \pm 120$	$18\,000 \pm 110$	$17\,300 \pm 20$
Cel II	$4.0 \pm 0.2$	$22\,500 \pm 100$	$22\,700 \pm 120$	$22\,600 \pm 110$	$21\,400 \pm 20$
Cel III	$3.6 \pm 0.2$	$30\,300 \pm 100$	$30\,600 \pm 120$	$30\,500 \pm 110$	ND
Alg I	$4.3 \pm 0.1$	$26\,000 \pm 110$	ND	$26\,500 \pm 120$	$25\,500 \pm 20$
Alg II	$4.9 \pm 0.1$	$24\,500 \pm 110$	ND	$24\,600 \pm 120$	$23\,700 \pm 20$
Ag I	$4.2 \pm 0.2$	$29\,500 \pm 115$	ND	$29\,500 \pm 115$	$29\,200 \pm 20$
Ag II	$3.0 \pm 0.2$	$33\,500 \pm 115$	ND	$34\,000 \pm 115$	$33\,300 \pm 20$

ND: No se determinó

### Pruebas de especificidad

Para analizar la especificidad de las celulasas purificadas, se probaron diferentes sustratos incluyendo polisacáridos naturales de origen marino. Como ya se mencionó antes, las tres celulasas mostraron actividad sobre CMC ( $433 \pm 4$ ,  $187 \pm 3$  y  $102 \pm 3$  U/mg para Cel I, Cel II y Cel III, respectivamente). Además, Cel II presentó actividad sobre papel filtro ( $102 \pm 3$  U/mg),

*pNPC* ( $95.5 \pm 3$  U/mg) y *pNPL* ( $74.5 \pm 2$  U/mg). Estos valores son similares a otros reportados para exocelulasas. Por otro lado, Cel III es activa sobre CMC, papel filtro ( $20 \pm 2$  U/mg), salicina ( $95 \pm 4$  U/mg), *pNPC* ( $32.3 \pm 2$  U/mg) y *pNPG* ( $52.5 \pm 3$  U/mg). Con base en estos resultados, podemos decir que Cel I es una endocelulasa (endoglucanasa). Cel II y Cel III mostraron una menor especificidad, Cel II tuvo actividad de endo y exocelulasa, mientras que Cel III puede ser considerada como una endo, exo y  $\beta$  glucanasa [24,71].

La especificidad de las alginasas se evaluó midiendo su actividad sobre alginatos acetilados y sin acetilar. Alg I mostró actividad sólo con alginato sin acetilar ( $813 \pm 3U$ ), mientras que Alg II mostró actividad tanto sobre alginato desacetilado ( $910 \pm 4U$ ) y en menor grado sobre el acetilado ( $110 \pm 3U$ ). Además, Alg I mostró una preferencia por bloques M, por lo que se le considera una poli (M) liasa. mientras que Alg II por los G, aunque también mostro actividad sobre los M, siendo esta menor por lo que se considera que tiene actividad de poli (G) liasa y de poli (M) liasa. A este respecto, sólo existen estudios con *Azotobacter vinelandii* y *A. chroococcum* [60,61], donde existe una preferencia por los bloques M, y de otra alginasa tambien de *A. vinelandii*, la cual hidroliza los bloques M-M y M-G [8].

Para evaluar la especificidad de las agarasas purificadas, se realizaron pruebas de actividad con los sustratos sintéticos: *p*-nitrofenol  $\alpha$ -galactósido y *p*-nitrofenol  $\beta$ -galactósido. Ag I mostró actividad sobre *p*-nitrofenol  $\beta$ -galactósido, mientras que Ag II sobre el sustrato cromogénico con enlace  $\alpha$ . De esta manera se determinó que Ag I es una  $\beta$  agarasa, mientras que Ag II es una  $\alpha$  agarasa.

Por otro lado, al mezclar las enzimas purificadas, se observó un efecto sinérgico, igual al que se ha reportado en celulasas de origen bacteriano y de hongos [22,23]. En la Tabla 5 se observa que mezclando los tres tipos de celulasas, se obtiene la mayor cantidad de azúcares reductores, aún más que las sumas individuales. Cabe señalar, que Cel I y Cel II sólo muestran actividad hasta una cierta cantidad de azúcares reductores, esto es, porque la celobiosa formada por la hidrólisis de la celulosa, es un fuerte inhibidor de las endo y exocelulasas. Al adicionar Cel III, la cual puede hidrolizar la celobiosa, hasta glucosa, la actividad se incrementa, ya que además de hidrolizar la celobiosa, permite que Cel I y Cel II vuelvan a activarse. En esta misma Tabla se observa el efecto sinérgico entre las agarasas y alginasas. De esta manera se observa que *H. fulgens* cuenta con sistemas enzimáticos muy eficientes para

la hidrólisis de los principales polisacáridos presentes en las macroalgas. Lo que le permite asimilarlos. Esto es de suma importancia, si consideramos que su principal fuente de alimentación son las macroalgas, las cuales contienen altas cantidades de celulosa, agar y alginato.

En una revisión realizada en 1996 por Warren [45], se menciona que sistemas multienzimáticos semejantes a los de las celulasas se han reportado para agarasas, en donde se requiere de la actividad de las dos enzimas para la hidrólisis completa del agar. No se sabe si estas se encuentran en un complejo parecido al celulosoma o si se encuentran libres formando sistemas multienzimáticos. Sin embargo, su tendencia a agregarse puede darnos un indicio de que trabajan como sistemas multienzimáticos.

Tabla 5. Sinergia entre las glicohidrolasas purificadas.

Enzima	Actividad específica (U/mg)
Cel I	350 ±4
Cel II	170 ±3
Cel III	93 ±3
Cel I y Cel II	590 ±2
Cel I y Cel III	518 ±3
Cel II y Cel III	307 ±2
Cel I, Cel II y Cel III	845 ±2
Alg I	813 ±3
Alg II	910 ±4
Alg I y Alg II	2015 ±3
Ag I	680 ±4
Ag II	810 ±3
Ag II y Ag II	1890 ±3

Las pruebas de actividad se realizaron utilizando celulosa microcristalina, alginato de sodio sin acetilar y agar como sustratos para las actividades celulolítica, alginolítica y agarolítica, respectivamente.

### Efecto de la temperatura y pH en la actividad de las glicohidrolasas purificadas

Cuando se analizó el efecto del pH en la actividad de las glicohidrolasas, se encontró que utilizando CMC como sustrato, las 3 celulasas tienen un óptimo de actividad a pH 5.5. Este valor fue el mismo cuando Cel III hidrolizó salicina. No obstante, cuando se probó la actividad de Cel II sobre papel, el óptimo fue de 8.8. Esto puede deberse a que, en estas

condiciones, este sustrato insoluble es más susceptible a hidrólisis. En la Figura 16 se puede observar que cuando se disminuye el pH por debajo de 5.5 para Cel I y III, y de 8 para Cel II, la actividad disminuye drásticamente, esto ocurre debido a que nos estamos acercando al punto isoeléctrico de las enzimas. Además, correlacionando estos estudios con los de dispersión dinámica de luz (ver adelante), en estas condiciones, las enzimas están excesivamente agregadas e incluso se precipitan por dicha agregación. Por otro lado, cuando se evaluó el efecto de la temperatura en su actividad, se observó que las tres enzimas muestran mayor actividad celulolítica a 45 °C utilizando CMC y salicina como sustrato, mientras que sobre papel el óptimo fue a 37 °C (Figura 16).

Estudios similares se realizaron con las alginasas y agarasas. En el caso de las alginasas, estas tienen un óptimo a pH 8.0 y 4.0 para Alg I y II respectivamente. Los valores de actividad a diferentes valores de pH reportados para alginasas, están cercanos al pH neutro, aunque hay un intervalo bastante amplio de valores desde 4 hasta 8.5 [7]. La temperatura óptima a estos valores de pH fue de 45 °C para las dos alginasas. En otras especies, estos valores oscilan entre 30 y 45 °C. Las agarasas fueron más activas a una temperatura de 45 °C y pH de 5.5.

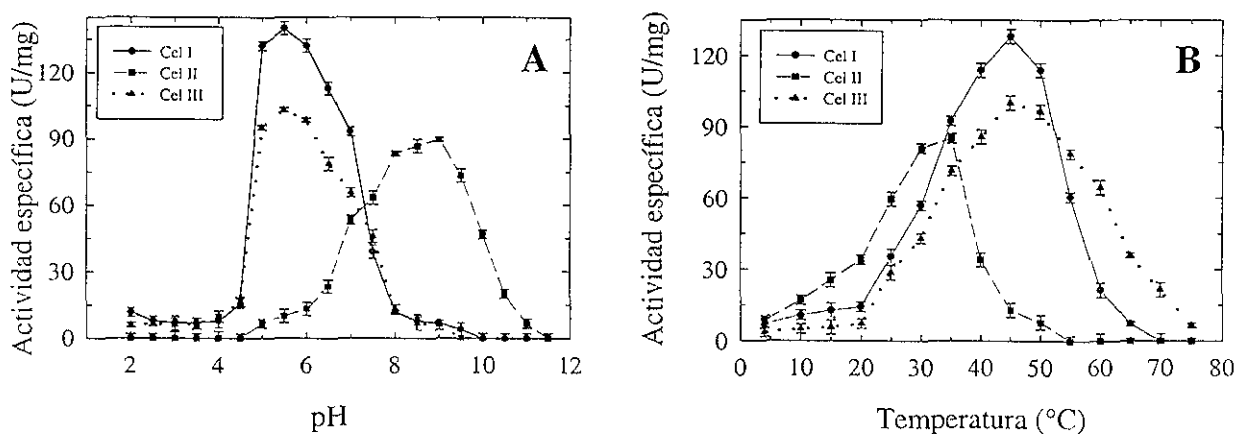


Figura 16. Efecto del pH y la temperatura en la actividad específica de las 3 celulasas purificadas. A) Efecto del pH, B) Efecto de la temperatura. En ambos casos, el tiempo de incubación fue de 20 min.



## **Contenido de carbohidratos**

Al cuantificar el contenido de carbohidratos de las enzimas puras, se determinó que Cel II, Cel III, las dos agarasas y las dos alginasas son glicoproteínas. El contenido de carbohidratos de estas enzimas fue de 3.8, 4.5, 7.0, 10.0, 9.0 y 15.0 % para Cel II, Cel III, Alg I, Alg II, Ag I y Ag II respectivamente. Cel I no contiene carbohidratos. En general, las glicoproteínas contienen oligosacáridos unidos covalentemente, estos se pueden encontrar en cantidades variables pudiendo tener cantidades tan altas como 60%. Una gran cantidad de glicohidrolasas contienen carbohidratos dentro de su estructura. El contenido de carbohidratos de las glicohidrolasas de *H. fulgens* es muy similar a los de otras glicohidrolasas. Estos carbohidratos podrían estar favoreciendo la agregación de estas enzimas al interaccionar unos con otros.

## **Estimación del contenido de aminoácidos**

En la Tabla 6 se presenta la composición de aminoácidos de las tres celulasas purificadas y una comparación con dos enzimas relacionadas, pero de otra fuente. En esta se puede observar que Cel I, II y III son muy similares y que en los tres casos, los aminoácidos ácidos e hidrofóbicos son los más abundantes. No obstante, Cel I difiere de Cel II y III con respecto al contenido de Gly, Phe y Glx. Las tres celulasas de *H. fulgens* difieren de otras de diferente fuente principalmente en su contenido de cisteína, metionina, prolina e histidina [99,92]. Además, se muestra el contenido de aminoácidos de las dos alginasas y las dos agarasas. Las glicohidrolasas del abulón azul mostraron en general contenidos muy similares, predominando siempre la glicina y la prolina. Esta semejanza en el contenido de aminoácidos puede dar un indicio de que estas enzimas pertenecen a familias muy relacionadas.

Tabla 6. Composición de aminoácidos como porcentaje molar de las glicohidrolasas de *H. fulgens*.

