



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PURIFICACION Y CARACTERIZACION BIOQUÍMICA DE
DOS ALGINASAS DEL ABULON ROJO,

Haliotis rufescens

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

Evelin María Fernanda Larios Martínez

MÉXICO, D.F.

2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Mireya Rodríguez Penagos
VOCAL: Dr. José Pedraza Chaverri
SECRETARIO: Dra. Alejandra Hernández Santoyo
1er. SUPLENTE: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez
2° SUPLENTE: Dra. Marina Gavilanes Ruiz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE BIOMACROMOLÉCULAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

Dra. ALEJANDRA HERNÁNDEZ SANTOYO

SUSTENTANTE

EVELIN MARIA FERNANDA LARIOS MARTÍNEZ

RESUMEN

Las alginasas también conocidas como alginato liasas o alginato despolimerasas, rompen el alginato por medio de un mecanismo de eliminación β . Estas se clasifican con base en el bloque del polímero de ácido algínico que hidrolizan preferentemente. Si reconocen los bloques M (ácido manurónico), se clasifican como EC 4.2.2.3, poli (M) liasa [(1-4)- β -D-manuronan liasa] y si reconocen los bloques G (ácido gulurónico), como EC 4.2.2.11, poli (G) liasa [(1-4)- α -L-guluronan liasa]. Estas enzimas se han aislado de algas marinas, moluscos, microorganismos y bacterias y su aplicación es muy grande tanto en medicina como en biotecnología. Sin embargo, a pesar de que se han identificado de numerosas fuentes, sólo se han caracterizado unas cuantas. Las alginasas de moluscos marinos sufren fuertes procesos de oligomerización, mecanismo que utilizan para aumentar su actividad en varios ordenes de magnitud por arriba de cualquier otra descrita a la fecha, sin embargo, si este comportamiento no se controla pueden ser muy inestables.

En el presente trabajo se purificaron dos alginasas del molusco marino *Haliotis rufescens*. Para lograr esto se utilizó la propiedad que tiene el alginato de polimerizar en presencia de cationes divalentes, de esta manera se diseñó un soporte para purificar a dichas enzimas por cromatografía de afinidad. Con esta técnica se logró purificar en un solo paso a dos alginasas, una con especificidad por el ácido manurónico (Manuronidasa) y la otra por el gulurónico (Guluronidasa). La Manuronidasa presentó una masa de 8.5 kDa y los valores óptimos para su actividad fueron a una temperatura de 40 y 90 °C y a pH a 5.0. Además, su actividad se incrementa en presencia de Ca^{2+} , Zn^{2+} e isopropanol. La alginasa con actividad de Guluronidasa presentó una masa molecular de 36.3 kDa y los valores óptimos para su actividad fueron a una temperatura de 50 y 90 °C y a pH de 5. Se observó que aditivos como el Ca^{2+} , Zn^{2+} glicerol y tween 80 incrementan su actividad específica. Ambas alginasas son termorresistentes y mantienen su actividad aún después de incuban por 1 h a 90 °C. Además, la manuronidasa es una proteína intrínsecamente desordenada, mientras que la guluronidasa posee en su estructura hojas β como lo demostraron los estudios de dicroísmo circular en el UV lejano. Ambas alginasas se estructuran en presencia de Zinc.

CONTENIDO

RESUMEN.....	3
ABREVIATURAS	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1. POLISACÁRIDOS	8
2.2. POLISACÁRIDOS DE ALGAS	8
2.3. ALGINATO.....	9
2.3.1. <i>Características fisicoquímicas del alginato</i>	10
2.3.2 <i>Viscosidad</i>	12
2.3.3 <i>Termoestabilidad</i>	12
2.3.4. <i>Aplicaciones del alginato</