Aminoácidos	Cel I	Cel II	Cel III	EG <sup>1</sup>	E2 <sup>2</sup>	Alg I	Alg II	Ag I	Ag II
Lys	4.3	3.5	2.1	2.6	1.7	4.1	3.0	4.3	3.5
His	3.3	4.4	3.1	2.8	2.4	3.1	3.4	3.2	3.2
Arg	2.8	4.0	4.5	3.6	3.4	2.9	4.4	2.8	4.0
Asx	9.9	9.1	12.0	12.8	11.9	8.5	6.6	9.8	9.1
Thr	5.0	6.2	6.0	5.8	8.6	5.4	5.6	5.3	6.2
Ser	6.2	6.0	5.7	8.8	8.4	6.3	5.5	6.2	5.5
Glx	6.5	9.4	9.9	7.5	7.6	5.3	6.0	5.4	8.4
Pro	10.3	10.1	10.6	4.1	8.5	10.5	9.0	10.3	10.3
Gly	14.5	8.0	7.6	9.8	9.9	13.3	14.3	14.5	8.0
Ala	7.3	6.3	9.1	12.6	13.8	7.4	7.2	6.2	6.3
Cys	4.5	3.5	2.7	1.3	1.1	5.0	4.5	4.5	4.0
Val	4.6	5.7	5.2	4.5	6.0	6.3	5.8	4.6	5.7
Met	2.8	3.1	3.5	1.5	2.0	3.0	4.4	2.8	3.1
Ile	5.7	4.5	5.2	2.1	5.8	4.7	5.5	5.8	5.5
Leu	6.0	5.1	4.1	9.0	3.9	5.0	4.0	6.0	4.1
Tyr	2.6	4.3	1.4	5.3	2.4	2.5	3.3	2.6	3.3
Phe	3.7	6.8	7.3	3.8	2.7	3.7	4.5	3.7	6.8
Trp	ND	ND	ND	2.4	ND	3.0	3.0	2.0	3.0

<sup>1</sup> Endoglucanasa de *Cherax quadricarinatus* [99]

<sup>2</sup> Endoglucanasa de *Thermomonospora fusca* [92]

Por otro lado, se cuenta a la fecha con la secuencia de los primeros 29 residuos del extremo amino terminal de Alg I, donde se observó que no se encontraba bloqueado. Este fragmento de la secuencia fue obtenido por espectrometría de masas:

D-A-G-V-Q-W-S-P-L-G-R-Q-Q-D-A-V-T-A-L-Y-G-R-T-K-A-D-K-S-S

Utilizando las herramientas de ExpASY (Expert Protein Analysis System <http://www.expasy.ch/tools/>), se llevó a cabo un estudio de similitud de este fragmento de secuencia con esa base de datos. Se encontró un 84 % de similitud con una proteína extraída de las semillas de cebada, que inhibe la fase de elongación en la síntesis de proteínas, tiene actividad antifúngica y es una glicohidrolasa que hidroliza el enlace N-glicosídico de una adenosina específica en el 28S rRNA.

## Estudios de dispersión dinámica de la luz

El comportamiento en solución de las glicohidrolasas purificadas fue analizado con técnicas de DLS, se estimó la masa molecular y la distribución de tamaños medida como polidispersidad. La agregación de las enzimas se investigó como una función de tres parámetros: concentración de proteína (1.5-10.0 mg/ml), concentración de manitol (0.1-5.0 %), y concentración de PEG-6000 (1-25 %). Los resultados revelaron que las 7 enzimas tienden a agregarse fuertemente en solución. Cuando dicha agregación es excesiva, pierden su actividad y precipitan. Las agarasas son las enzimas que se agregan más fuertemente, de hecho éstas pierden su actividad en un período de 4 h a 4 °C, en un amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 8, mientras que a la misma temperatura las alginasas pierden la actividad en 10 h. Las celulasas, a pesar de que también se agregan fuertemente, son más estables que las agarasas y alginasas, manteniendo su actividad hasta por 4 días a 4 °C en el mismo amortiguador.

En el caso de las celulasas, a concentraciones de proteína entre 1.5 y 2.5 mg/ml en el amortiguador Tris, las enzimas forman multímeros (~160 a 200 kDa). A concentraciones arriba de 5, 8 y 10 mg/ml para Cel I, II y III, respectivamente, las enzimas formaron agregados muy grandes ( $1.0-2.3 \cdot 10^6$  kDa) e inestables, que al cabo de unas horas precipitaron de manera irreversible. A juzgar por las mediciones de polidispersidad, la distribución de tamaños de los agregados disminuye cuando se incrementa la concentración de proteína. Resultados similares se obtuvieron con las agarasas y alginasas, con la diferencia que estas soportan mayores concentraciones que las celulasas sin precipitar (6, 7, 6 y 12 mg/ml para Alg I Alg II, Ag I y Ag II respectivamente). Tratando de disminuir la agregación de las diferentes glicohidrolasas, se evaluó el efecto del pH, encontrando que las celulasas y agarasas, tienen una menor agregación a valores de pH entre 5.5 y 6.5, mientras que las alginasas en valores de pH cercanos a 8. Estos valores coinciden con las condiciones en que se tiene la actividad óptima. Sin embargo, con ninguna de las glicohidrolasas se observaron monómeros a ninguna concentración de proteína o valor de pH.

Con el fin de evitar la agregación de las glicohidrolasas purificadas y obtener la forma monomérica y monodispersa de las diferentes enzimas, se probó el efecto del PEG-6000, manitol y sorbitol en la agregación de las proteínas. En general, alcoholes polihídricos y azúcares se han adicionado en el medio con el fin de estabilizar macromoléculas biológicas en

solución [102]. El sorbitol no disminuyó la agregación, pero logró detener este proceso. El manitol y el PEG-6000 por el contrario, afectaron fuertemente el comportamiento en solución de estas enzimas. El PEG-6000 modificó el estado de agregación de Cel I, Cel II Alg I, Alg II, Ag I y Ag II. El manitol afectó a Cel III, a las agarasas y alginasas. En el caso de las dos últimas, se obtuvo en forma inmediata el estado monomérico siendo éste inactivo. En la Figura 17, se observa que, a bajas concentraciones de los aditivos, las celulasas forman oligómeros más pequeños que aquellos observados en una solución libre de cosolutos. El estado monomérico empieza a predominar para Cel I y Cel II a concentraciones de PEG de 2.0-3.0 % y 0.5 % respectivamente, mientras que para Cel III a una concentración de manitol de 0.1-0.2 %. Bajo estas condiciones, la solución proteica está básicamente monodispersa. Si se incrementa la concentración de los aditivos ya mencionados, las enzimas empiezan a agregarse nuevamente. Un estudio similar se realizó con las alginasas y agarasas (Tabla 7), donde se encontró que variando la concentración de PEG-6000, se pueden obtener diferentes estados de agregación y soluciones monodispersas.

Los resultados de DLS indicaron que para las 7 enzimas estudiadas existen varias especies antes de la formación de grandes agregados. Estos resultados son muy útiles para poder encontrar las condiciones apropiadas de cristalización de estas proteínas. Respecto a la actividad de éstas en diferentes estados de agregación, se observó que las tres celulasas eran más activas cuando estaban agregadas (1.5 mg/ml de proteína) ( $435\pm 3$ ,  $185\pm 3$  y  $100\pm 3$  U/mg para Cel I, II y III, respectivamente), siempre que dicha agregación no sea demasiada para provocar la precipitación de las enzimas. En la forma monomérica, obtenida con la adición de PEG-6000 y manitol en las concentraciones señaladas con anterioridad, la actividad específica de estas enzimas fue menor ( $20\pm 3$ ,  $35\pm 2$ , y  $26\pm 2$  U/mg). Las alginasas y agarasas también fueron más activas en forma agregada ( $102\pm 3$ ,  $150\pm 4$ ,  $680\pm 4$  y  $810\pm 3$  para Alg I, Alg II, Ag I y Ag II respectivamente) que en la menos agregada  $45\pm 2$  y  $38\pm 2$  para Alg I y Alg II en forma trimérica y tetramérica respectivamente y  $220\pm 3$  y  $150\pm 2$  para Ag I y Ag II respectivamente, en sus formas tetraméricas). Las formas monoméricas fueron inactivas. Resultados como éste han llevado al reciente incremento en el estudio de la influencia del volumen excluido en soluciones con alta concentración y del efecto del agrupamiento molecular, “macromolecular crowding”, en diferentes tipos de reacciones que conducen al ensamblaje de proteínas y

complejos de proteínas. En general, el agrupamiento de macromoléculas estabiliza la estructura de la proteína nativa y favorece la formación de complejos funcionales. Sin embargo, un sobreagrupamiento (“overcrowding”) puede incrementar la formación de agregados no funcionales [103].

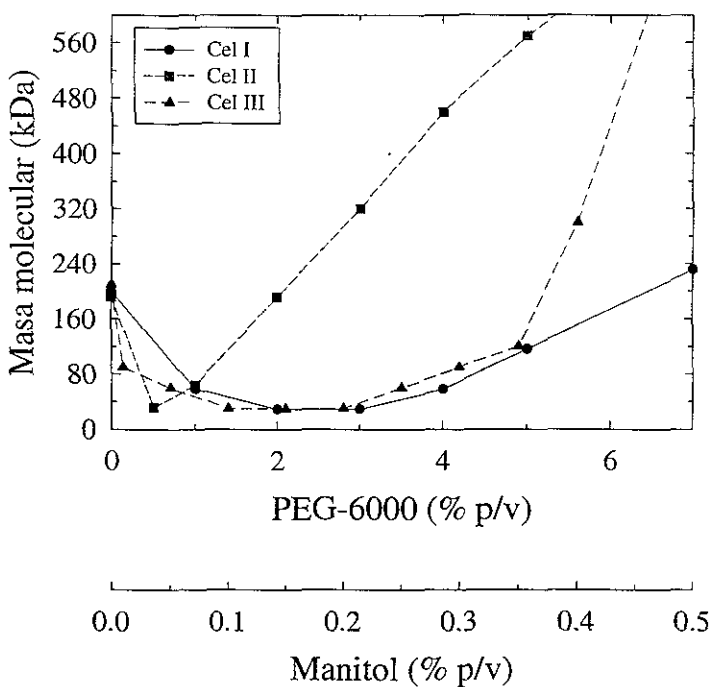


Figura 17. Efecto de la concentración de manitol y de PEG-6000 en la agregación de las celulasas purificadas. La concentración de las muestras fue de 1.5 mg/ml. Cel I y Cel II fueron solubilizadas con PEG y Cel III con manitol.

Tabla 7. Efecto del PEG en la agregación de las alginasas y agarasas de *H. fulgens*.

		Porcentaje de PEG-6000 (p/v)							
		0%	1%	3%	5%	10%	15%	20%	25%
<b>Alg I</b>	Agr	Trímero	Trímero/ dímero	Dímero	Monómero	Agr	Agr	Agr	
<b>Alg II</b>	Agr	Tetrámero/ Dímero	Dímero	Dímero	Monómero	Agr	Agr	Agr	
<b>Ag I</b>	Agr	Agr	Tetrámero	Dímero	Dímero/ monómero	Monómero	Agr	Agr	
<b>Ag II</b>	Agr	Agr	Agr	Tetrámero	Tetrámero/ dímero	Dímero	Monómero	Agr	

Agr: Agregado

## Estudios conformacionales

El espectro de dicroísmo circular de una proteína en la región comprendida entre 183-260 nm (UV lejano) es debido básicamente a la conformación secundaria de su cadena polipeptídica [80]. Además, según Manavalan y Johnson [104], las características de la curva de DC de una proteína permiten establecer, en forma relativa, el patrón de plegamiento de la macromolécula. Dicho plegamiento es uno de los aspectos más importantes en estudios de estructura y función. Sin embargo, son muy pocos los estudios que se han realizado sobre la influencia de cosolventes orgánicos en el plegamiento [105].

Los espectros que se muestran en la Figura 18 corresponden a las celulasas purificadas a pH 8. Los espectros comparten una característica en común que es la presencia de una banda negativa cercana a 210 nm y una positiva cercana a los 200 nm. Las mediciones que se realizaron en presencia de los aditivos empleados para desagregar a las enzimas fueron muy similares a las que se presentan en la Figura 18. Esto indica que las celulasas no sufren cambios conformacionales significativos con la agregación o disociación.

Como se muestra en la Tabla 8, los espectros de DC de las tres celulasas son consistentes con un alto contenido de hoja  $\beta$  (aproximadamente 50 %) y un moderadamente bajo contenido de hélice  $\alpha$ . Además, estos espectros de DC se analizaron con el programa DEFCLASS [81] para determinar la clase de estructura terciaria. Según estos análisis, las tres enzimas pertenecen a la clase  $\beta$ , coincidiendo con las estimaciones de estructura secundaria. Entre las celulasas de hongos de estructura terciaria conocida, sólo aquellas que pertenecen a los clanes GH-B (glicosil hidrolasa B) y GH-C (glicosil hidrolasa C) y a la familia 45 [48], tienen un contenido de estructura  $\beta$  comparable a las celulasas del abulón. Sin embargo, no se pudieron realizar comparaciones con celulasas de invertebrados debido a que no hay información acerca de su estructura.

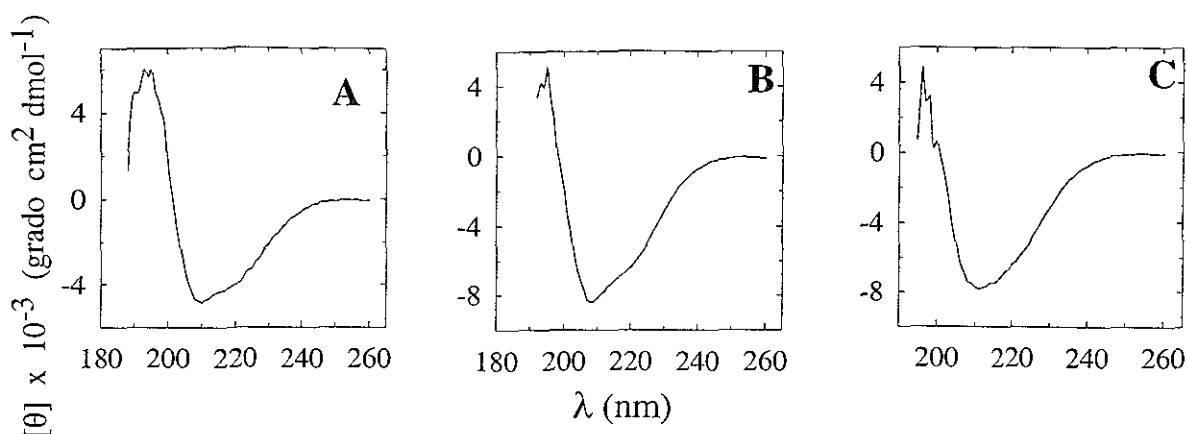


Figura 18. Espectros de dicroísmo circular de las celulasas de *Haliotis fulgens* a pH 8. A) Cel I, B) Cel II y C) Cel III.

Tabla 8. Contribución de estructuras secundarias a las curvas de DC de las celulasas de *H. fulgens*, estimada por dos métodos.

Enzima	Método	Hélice $\alpha$	Hoja $\beta$	Giro	Otras	Predicción de la clase
Cel I	CCA <sup>1</sup>	11.3	48.2	14.1	26.4	Beta
	Henessey-Johnson <sup>2</sup>	12.4	48.1	05.3	34.2	
Cel II	CCA	20.7	40.8	05.3	33.4	Beta
	Henessey-Johnson	18.0	42.0	15.0	26.0	
Cel III	CCA	20.5	35.2	16.8	27.5	Beta
	Henessey-Johnson	24.9	32.8	05.3	37.0	

<sup>1</sup>[79]  
<sup>2</sup>[80]

Las agarasas y las alginasas mostraron espectros muy similares. Sin embargo, a diferencia de las celulasas, sí hubo cambios en sus espectros de CD en los diferentes estados de agregación (Figura 19 y 20). Dependiendo del estado de agregación el espectro de CD se modifica notablemente, llegando en el estado monomérico a casi perderse los dos mínimos negativos que se observan en estados agregados (cerca de 209 y 225 nm). Esto nos indica que las proteínas sufren cambios conformacionales en los diferentes estados. Analizando los espectros con el programa de desconvolución de Hennessey-Johnson [80], para poder estimar la composición de estructura secundaria de las enzimas (Tabla 9), los espectros de DC de las

cuatro glicohidrolasas son consistentes con un alto contenido de hoja  $\beta$  (aproximadamente 40 %) en el estado más agregado. Además, estos espectros de DC se analizaron con el programa DEFCLASS [81] para determinar la clase de estructura terciaria. Según este análisis, las cuatro enzimas pertenecen a la clase  $\alpha/\beta$ .

En la Tabla 9, se puede observar la disminución en el contenido de hojas  $\beta$  y aumento de hélice  $\alpha$  conforme las enzimas se desagregan. Un efecto similar fue reportado por Goodenough *et al.* [106]. Estos investigadores presentaron un estudio de DC con diferentes glicohidrolasas, variando la concentración de proteína. Ellos observaron que una endoglucanasa bacteriana, que en su estado nativo formaba parte de un complejo multienzimático (celulosoma), tendía a agregarse y dependiendo de su estado de agregación, la enzima presentaba entre un 50 y un 100 % de hélice  $\alpha$ . La explicación que ellos propusieron para este comportamiento es que cuando la enzima forma parte de un celulosoma, los cambios podrían deberse a fenómenos de asociación y disociación entre las proteínas del complejo. Esta explicación podría aplicarse al comportamiento de las alginasas de *H. fulgens*, las cuales pudieran estar actuando como sistemas multienzimáticos, de ahí su mayor estabilidad y actividad en estado agregado. No se pudieron realizar comparaciones con otras alginasas o agarasas, ya que no existen estudios de este tipo.

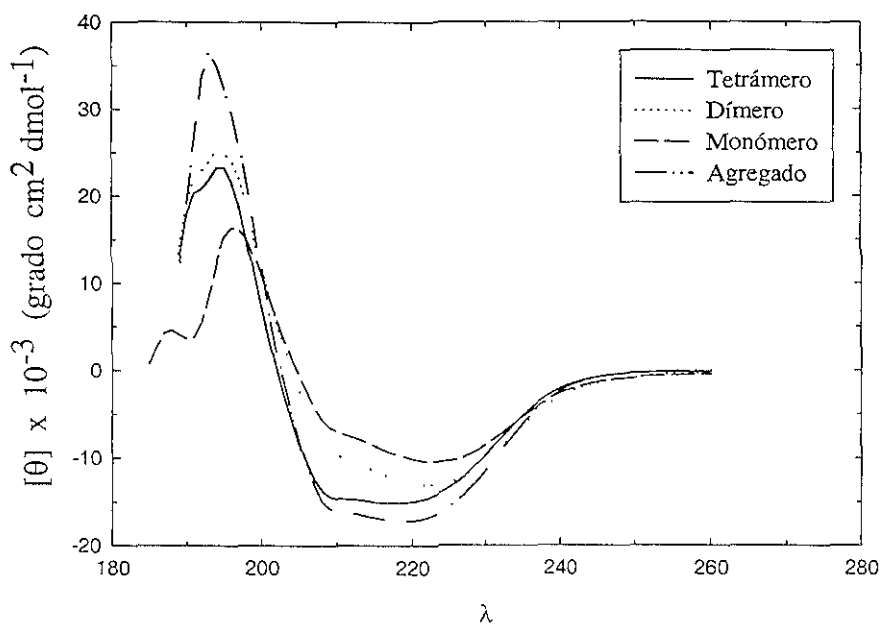


Figura 19. Espectros de dicroísmo circular de la Alginasa I de *H. fulgens* en diferentes estados de agregación.



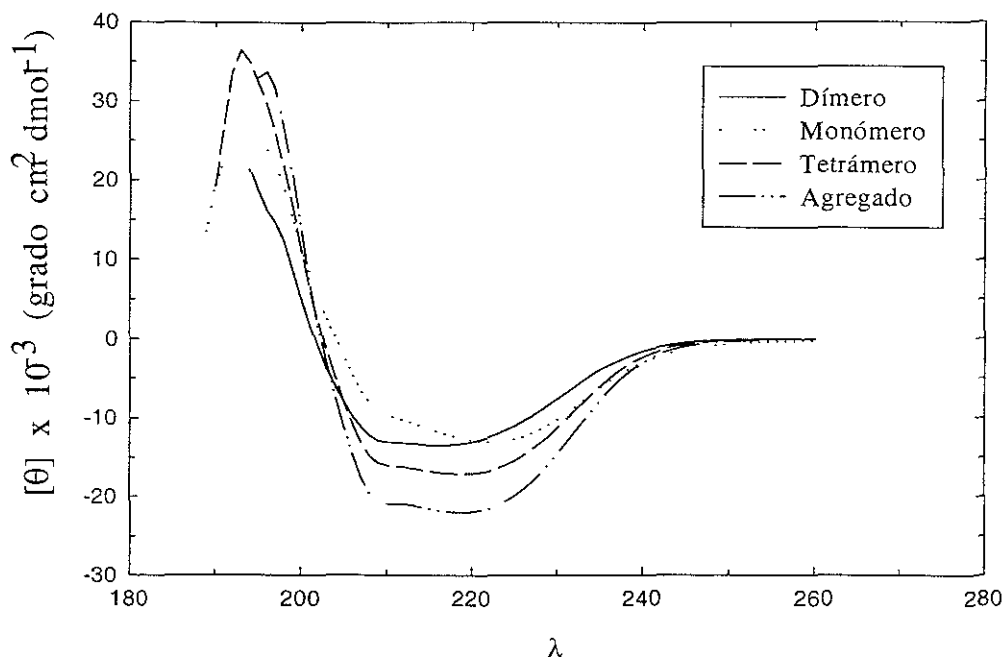


Figura 20. Espectros de dicroísmo circular de Ag II de *H. fulgens* variando la concentración de PEG-6000 para obtener diferentes estados de agregación.

Tabla 9. Contenido de estructura secundaria de Alg I, Alg II, Ag I y Ag II de *H. fulgens* en diferentes estados de agregación, derivado de los espectros de dicroísmo circular y expresado en porcentaje. Los espectros fueron analizados con el programa de desconvolución de Hennessey-Johnson [81].

		Hélice $\alpha$	Hoja $\beta$	Giros $\beta$	Otros
<b>Alg I</b>	Monómero	62.0	20.2	13.2	4.6
	Dímero	60.2	25.5	12.3	2.2
	Trímero	46.1	28.3	13.1	12.5
	Agregado	28.4	37.1	26.5	8.5
<b>Alg II</b>	Monómero	28.0	25.0	24.0	23.0
	Dímero	27.5	35.0	24.5	13.0
	Agregado	22.0	40.0	24.5	13.5
<b>Ag I</b>	Monómero	19.8	25.4	24.2	30.6
	Dímero	23.1	29.3	23.1	24.5
	Trímero	28.2	33.4	14.1	24.3
	Agregado	31.0	41.2	12.0	15.8
<b>Ag II</b>	Monómero	23.1	30.9	21.0	25.0
	Dímero	25.2	35.8	19.5	19.5
	Agregado	32.5	44.2	20.5	2.8

### *Cristalización de las glicohidrolasas*

Se montaron pruebas de cristalización de las glicohidrolasas purificadas probando diferentes técnicas y condiciones, siendo la de la gota suspendida, la que mostró mejores resultados. A la fecha se han obtenido cristales muy pequeños de Cel I y II (Figura 21); Alg I y Alg II (Figura 22) y Ag I y Ag II (Figura 23). En la mayoría de las condiciones probadas, se observaron agregados que si bien eran cristalinos, no alcanzaban a formar cristales, esto debido a que la saturación se alcanzaba muy rápidamente ya que las proteínas se encontraban agregadas en el amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 8 y no era posible alcanzar un arreglo ordenado que permitiera la formación de cristales. Los cristales que a la fecha se han obtenido utilizando el kit II de Hampton. Los cristales de Cel I y Cel II crecieron con la solución 22 que contiene polietilenglicol 20000 al 12 % p/v en 0.1 M MES pH 6.5. Los cristales de Alg I y II crecieron en las condiciones 31 y 38 del kit mencionado, las cuales contienen 20 % v/v de Jeffamina M-600 en HEPES 0.1M, pH 7.5 y 20 % p/v de polietilenglicol 10000 en HEPES 0.1 M, pH 7.5 respectivamente (Figura 21).

En el caso de las agarasas, éstas formaban precipitados amorfos casi instantáneamente en prácticamente todas las condiciones; sin embargo, de dichos precipitados surgieron los cristales. Las soluciones en las cuales se obtuvieron cristales fueron la 22 que contiene polietilenglicol 20000 al 12 % p/v en 0.1 M MES pH 6.5 y la 38, la cual contiene 20 % p/v de polietilenglicol 10000 en HEPES 0.1 M, pH 7.5. También se montaron pruebas utilizando el kit de PEG; con este kit, se obtuvieron cristales muy pequeños prácticamente en todas las condiciones.

Los cristales obtenidos a la fecha de las diferentes glicohidrolasas son aún muy pequeños, por lo que se necesita optimizar las condiciones para lograr obtener cristales apropiados para los estudios de difracción de rayos X. Para lograr esto, sería conveniente poner pruebas de cristalización con el kit de PEG de la compañía Hampton, ya que en presencia de PEG es como se han obtenido los cristales. También se podría diseñar otro factorial en el que se hicieran modificaciones mas finas alrededor de las condiciones en donde se obtuvieron dichos cristales.



Figura 21. Cristales de dos de las tres celulasas purificadas. A) Cristal de Cel I, obtenido con polietilenglicol 20000 al 12 % p/v en 0.1 M MES pH 6.5 y B) Cristal de Cel II obtenido con polietilenglicol 20000 al 12 % p/v en 0.1 M MES pH 6.5. La concentración de proteína en las pruebas de cristalización fue de 2.5 mg/ml.

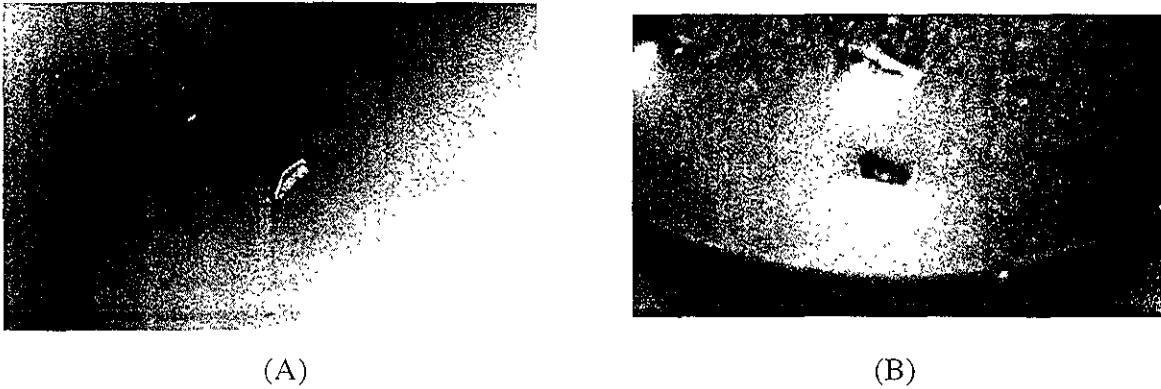
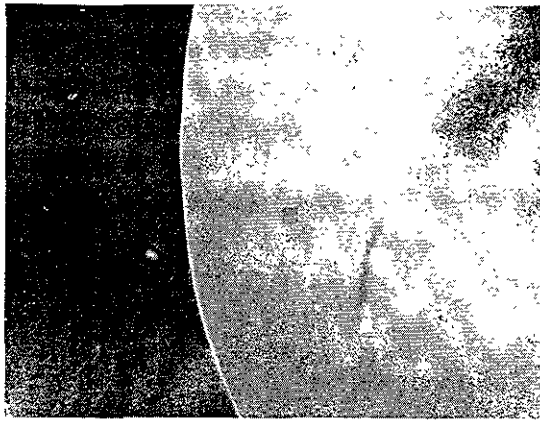
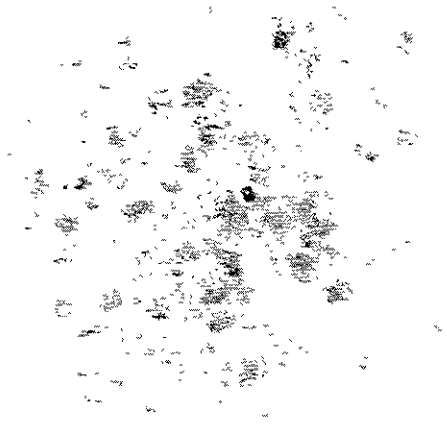


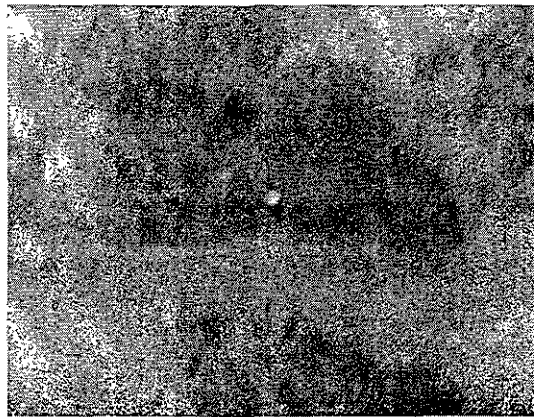
Figura 22. Cristales de las alginasas de *H. fulgens*. A) Alg I crecido con 20 % v/v de Jeffamina M-600 en HEPES 0.1 M, pH 7.5, B) Alg II crecido con 20 % p/v de polietilenglicol 10000 en HEPES 0.1 M pH 7.5, como agente precipitante.



(A)



(B)



(C)

Figura 23. A) Cristal de Ag I obtenido con 20 % p/v de polietilenglicol 10000 en HEPES 0.1 M, pH 7.5 como agente precipitante, B) Cristal de Ag II obtenido con polietilenglicol 20000 al 12 % p/v en 0.1 M MES pH 6.5 como agente precipitante, C) Cristal de Ag II obtenido con polietilenglicol 5 % en citratos pH 5.

## DISCUSIÓN GENERAL

Las glicohidrolasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, donde catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos en glicósidos, oligosacáridos y polisacáridos. Estas enzimas se han clasificado según su especificidad por el sustrato de acuerdo con el sistema de numeración de la Unión internacional de Bioquímica y Biología Molecular. No obstante, muchas glicosido hidrolasas son capaces de hidrolizar diferentes sustratos. Aunque la especificidad por el sustrato continua siendo la base para la clasificación de las enzimas, son claramente necesarios otro tipo de criterios adicionales para poder identificar relaciones

evolutivas y funcionales entre las glicohidrolasas. Es por esto que el uso de información estructural se ha incrementado notablemente para discriminar entre enzimas o para clasificarlas en grupos [107].

En cuanto al estudio de enzimas de origen marino, estas han sido muy poco estudiadas y son una fuente potencial de información evolutiva muy importante. Esto debido a que el medio marino es más estable que el terrestre, en donde los cambios climáticos son más drásticos, lo que favorece que en los océanos se puedan encontrar organismos evolutivamente muy primitivos que pueden ser una fuente importante de información en este aspecto.

Anteriormente se pensaba que las bacterias y hongos eran la única fuente de celulasas, alginasas y agarasas. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que otro tipo de organismos también las pueden sintetizar, como es el caso de algunos insectos (como la cucaracha y la termita) [90] y moluscos marinos como el abulón [91]. Este organismo es particularmente importante por su posición en la escala evolutiva, ya que se trata de uno de los moluscos más primitivos en forma y estructura. Sus hábitos alimenticios le han permitido desarrollar una serie de adaptaciones para sobrevivir los cambios en el medio que han llevado a otras especies a extinguirse.

Como se mencionó en la introducción, las algas marinas poseen una mezcla de polisacáridos, entre los que destacan el agar (algas rojas), el alginato (algas café) y la celulosa (algas verdes). En este trabajo se determinó que *H. fulgens* posee diferentes enzimas que le permiten hidrolizar los polisacáridos presentes en las algas marinas, de tal manera que si escasean las algas pardas, las cuales son las que prefiere, también puede alimentarse de las rojas o las verdes. Esto constituye un mecanismo adaptativo muy importante.

Por otro lado, las enzimas purificadas del hepatopáncreas de este organismo poseen características muy peculiares, entre las que sobresalen de manera especial: 1) la actividad específica, la cual es mucho mayor a las reportadas a la fecha para este tipo de enzimas, pero de otras fuentes y 2) los fenómenos de agregación que llevaban a la pérdida de actividad en períodos muy cortos de tiempo (en algunos casos como con las agarasas, 4h) y que habían impedido la purificación y caracterización de estas enzimas. Esta podría ser una de las razones por las cuales a la fecha hay muy pocos reportes de estas glicohidrolasas de invertebrados y en casi todos ellos, se trabajó con extractos crudos.

Encontrar las condiciones que evitaran la agregación de estas enzimas fue uno de los aspectos cruciales de este estudio, ya que nos permitió caracterizarlas y determinar algunas propiedades relevantes como la actividad específica, su comportamiento en solución y los cambios conformacionales que la agregación provocaba, etc.

En este contexto, observamos que el pH y la concentración de proteína tenían un efecto muy notorio en la agregación de las diferentes enzimas. Analizando lo que podría ocurrir en el organismo, el hepatopáncreas del abulón tiene un pH cercano a 6.5 (se midió experimentalmente), pero cuando se alimenta de algas cafés (pH ~8), se crea un ambiente básico. Las alginasas, que tienen sus óptimos de actividad y muestran una menor agregación a pH cercanos a 8, se activan e hidrolizan al alginato, que es uno de los principales constituyentes de las algas cafés. Si por el contrario, el abulón consume algas rojas (pH ~6), éstas acidifican el medio activando a las agarasas. Por lo tanto, podríamos pensar que el pH estaría funcionando como uno de los mecanismos de regulación de la actividad.

Las glicohidrolasas puras mostraron mayor actividad en forma agregada. Las alginasas y agarasas fueron inactivas en la forma monomérica. Numerosos grupos de investigación se han dado a la tarea de tratar de explicar el por qué ciertas proteínas presentan una mayor actividad biológica cuando se encuentran formando multímeros. Su teoría, conocida como la teoría del volumen excluido, trata de explicar la influencia de dicho volumen en soluciones con alta concentración de proteína y del efecto del agrupamiento molecular en diferentes tipos de reacciones. Estos investigadores encuentran que en general, el agrupamiento de ciertas macromoléculas estabiliza la estructura de la proteína nativa y favorece la formación de complejos funcionales [103]. Sin embargo, cuando existe un agrupamiento excesivo puede incrementarse la formación de agregados no funcionales. Ambos efectos fueron observados en las glicohidrolasas de *H. fulgens*. Esto es, una activación en el estado agregado y la formación de agregados no funcionales cuando la agregación se excede de ciertos límites que varían para cada enzima estudiada.

También observamos que cambios en la agregación provocaban cambios en el contenido de estructura secundaria y por lo tanto en la conformación. Estos cambios conformacionales pueden ser un mecanismo de las enzimas del abulón, para hidrolizar los diferentes polisacáridos de una manera eficiente. La obtención de cristales adecuados para llevar a cabo

estudios estructurales de estas enzimas, utilizando técnicas de difracción de rayos X, nos ayudaría a entender algunos de los fenómenos observados.

Por otro lado, fue interesante observar que estas enzimas se comportan de manera similar a algunas celulasas que trabajan en sistemas multienzimáticos, no sabemos si formando estructuras semejantes a los celulosomas o como enzimas libres que forman sistemas complejos.

En conclusión, el abulón azul constituye un ejemplar idóneo para realizar estudios que permitan conocer y comprender la evolución natural de estas enzimas así como sus mecanismos de acción.

## CONCLUSIONES

Del presente estudio, surgen una serie de conclusiones como son:

- El abulón azul, *H. fulgens* constituye una fuente muy rica en glicohidrolasas, debido a que su principal fuente de alimentación la constituyen las macroalgas, las cuales poseen una mezcla de polisacáridos. Estas hidrolasas mostraron actividades varias veces mayores a las reportadas para otros organismos de origen no marino, lo que las hace particularmente interesantes.
- Todas las glicohidrolasas tienen una fuerte tendencia a agregarse; dicha agregación puede ser evitada mediante la incorporación de aditivos como el PEG-6000 y el manitol. Sin embargo, las formas agregadas son más activas. Esto es debido probablemente a que el agrupamiento de las proteínas estabiliza su estructura nativa y favorece la formación de complejos funcionales. La agregación de estas enzimas puede dar un indicio de que se encuentran trabajando como sistemas multienzimáticos, que podrían estar en forma libre o bien formando complejos parecidos a los celulosomas reportados para celulasas.
- Las enzimas purificadas actúan de manera sinérgica para hidrolizar a la celulosa, el alginato y el agar, lo que permite la hidrólisis eficiente de dichos polisacáridos.
- Un incremento en la agregación de estas enzimas, provocó cambios conformacionales y en el contenido de estructura secundaria de las agarasas y alginasas, no así para las celulasas; esto puede ser un mecanismo para lograr una conformación adecuada y formar complejos funcionales estables.

estudios estructurales de estas enzimas, utilizando técnicas de difracción de rayos X, nos ayudaría a entender algunos de los fenómenos observados.

Por otro lado, fue interesante observar que estas enzimas se comportan de manera similar a algunas celulasas que trabajan en sistemas multienzimáticos, no sabemos si formando estructuras semejantes a los celulosomas o como enzimas libres que forman sistemas complejos.

En conclusión, el abulón azul constituye un ejemplar idóneo para realizar estudios que permitan conocer y comprender la evolución natural de estas enzimas así como sus mecanismos de acción.

## CONCLUSIONES

Del presente estudio, surgen una serie de conclusiones como son:

- El abulón azul, *H. fulgens* constituye una fuente muy rica en glicohidrolasas, debido a que su principal fuente de alimentación la constituyen las macroalgas, las cuales poseen una mezcla de polisacáridos. Estas hidrolasas mostraron actividades varias veces mayores a las reportadas para otros organismos de origen no marino, lo que las hace particularmente interesantes.
- Todas las glicohidrolasas tienen una fuerte tendencia a agregarse; dicha agregación puede ser evitada mediante la incorporación de aditivos como el PEG-6000 y el manitol. Sin embargo, las formas agregadas son más activas. Esto es debido probablemente a que el agrupamiento de las proteínas estabiliza su estructura nativa y favorece la formación de complejos funcionales. La agregación de estas enzimas puede dar un indicio de que se encuentran trabajando como sistemas multienzimáticos, que podrían estar en forma libre o bien formando complejos parecidos a los celulosomas reportados para celulasas.
- Las enzimas purificadas actúan de manera sinérgica para hidrolizar a la celulosa, el alginato y el agar, lo que permite la hidrólisis eficiente de dichos polisacáridos.
- Un incremento en la agregación de estas enzimas, provocó cambios conformacionales y en el contenido de estructura secundaria de las agarasas y alginasas, no así para las celulasas; esto puede ser un mecanismo para lograr una conformación adecuada y formar complejos funcionales estables.



- Las celulasas purificadas pertenecen a la clase  $\beta$ , mientras que las alginasas y agarasas a la  $\alpha/\beta$ .
- Los estudios del comportamiento en solución de las enzimas purificadas pueden dar la pauta para encontrar las condiciones óptimas de cristalización de dichas enzimas y lograr determinar la estructura tridimensional de ellas, lo cual sería de gran utilidad para poder realizar estudios de estructura-función a este tipo de enzimas con tan amplia aplicación.
- El abulón azul constituye uno de los moluscos más primitivos en forma y estructura, por lo que es un ejemplar idóneo para realizar estudios evolutivos de enzimas hidrolíticas las cuales están presentes en cantidades apreciables.
- El conocimiento de enzimas de invertebrados marinos es muy escaso, por lo que este estudio aportará información muy relevante sobre las celulasas, agarasas y alginasas. Además, abre toda una línea de investigación en esta área de la ciencia.
- Conseguir las condiciones necesarias para mantener estables a estas enzimas, permitirá continuar estudios posteriores con ellas.

## PERSPECTIVAS

Las glicohidrolasas de origen marino no habían logrado purificarse y caracterizarse debido a la pérdida de actividad en períodos muy cortos de tiempo. Sin embargo, en este estudio se encontraron las condiciones adecuadas para poder caracterizarlas. De esta manera, este trabajo abre una nueva línea en la investigación de glicohidrolasas de origen marino, las cuales presentan características muy peculiares e importantes.

En el futuro sería de suma importancia realizar estudios de cinética enzimática y correlacionarlos con los estructurales. Asimismo, el estudio del efecto de los cambios conformacionales y en el estado de agregación en la especificidad de las diferentes enzimas, daría información muy relevante.

Por otro lado, considerando que se trata de enzimas con actividades varias veces mayores a las reportadas de otras fuentes, determinar la estructura tridimensional de este tipo de hidrolasas y hacer comparaciones con glicohidrolasas de diferente origen aportaría información relevante sobre los mecanismos catalíticos y relaciones estructura-función. Para lograr esto, es necesario

continuar la búsqueda de condiciones apropiadas para la obtención de cristales apropiados para realizar los estudios de difracción de rayos X.

Hasta hace algunos años, se tenía la creencia de que estas enzimas sólo podían ser sintetizadas por bacterias, pero recientemente se comprobó que también otro tipo de organismos las podían sintetizar, como es el caso de algunos insectos y moluscos marinos, por lo que el abulón azul *H. fulgens* constituye un excelente espécimen para estudiar la evolución de enzimas, debido a su riqueza en glicohidrolasas y a que es de los moluscos más primitivos.

En general, es muy poco lo que se sabe de este tipo de enzimas por lo que hay una gran cantidad de estudios que sería de suma importancia realizar y que permitirían conocer y aplicar de manera eficiente este tipo de enzimas en diferentes áreas de la ciencia.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Aspinall, G.O. (1982) General Introduction. En: *The polysaccharides*, Vol.1, Aspinall, G.O., Ed. Academic Press, 1-18 pp.
2. Aspinall, G.O. (1983) Classification of polysaccharides. En: *The polysaccharides*, Vol.2, Aspinall, G.O., Ed. Academic Press, 1-9 pp.
3. Painter, T.J. (1983) Algal polysaccharides. En: *The polysaccharides*, Vol.2, Aspinall, G.O., Ed. Academic Press, 195-285 pp.
4. Polne-Fuller, M. y Gibor, A. (1987) Microorganisms as digestors of seaweed cell walls. *Hydrobiologia* 151/152, 405-409.
5. Marchessault, R.H. y Sundararajan, P.R. (1983) Cellulose. En: *The polysaccharides*, Vol. 2, Aspinall, G.O. Ed., Academic Press, 11-95 pp.
6. Ertesvåg, H., Høidal, H.K., Skjåk-Bræk, G. y Valla, S. (1998) The *Azotobacter vinelandii* Mannuronan C-5-Epimerase AlgE1 consists of two separate catalytic domains. *J. Biol. Chem.* 273, 30927-30932.
7. Wong, T.Y., Preston, L.A. y Schiller, N.L. (2000) Alginate lyase: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles and applications. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 289-340.
8. Gacesa, P. (1987) Alginates. *Carbohydr. Polym.* 8,161-182.

continuar la búsqueda de condiciones apropiadas para la obtención de cristales apropiados para realizar los estudios de difracción de rayos X.

Hasta hace algunos años, se tenía la creencia de que estas enzimas sólo podían ser sintetizadas por bacterias, pero recientemente se comprobó que también otro tipo de organismos las podían sintetizar, como es el caso de algunos insectos y moluscos marinos, por lo que el abulón azul *H. fulgens* constituye un excelente espécimen para estudiar la evolución de enzimas, debido a su riqueza en glicohidrolasas y a que es de los moluscos más primitivos.

En general, es muy poco lo que se sabe de este tipo de enzimas por lo que hay una gran cantidad de estudios que sería de suma importancia realizar y que permitirían conocer y aplicar de manera eficiente este tipo de enzimas en diferentes áreas de la ciencia.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Aspinall, G.O. (1982) General Introduction. En: *The polysaccharides*, Vol.1, Aspinall, G.O., Ed. Academic Press, 1-18 pp.
2. Aspinall, G.O. (1983) Classification of polysaccharides. En: *The polysaccharides*, Vol.2, Aspinall, G.O., Ed. Academic Press, 1-9 pp.
3. Painter, T.J. (1983) Algal polysaccharides. En: *The polysaccharides*, Vol.2, Aspinall, G.O., Ed. Academic Press, 195-285 pp.
4. Polne-Fuller, M. y Gibor, A. (1987) Microorganisms as digestors of seaweed cell walls. *Hydrobiologia* 151/152, 405-409.
5. Marchessault, R.H. y Sundararajan, P.R. (1983) Cellulose. En: *The polysaccharides*, Vol. 2, Aspinall, G.O. Ed., Academic Press, 11-95 pp.
6. Ertesvåg, H., Høidal, H.K., Skjåk-Bræk, G. y Valla, S. (1998) The *Azotobacter vinelandii* Mannuronan C-5-Epimerase AlgE1 consists of two separate catalytic domains. *J. Biol. Chem.* 273, 30927-30932.
7. Wong, T.Y., Preston, L.A. y Schiller, N.L. (2000) Alginate lyase: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles and applications. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 289-340.
8. Gacesa, P. (1987) Alginates. *Carbohydr. Polym.* 8,161-182.

9. Ertesvåg, H., Erlien, F., Skjåk-Bræk, G., Rehm, B.H.A. y Valla, S. (1998) Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase. *J. Bacteriol.* 180, 3779-3784.
10. Skjåk-Bræk, G., Grasdalen, H., y Larsen, B. (1986) Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates. *Carbohydr. Res.* 154, 239-250.
11. Rehm, B.H.A. y Valla, S. (1997) Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 281-288.
12. Onsøyen, E. (1996) Commercial applications of alginates. *Carbohydrates Eur.* 14, 26-31.
13. Skjåk-Bræk, G. y Espevik, T. (1996) Application of alginate gels in biotechnology and biomedicine. *Carbohydrates Eur.* 14, 19-23.
14. Peñaloza-Vazquez, A., Kidambi, S.P., Chakrabarty, A.M. y Bender, C.L. (1997) Characterization of the alginate biosynthetic gene cluster in *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*. *J. Bacteriol.* 179, 4464-4472.
15. Oerther, S., Gall, H., Payan, E., Lopicque, F., Presle, N., Hubert, P., Dexheimer, J., Netter, P. And Lopicque, F. (1999) Hyaluronate-Alginate gel as a novel biomaterial: mechanical properties and formation mechanism. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 206-215.
16. Mai, G.T., McCormack, J.G., Seow, W.K., Pier, G.B., Jackson, L.A. y Thong, Y.H. (1993) Inhibition of adherence of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* by alginase, specific monoclonal antibodies, and antibiotics. *Infect. Immun.* 61, 4338-4343.
17. Bayer, A.S., Park, S., Ramos, M.C., Nast, C.C., Eftekhari, F. y Schiller, N.L. (1992) Effects of alginase on the natural history and antibiotic therapy of experimental endocarditis caused by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 60, 3979-3985.
18. Mai, G.T., Seow, W.K., Pier, G.B., McCormack, J.G. y Thong, Y.H., (1993) Suppression of lymphocyte and neutrophil functions by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide (alginate): reversal by physicochemical, alginase and specific monoclonal antibody treatments. *Infect. Immun.* 61, 559-564.
19. Jol, C.N., Neiss, T.G., Penninkhof, B., Rudolph, B. y De Ruyter, G.A. (1999) A novel High-performance anion-exchange chromatographic method for the analysis of carrageenans and agars containing 3,6-anhydrogalactose. *Anal. Biochem.* 268, 213-222.

20. Leon, O., Quintana, L., Peruzzo, G. y Slebe, J.C. (1992) Purification and properties of an extracellular agarase from *Alteromonas* sp. Strain C-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 4060-4063.
21. Sugano, Y., Matsumoto, T., Kodama, H. y Noma, M. (1993) Cloning and sequencing of *agaA*, a unique agarase 0107 gene from a marine bacterium, *Vibrio* sp. Strain JT0107. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3750-3756.
22. Sugano, Y., Terada, I., Arita, M., Noma, M. y Matsumoto, T. (1993) Purification and characterization of a new agarase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. Strain JT0107. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1549-1554.
23. Rochas, C., Potin, P. y Kloareg, B. (1994) NMR spectroscopic investigation of agarose oligomers produced by an  $\alpha$ -agarase. *Carbohydr. Res.* 253, 69-77.
24. Baker, J.O., Adney, W.S., Thomas, S.R., Nieves, R.A., Chou, Y-C., Vinzant, T.B., Tucker, M.P., Laymon, R.A. y Himmel, M.E. (1995) Synergism between purified bacterial and fungal cellulases. En: *Enzymatic degradation of insoluble carbohydrates*, Saddler, J.N. y Penner, M.H., Eds., Am. Chem. Soc. 113-141 pp.
25. Nidetzky, B., Steiner, W. y Claeysens, M. (1995) Synergistic interaction of cellulases from *Trichoderma reesei* during cellulose degradation. En: *Enzymatic degradation of insoluble carbohydrates*, Saddler, J.N. y Penner, M.H., Eds., Am. Chem. Soc., Washington, DC. 90-111 pp.
26. Wood, T.M. y Bhat, K.M. (1988) Methods for measuring cellulase activities. En: *Methods in enzymology*, Vol. 160, Wood, W.A. y Kellogg, S.T., Eds., Academic Press. 87-112 pp.
27. Wood, T.M. y MaCray, S.I. (1979) Cellulases. *Adv. Chem. Ser.* 181, 181-209.
28. Henrissat, B., Claeysens, M., Tomme, P., Lemesle, L. y Mornon, J.-P. (1989) Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. *Gene* 81, 83-85.
29. Gilkes, N.R., Henrissat, B., Kilburn, D.G., Miller, R.C. y Warren, R.A.J. (1991) Domains in microbial beta-1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol. Rev.* 55, 303-315.
30. Chavagnat, F., Ducz, C., Guinand, M., Potin, P., Barbeyron, T., Henrissat, B., Wallach, J. y Ghuysen, J.-M. (1996) Cloning, sequencing and overexpression in *Escherichia coli* of the

alginate lyase-encoding *aly* gene of *Pseudomonas alginovora*: identification of three classes of alginate lyases. *Biochem. J.* 319, 575-583.

31. Yoon, H.-J., Mikami, B., Hashimoto, W. y Murata, K. (1999) Crystal structure of alginate lyase A1-III from *Sphingomonas* species A1 at 1.78 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 290, 505-514.

32. Potin, P., Richard, C., Rochas, C. y Kloareg, B. (1993) Purification and characterization of the  $\alpha$ -agarase from *Alteromonas agarlyticus* (Cataldi) comb. Nov., strain GJ1B. *Eur. J. Biochem.* 214, 599-607.

33. Hahn, K.O. (1989) Survey of the commercially important abalone species in the world. En: *Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods*. Hahn, K.O. Ed. 3-11 pp .

34. Haaker, P.L., Henderson, K.C. y Parker, D.O. (1986) California abalones. *California Marine Resources Leaflet*, 11 pp.

35. Ortíz, Q. M., y León, C.G. (1988) Recursos pesqueros de México y sus perspectivas. Recurso Abulón (*Haliotis* sp) En: *Recursos pesqueros del País. Sría. de Pesca, INP*. 11-41 pp.

36. Ortíz, Q. M. y León, C. G. (1994) La pesquería del abulón. Instituto Nacional de la pesca, 3-34 pp.

37. Leighton, D.L. (1966) Studies of food preference in algivorous invertebrates of southern california kelp beds. *Pacific. Sci.* 20, 104-113.

38. Wilson, D.B., Spezio, M., Irwin, D., Karplus, A., y Taylor J. (1995) Comparison of enzymes catalyzing the hydrolysis of insoluble polysaccharides. En: *Enzymatic degradation of insoluble carbohydrates*. Saddler, J.N. y Penner, M.H. Eds., Am. Chem. Soc., Washington 1-12 pp.

39. Doubet, R.S. y Quatrano, R.S. (1984) Properties of alginate lyases from marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 699-703.

40. Juy, M., Amit, A.G., Alzari, P.M., Poljak, R.J., Claeysens, M., Béguin, y Aubert, J.P. (1992) Three-dimensional structure of a thermostable bacterial cellulase. *Nature* 357, 89-91.

41 Reese, E.T., Siu, R.G.H. y Levinson, H.S. (1950) Synergy. *J. Bacteriol.* 59, 485-497.

42. Gilligan, W. y Reese, E.T. (1954) Synergistic interaction of cellulases. *Can. J. Microbiol.* 1, 90-107.

43. Moloney, A.P., McCrae, S.I., Wood, T.M. y Coughlan, M.P. (1985) Isolation and characterization of the 1,4-beta-D-glucan glucanohydrolases of *Talaromyces emersonii*. *Biochem. J.* 225, 365-374.
44. Bhat, S., Goodenough, P.W., Bhat, M.K. y Owen, E. (1994) Isolation of four major subunits from *Clostridium thermocellum* cellulosome and their synergism in the hydrolysis of crystalline cellulose. *Int. J. Biol. Macromol.* 6, 335-342.
45. Bayer, E.A., Chanzy, H., Lamed, R. y Shoham, Y. (1998) Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 548-557.
46. Bayer, E.A., Shimon, L.J., Shoham, Y. y Lamed, R. (1998) Cellulosomes-structure and ultrastructure. *J. Struct. Biol.* 124, 221-234.
47. Warren, R.A.J. (1996) Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 183-212.
48. Tomme, P., Warren, A.J., Miller, R.C., Kilburn, D.G. y Gilkes, N.R. (1995) Cellulose-binding domains: classification and properties. En: *Enzymatic degradation of insoluble carbohydrates*, Saddler, J.N. y Penner, M.H., Eds., Am. Chem. Soc., Washington, DC. 142-163pp.
49. Henrissat, B. y Davies, G. (1997) Classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 637-644.
50. Lamed, R., Setter, E. y Bayer, E.A. (1983) Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.* 156, 828-836.
51. Belaich, J.-P., Tardif, C., Belaich, A. y Gaudin, C. (1997) The cellulolytic system of *Clostridium cellulolyticum*. *J. Biotechnol.* 57, 3-14.
52. Karita, S., Sakka, K. y Ohmiya, K. (1997) Cellulosomes, cellulase complexes, of anaerobic microbes: their structure models and functions. En: *Rumen microbes and digestive physiology in ruminants*, Vol. 14, Onodera, R., Itabashi, H., Ushida, K., Yano, H. y Sasaki, Y., Eds., Japan Sci. Soc. Press, Tokio, 47-57 pp.
53. Doi, R.H., Goldstein, M., Hashida, S., Park, J.S. y Takagi, M. (1994) The *Clostridium cellulovorans* cellulosome. *Crit. Rev. Microbiol.* 20, 87-93.

54. Chen, H., Li, X., Blum, D. y Ljungdahl, L. (1998) Two genes of the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp Strain PC-2 encoding cellulases with endoglucanase activities may have arisen by gene duplication. *FEMS Microbiol. Lett.* 159, 63-68.
55. Mody, K. y Chauhan, V.D. (1993) Alginase from a marine bacterium. *Bot. Mar.* 36, 477-480.
56. Davidson, I.W., Sutherland, I.W. y Lawson, C.J. (1976) Purification and properties of an alginate lyase from a marine bacterium. *Biochem. J.* 159, 707-713.
57. Matsubara, Y., Kawada, R., Iwasaki, K. y Muramatsu, T. (1998) Extracellular poly(alpha-L-gulonate)lyase from *Corynebacterium* sp: purification, characteristics, and conformational properties. *J. Protein Chem.* 17, 29-36.
58. Hansen, J.B., Doubet, R.S. y Ram, J. (1984) Alginase enzyme production by *Bacillus circulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 704-709.
59. Yoon, H.-J., Hashimoto, W., Miyake, O., Okamoto, M., Mikami, B. y Murata, K. (2000) Overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of *Sphingomonas* sp. A1 alginate lyases. *Protein Expression and Purification* 19, 84-90.
60. Yonemoto, Y., Murata, K., Kimura, A., Yamaguchi, H. y Okayama, K. (1991) Bacterial alginate lyase: characterization of alginate lyase-producing bacteria and purification of the enzyme. *J. Ferment. Bioeng.* 72, 152-157.
61. Baron, A.J., Wong, T.Y., Hicks, S.J., Gacesa, P., Willcork, D. y Mcpherson, M.J. (1994) Alginate lyase from *Klebsiella pneumoniae*, subsp. aerogenes: gene cloning, sequence analysis and high-level production in *Escherichia coli*. *Gene*, 143, 61-66.
62. Davidson, I.W., Lawson, C.J y Sutherland, I.W. (1977) An alginate lysate from *Azotobacter vinelandii* phage. *J. Gen. Microbiol.* 98, 223-229.
63. Kennedy, L., McDowell, K. y Sutherland, I.W. (1992) Alginases from *Azotobacter* species. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2465-2471.
64. Schaumann, K. y Weide, G. (1990) Enzymatic degradation of alginate by marine fungi. *Hidrobiología.* 204/205, 589-596.
65. Nakada, H.I. y Sweeny, P.C. (1967) Alginate acid degradation by alginases from abalone hepatopancreas. *J. Biol. Chem.* 242, 845-851.



66. Van der Meulen, H.J., Harder, W. y Veldkamp, H. (1974) Isolation and characterization of *Cytophaga flevensis* sp. Nov., a new agarolytic flexibacterium. *Antoine van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 40, 329-346.
67. Morrice, L., McLean, M., Williamson, F. y Long, W. (1983)  $\beta$ -agarases I and II from *Pseudomonas atlantica*. *Eur. J. Biochem.* 135, 553-558.
68. Aoki, T., Araki, T. y Kitamikado, M. (1990) Purification and characterization of a novel  $\beta$ -agarase from *Vibrio* sp. AP-2. *Eur. J. Biochem.* 187, 461-465.
69. Hodgson, D.A. y Chater, K.F. (1981) A chromosomal locus controlling extracellular agarase production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its inactivation by chromosomal integration of plasmid SCP1. *J. Gen. Microbiol.* 124, 339-348.
70. Usov, A.I. y Miroshnikova, L. I. (1975) Isolation of agarase from *Littorina mandshurica* by affinity chromatography on Biogel A. *Carbohyd. Res.* 43, 204-207.
71. Gómez-Pinchetti, J.L. y García-Reina, G. (1993) Enzymes from marine phycophages that degrade cell walls of seaweeds. *Mar. Biol.* 116, 553-558.
72. Hernández-Santoyo, A., Hernández-Arana, A., Arreguín-Espinosa, R. y Rodríguez-Romero, A., (1998) Purification and characterization of several digestive proteases from the blue abalone, *Haliotis fulgens*. *Aquaculture* 159, 203-216.
73. Desphande, M.U., Erikson, R.E. y Petterson, L.G. (1984) An assay for selective determination of exo-1,4- $\beta$ -glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes. *Anal. Biochem.* 138, 481-487.
74. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Garther, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. y Klenk, D.C. (1985). Measure of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
75. Neuhoff, V., Stamm, R. y Eibl, H. (1985) Clear background and highly sensitive protein staining with coomassie blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* 6, 427-448.
76. Jensen O. N., Larsem, M. R. y Roepststoff, P. (1998) Mass spectrometric identification and microcharacterization of proteins from electrophoretic gels: Strategies and applications. *Proteins* 2, 74-89.

77. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
78. Cassim, J.Y. and Young, J.T. (1969) A computerized calibration of the circular dichrometer. *Biochemistry* 8, 1947-1951.
79. Perczel, A., Park, K. y Fasman, G.D. (1992) Analysis of the circular dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: A practical guide. *Anal. Biochem.* 203, 83-93.
80. Hennessey, J.P. y Johnson, W.C. (1981) Information content in the circular dichroism of proteins. *Biochemistry* 20, 1085-1094.
81. Venyaminov, S.Y. y Vassilenko, K.S. (1994) Determination of protein tertiary structure class from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.* 222, 176-184.
82. Jena, S.S. y Bohidar, H.B. (1993) Determination of absolute polydispersity and molecular weight distribution for high molecular weight polymers from dynamic light scattering. *J. Chem. Phys.* 99, 673-681.
83. Bishop, J.B., Martin, J.C. y Rosenblum, W. M. (1991) A light scattering method for qualitatively monitoring aggregation rates in macromolecular systems. *J. Crystal Growth* 110, 164-170.
84. Georgalis, Y., Schueler, J., Frank, J., Soumpasis, M.D. y Saenger, W. (1995) Protein crystallization screening through scattering techniques. *Adv. Coll. Interface Sci.* 58, 57-86.
85. Mushol, M. y Rosenberger, F. (1995) Interactions in undersaturated and supersaturated lysozyme solutions: Static and dynamic light scattering results. *J. Chem. Phys.* 103, 10424-10432.
86. Sidhartha, Jena, S. y Himadri, B.B. (1993) Determination of absolute polydispersity and molecular weight distribution of high molecular weight polymers from dynamic light scattering. *J. Chem. Phys.* 99, 673-681.
87. Mc Pherson, A. (1999) Crystallization of biological macromolecules. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 127-337 pp.
88. Bragg, W.L. y Perutz, M.F. (1954) X-ray crystallography. *Acta Crystallog.* 70, 24-39.
89. Ducruix, A. y Giegé, R. (1992) Methods of crystallization. En: *Crystallization of nucleic acids and proteins*. Ducruix, A. y Giegé, R. Eds. Oxford University Press, USA 73-98 pp.
90. Lo, N (1998) A cellulase gene of termite origin. *Nature* 394, 330-331.

91. Erasmus, J.H., Cook, P.A. y Coyne, V.E. (1997) The role of bacteria in the digestion of seaweed by the abalone *Haliotis midae*. *Aquaculture* 155, 377-386.
92. Stark, J.R. y Walter, R.S. (1983) *Comp. Biochem. Physiol.*, B 76, 173-177.
93. Xue, X.M., Anderson, A.J., Richardson, N.A., Anderson, A.J., Xue, G.P. y Mather, P.B. (1999) Characterization of cellulase activity in the digestive system of the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Aquaculture* 180, 373-386.
94. Hayashida, S., Ohta, K. y Mo, K. (1998) Cellulases of *Humicola insolens* and *Humicola grisea*. En: *Methods in Enzymology*, Vol. 160, Wood, W.A. y Kellogg, S.T., Eds., Academic Press, 323-332 pp.
95. Wilson, D.B. (1998) Cellulases of *Thermomonospora fusca*. En: *Methods in enzymology*, Vol. 160, Wood, W.A. y Kellogg, S.T., Eds., Academic Press, 314-323 pp.
96. Ganju, R.K., Murthy, S.K. y Vithayathil, P.J. (1989) Purification and characterization of two cellobiohydrolases from *Chaetomium thermophile* var. *Coprophile*. *Biochim. Biophys. Acta* 993, 266-274.
97. Saloheimo, A., Henrissat, B., Hoffrén, A.-M., Teleman, O. y Penttilä, M. (1994) A novel, small endoglucanase gene, *egl5*, from *Trichoderma reesei* isolated by expression in yeast. *Mol. Microbiol.* 13, 219-228.
98. Wood, T.M., Wilson, C.A. y McCrae, S.I. (1995) The cellulase system of the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*: studies on the properties of fractions rich in endo-(1-4)- $\beta$ -D-glucanase activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 177-184.
99. Sulzenbacher, G., Shareck, F., Morosoli, R., Dupont, C. y Davies, G. (1997) The *Streptomyces lividans* family 12 endoglucanase: Construction of the catalytic core, expression, and X-ray structure at 1.75 Å resolution. *Biochemistry* 36, 16032-16039.
100. Henriksson, G., Nutt, A., Henriksson, H., Pettersson, B., Ståhlberg, J., Johansson, G. y Pettersson, G. (1999) Endoglucanase 28 (Cel12A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulase. *Eur. J. Biochem.* 259, 88-95.
101. Byrne, K.A., Lehnert, S.A., Johnson, S.E. y Moore, S.S. (1999) Isolation of a cDNA encoding a putative cellulase in the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Gene* 239, 317-324.

102. Lee, L.L.-Y. y Lee, J.C. (1987) Thermal stability of proteins in the presence of poly(ethylene glycols). *Biochemistry* 26, 7813-7819.
103. Minton, A.P. (2000) Implications of macromolecular crowding for protein assembly. *Curr Opin Struct Biol.* 10, 34-39.
104. Manavalan, P. y Johnson, W.C. (1983) Sensitivity of circular dichroism to protein tertiary structure class. *Nature* 305, 831-832.
105. Lai, B., Cao, A. And Lai, L. (2000) Organic cosolvents and hen egg white lysozyme folding. *Biochim. Biophys. Acta* 1543, 115-122.
106. Goodenough, P.W., Clark, D.C., Durrant, A.J., Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P. y Waksman, G. (1991) Structural analysis by circular dichroism of some enzymes involved in plant cell wall degradation. *FEBS Lett.* 282, 355-358.
107. Harvey, A., Hrmova, M., De Gori, R., Varghese, J.N. and Fincher, G.B. (2000) Comparative modeling of the three-dimensional structures of family 3 glycoside hydrolases. *Proteins* 41, 257-269.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND BEHAVIOR IN SOLUTION OF THREE CELLULASES FROM *Haliotis fulgens*

Alejandra Hernández-Santoyo<sup>1</sup>, Arturo Rojo-Domínguez<sup>1</sup>, Enrique García-Hernández<sup>1</sup> and Adela Rodríguez-Romero<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510. México, D.F. <sup>1</sup>Departamento de Química. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Iztapalapa 09340. México, D.F.

**Abstract:** Three proteins that showed activity over cellulosic substrates were isolated from the hepatopancreas of the blue abalone *Haliotis fulgens*. The purified cellulases are acidic with molecular weights between 17 900 and 30 300. Activity experiments indicated that they are endo-, exo- and  $\beta$ -glucanases. These proteins form large aggregates as demonstrated by means of DLS experiments, which can be dissociated in the presence of polyethylene glycol and mannitol. The circular dichroism spectra in the far UV indicated that the enzymes belong to the  $\beta$ - $\beta$  family.

### INTRODUCTION

Cellulose is the most abundant polysaccharide on earth and it is composed of 1,4-linked  $\beta$ -D-glucose units. Effective hydrolysis of this polysaccharide requires a collection of free cellulases and/or multiple component complexes called cellulosomes [1,2]. The major sources of glycohydrolases are cellulolytic microorganisms, including bacteria and fungi that utilize cellulose as their energy source. These organisms produce different cellulolytic enzymes, which have been classified into three types: endoglucanases ( $\beta$ -1,4-D-glucan 4-glucohydrolase, EC 3.2.1.4), exoglucanases ( $\beta$ -1,4-D-glucan cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91), and  $\beta$ -glucosidases ( $\beta$ -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21) [3]. Crystalline cellulose is efficiently hydrolyzed by the synergistic action of the three types of cellulases.

fractions were further purified by means of HPLC with a POROS HQ/H column (4.6 x 100 mm) installed in a Beckman equipment. Bound proteins were eluted with a linear gradient of 0.0-1.0 M NaCl (0.02 M min<sup>-1</sup>) in the same buffer. The fractions showing cellulase activity were rechromatographed once under the same conditions.

#### *Enzyme characterization*

Molecular weight and isoelectric point were determined by SDS-PAGE electrophoresis and isoelectric focusing (Phast Gel IEF 3-9 slabs), respectively, using a Phast System (Pharmacia LKB) and protocols from that company. Gels were developed according to Neuhoff [7]. To confirm the homogeneity and molecular weight, nanoelectrospray mass spectra were acquired on an Esquire ion trap mass spectrometer (Bruker-Flanzen Analytical GmbH) as described by Jensen *et al.*, [8].

To determine the optimum pH for the enzymes, curves of activity over three different substrates vs. pH (2.5-10) were done. CMC, paper and salicin were used for Cel I, Cel II and Cel III, respectively. Glycine-HCl was used in the pH range 2.5-3.5, sodium citrate buffer for 3.0-6.0, Tris-HCl for pH 7.0-8.0 and glycine-NaOH buffer in the pH range 9-10 (in all cases the buffer concentration was 0.05M). Then, a curve of activity vs. temperature was obtained at pH 5.5 for Cel I (CMC) and Cel III (salicin) and 8 for Cel II (filter paper).

Amino acid composition was analyzed by reversed-phase HPLC of the dabsyl derivatives after complete hydrolysis with 6 M HCl at 110 °C for 22 h, as described by the protocols from the company (Dabs-Amino Acid Kit, Fullerton, CA, USA). We used an Ultrasphere-dabsyl C-18 column (250 x 4.6 mm) on the Beckman HPLC. Tyrosine protection was achieved by adding 0.1% phenol (1 mg/ml) to the hydrolysis reagent.

Protein aggregation measured as estimated molecular mass and size distribution (polydispersity) was determined by dynamic light scattering (DLS). Measurements were performed using a DynaPro-801 Instrument (Protein Solutions, Co.) and the software Dynamics. Samples in 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 were injected through Whatman Anotop 0.02 µm filters. Multiple measurements were obtained for the different enzymes varying protein concentration (1.5-10 mg/ml). To investigate the reversibility of the aggregation, compounds such as polyethylene glycol 6000 (PEG-6000) and mannitol were used.

Circular dichroism (CD) data were recorded at 25°C on a Jasco J-700 spectropolarimeter. Measurements were made in the far-ultraviolet region (190-260 nm), employing protein solutions of 0.25 mg/ml in a 0.1 cm pathlength cell. Samples were first dialyzed against a 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 8.0. CD values are reported as mean residue ellipticity,  $[\theta]$ , which was calculated by using Mr 110 per residue. Multiple independent curves were obtained by varying pH or in the presence of mannitol and PEG.

## RESULTS AND DISCUSSION

Fungal and bacterial glycosyl hydrolases have been thoroughly studied. However, it was until very recently that enzymes from the digestive organs of insects [9] and mollusks [10,11], capable of hydrolyzing cellulose began to be studied. Last year, a partially purified cellulase from a marine herbivore, the crayfish *Cherax quadricarinatus*, was described [5]. In an effort to get deeper insight into the properties of this type of enzymes, here we describe the purification and physicochemical characterization of three glycohydrolases from abalone hepatopancreas. Figure 1 shows the elution profile obtained after ion-exchange chromatography. The

enzymes. The three cellulases showed to be acid proteins. Their isoelectric points were 4.9 (Cel I), 4.0 (Cel II) and 3.6 (Cel III), resembling fungal cellulases in this respect [12,13,15].

Table 1. Purification of the three cellulases from the blue abalone, *H. fulgens*. One hepatopancreas (85g) was used for these calculations

Purification step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Specific activity <sup>a</sup> (U/mg)	Yield (%)
Crude extract	400	1240	14.8	100
Ammonium sulfate 35-65% fraction	240	720	23.3	91.5
DEAE-Sepharose				
Cel I	86	110.3	53.3	32.0
Cel II	135	230.4	20.4	25.61
Cel III	120	239.6	13.7	17.86
HPLC-POROS HQ/H				
Cel I	20	8.0	433.3	18.9
Cel II	31	17.4	187.3	17.8
Cel III	27	20.2	102.6	11.3

<sup>a</sup>One unit was defined as the amount of enzyme that produces 1 $\mu$ mol of glucose per min at 45°C. Activities were determined over CMC.

To find the substrate specificity of the three enzymes, several substrates were tested, including natural polysaccharides from marine sources. However, none of these enzymes showed activity over polysaccharides lacking the  $\beta$ -1,4 linkage. As mentioned above, the three enzymes showed activity over CMC (433 $\pm$ 4, 187 $\pm$ 3 and 102 $\pm$ 3 U/mg for Cel I, Cel II and Cel III, respectively). Besides, Cel II presented activity towards filter paper (102 $\pm$ 3 U/mg), and over *p*NPC (95.5 $\pm$ 3 units/mg) and *p*NPL (74.5 $\pm$ 2 units/mg). These values are similar to others reported for exocellulases. On the other hand, Cel-III is active over CMC, filter paper (20 $\pm$ 2 U/mg), salicin (95 $\pm$ 4 U/mg), *p*NPC (32.3 $\pm$ 2 units/mg) and *p*NPG (52.5 $\pm$ 3 units/mg). According to these results, Cel I is an endocellulase (endoglucanase). Cel II and III displayed less specificity; Cel II has endo and exocellulase activity, and Cel III could be considered as endo, exo and  $\beta$  glucanase [3].

When we analyzed the effect of pH on cellulase activity over CMC, we found that the three enzymes had an optimum of 5.5, and this value was the same when Cel III hydrolyzed salicin. However, when Cel II acted upon filter paper, the optimum value was 8.5, maybe because in this condition this insoluble substrate is more susceptible to hydrolysis. On the other hand, the three cellulases showed maximal cellulolytic activity at 45°C over CMC and salicin, and at 37°C when filter paper was used.

The amino acid compositions of the three purified enzymes and a comparison with two related enzymes from other sources are listed in Table 2. It is evident that Cel I, II and III are very similar. Acidic and hydrophobic amino acids are the most abundant in the three cases. Nevertheless, Cel I differs from Cel II and III with respect to Gly, Phe and Glx content. A comparative analysis of the amino acid composition of cellulases from *H. fulgens* to equivalent enzymes from other sources (Table 2), revealed that the three enzymes differ from others, mainly with respect to cysteine, methionine, proline and histidine [12,20].

The solution behavior of the enzymes was analyzed by means of DLS, a technique that allows measuring the diffusion coefficient ( $D$ ) of a macromolecule undergoing Brownian motion in solution [19]. Using the Dynamics data software, we estimated the molecular weight and polydispersity. Aggregation of these enzymes was investigated as a function of three parameters: protein concentration (1.5-10 mg/ml), mannitol concentration (0.1-5%), and PEG-6000 concentration (0.5-15%). DLS experiments revealed that the three cellulases tend to strongly aggregate in solution. At protein concentrations between 1.5 and 2.5 mg/ml in the Tris buffer, the enzymes form multimers (~160 to 200 kDa). At protein concentrations above 5, 8 and 10 mg/ml for Cel I, II and III, respectively, the enzymes formed very large aggregates ( $1-2.3 \cdot 10^6$  kDa). These large multimers precipitated after a few hours. As judged from polydispersity measurements, the size distribution of the aggregates broadens as protein concentration is raised. Monomers were not observed at any protein concentration. In an attempt to obtain the monomeric species of the cellulases, the effect of the additives mannitol and PEG-6000 on protein aggregation was tested. In general, polyhydric alcohols and sugars have been introduced into the solvent medium in order to stabilize biological macromolecules in solution [21]. The two cosolutes strongly affected the solution behavior of the enzymes. PEG-6000 was found to modify the aggregation state of Cel I and Cel II, while mannitol affected that of Cel III. As shown in Figure 2, at low additive concentrations the cellulases form oligomers smaller than those observed in a cosolute-free solution.

Table 2. Amino acid composition, as mole percent, of cellulases from *Haliotis fulgens*.

Amino acids	Cel I	Cel II	Cel III	EG <sup>1</sup>	E2 <sup>2</sup>
Lys	4.3	3.5	2.1	2.6	1.7
His	3.3	4.4	3.1	2.8	2.4
Arg	2.8	5.0	4.5	3.6	3.4
Asx	9.9	9.6	12.0	12.8	11.9
Thr	5.0	6.2	6.0	5.8	8.6
Ser	6.2	6.0	5.7	8.8	8.4
Glx	6.4	10.6	9.9	7.5	7.6
Pro	10.3	11.3	10.6	4.1	8.5
Gly	14.5	8.0	7.6	9.8	9.9
Ala	7.1	6.3	9.1	12.6	13.8
Cys	4.5	5.0	2.7	1.3	1.1
Val	4.6	5.7	5.2	4.5	6.0
Met	2.8	5.1	3.5	1.5	2.0
Ile	5.7	5.5	5.2	2.1	5.8
Leu	6.0	5.1	4.0	9.0	3.9
Tyr	2.5	4.3	1.4	5.3	2.4
Phe	3.7	8.8	7.3	3.8	2.7
Trp	ND	ND	ND	2.4	ND

<sup>1</sup> Endoglucanase from *Cherax quadricarinatus* [24]

<sup>2</sup> Endoglucanase from *Thermomonospora fusca* [12]

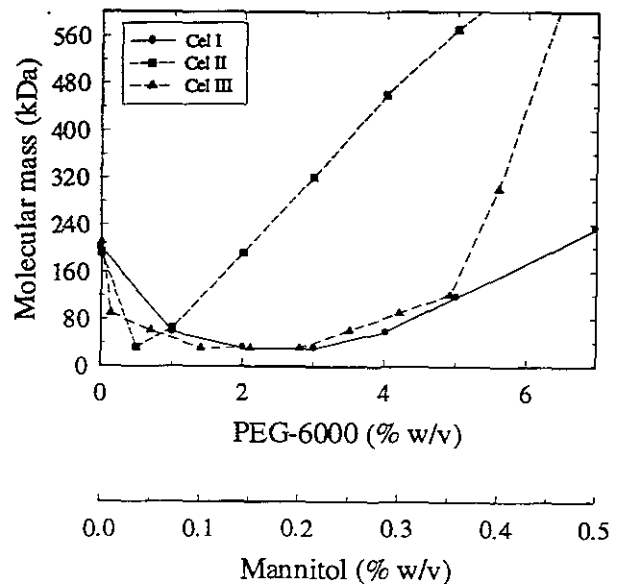


Figure 2. Effect of PEG and mannitol concentration on the aggregation of the purified cellulases. The sample concentration was 1.5 mg/ml. Cel I and II were solubilized with PEG and Cel III with mannitol.



The monomer becomes the predominant state for Cel I and Cel II at PEG concentrations of 2-3% and 0.5%, respectively, while for Cel III at mannitol concentrations of 0.1-0.2%. Under these conditions, the protein solutions appear fundamentally monodisperse. Higher additive concentrations lead the enzymes to aggregate again. The results of DLS indicate that, for the three enzymes, several species exist before the formation of large aggregates. These results could be useful in finding appropriate conditions for crystallization of some of these enzymes. Regarding the activity of these enzymes in different aggregation states, we found that the three of them were more active when they were aggregated (1.5 mg/ml of protein in the Tris buffer) ( $435\pm3$ ,  $185\pm3$  and  $100\pm3$  U/mg for Cel I, II and III, respectively). In the monomeric form, obtained after adding PEG-6000 and mannitol in the appropriate concentrations for each enzyme, we found that the activity was lower ( $20\pm3$ ,  $35\pm2$ , and  $26\pm2$  U/mg). These results may indicate that the enzymes are unstable in monomeric form.

Figure 3 shows the far-UV CD spectra of the three purified enzymes at pH 8.0. The spectra share as a common feature the presence of both a negative band centered around 210 nm, and a positive band below 200 nm. Measurements obtained in the presence of different concentrations of the additives were virtually identical to those in Figure 3, indicating that the enzymes do not suffer significant structural changes upon aggregation or dissociation. CD spectra were analyzed by means of two different deconvoluting programs to estimate the secondary structure composition of the enzymes. As shown in Table 3, the CD spectra of the three cellulases are consistent with a high content of  $\beta$ -sheet (approx. 50%) and a moderate to low content of  $\alpha$ -helix. CD spectra were also analyzed by means of the program DEFCLASS [22] to determine the tertiary structure class. According to this analysis, the three enzymes belong to the  $\beta$ - $\beta$  class, in agreement with the estimations of secondary structure. Among the fungal cellulases of known tertiary structure only those belonging to the clans GH-B and GH-C and to the family 45 [23], have a content of  $\beta$  structure comparable to the ones obtained for the abalone cellulases. However, no comparison can be done with any invertebrate cellulase due to the lack on information regarding their structure. Further investigations on the amino acid sequence and conditions for crystallization of these abalone enzymes are in progress.

Table 3. Fraction contribution of secondary structures to CD curves of cellulases from *H. fulgens*, estimated by two methods.

Enzyme	Method	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Sheet	Turn	Other	Predicted class
Cel I	CCA <sup>1</sup>	0.113	0.482	0.141	0.264	Beta-Beta
	Henessey-Johnson <sup>2</sup>	0.124	0.481	0.053	0.342	
Cel II	CCA	0.207	0.408	0.053	0.334	Beta-Beta
	Henessey-Johnson	0.180	0.420	0.150	0.260	
Cel III	CCA	0.205	0.352	0.168	0.275	Beta-Beta
	Henessey-Johnson	0.249	0.328	0.053	0.370	

<sup>1</sup>[24], <sup>2</sup>[25]

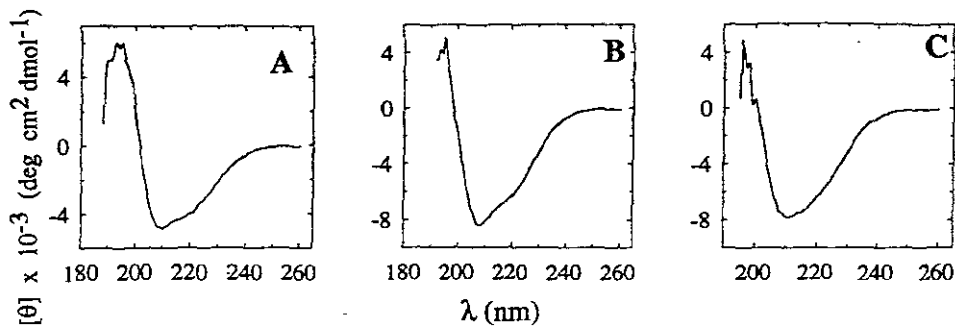


Figure 3. CD spectra of the cellulases from *H. fulgens*, at pH 8.0. A) Cel I, B) Cel II and C) Cel III.

#### ACKNOWLEDGMENTS.

We thank the Centro Regional de Investigación Pesquera of La Paz, Baja California Sur, México and the Instituto Nacional de la Pesca for providing the abalone, and to Dr. Catherine Stacey and Bruker Daltonics Inc, Billeirica, MA, U.S.A. for performing the MS experiments. This work was financially supported by CONACyT (Grant 32417-E).

#### REFERENCES

- [1] Bayer, E.A., Chanzy, H., Lamed, R., and Shoham, Y. (1998) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8, 548-557.
- [2] Bayer, E.A., Shimon, L. J., Shoham, Y. and Lamed, R. J. (1999) *Struct. Biol.*, 124, 221-234.
- [3] Wood, T. and Mahalingeshwara, T. (1988) *Methods Enzymol.*, 160, 87-112.
- [4] Gómez-Pinchetti, J. L. and García-Reina, G. (1993) *Mar. Biol.*, 116, 553-558.
- [5] Xue, X.M., Anderson, A.J., Richardson, N.A., Anderson, A.J., Xue, G. P. and Mather, P.B. (1999) *Aquaculture* 180, 373-386.
- [6] Desphande, M.U., Erikson, R.E. and L.G. Pettersson. (1984) *Anal. Biochem.* 138, 481-487.
- [7] Neuhoff, V., Stamm, R. and Eibl, H. (1985) *Electrophoresis*, 6, 427-448.
- [8] Jensen O.N., Larsem, M. R. and Roepstorff, P. (1998) *Proteins*, 2, 74-89.
- [9] Lo, N (1998) *Nature*, 394, 330-331.
- [10] Stark, J.R., Walter, R.S. (1983) *Comp. Biochem. Physiol.*, B 76, 173-177.
- [11] Erasmus, J.H., Cook, P.A. and Coyne, V.E. (1997) *Aquaculture*, 155, 377-386.
- [12] Hayashida, S., Ohta, K. and Mo, K. (1998) *Methods Enzymol.*, 80, 323-332.
- [13] Wilson, D.B. (1998) *Methods Enzymol.*, 80, 314-323.
- [14] Ganju, R.K., Murthy, S.K. and Vithayathil, P.J. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, 993, 266-274.
- [15] Saloheimo, A., Henrissat, B., Hoffrén, A.-M., Telemán, O. and Penttilä, M. (1994) *Mol. Microbiol.*, 13, 219-228.
- [16] Wood, T.M., Wilson, C.A. and McCrae, S.I. (1995) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 177-184.
- [17] Sulzenbacher, G., Shareck, F., Morosoli, R., Dupont, C. and Davies, G. (1997) *Biochemistry*, 36, 16032-16039.
- [18] Henriksson, G., Nutt, A., Henriksson, H., Pettersson, B., Ståhlberg, J., Johansson, G. and Pettersson, G. (1999) *Eur. J. Biochem.*, 259, 88-95.
- [19] Jena, S.S. and Bohidar, H.B. (1993) *J. Chem. Phys.*, 99, 673-681.
- [20] Byrne, K.A., Lehnert, S.A., Johnson, S.E. and Moore, S.S. (1999) *Gene*, 239, 317-324.
- [21] Lee, L.L.-Y. and Lee, J. C. (1987) *Biochemistry*, 26, 7813-7819.
- [22] Venyaminov, S.Y. and Vassilenko, K.S. (1994) *Anal. Biochem.*, 222, 176-184.
- [23] Bayer, E.A., Chanzy, H., Lamed, R. and Shoham, Y. (1998) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8, 548-557.
- [24] Perczel, A., Park, K. and Fasman, G.D. (1992) *Anal. Biochem.*, 203, 83-93.
- [25] Hennessey, J.P. Jr. and Johnson, W.C. Jr. (1981) *Biochemistry*, 20, 1085-1094.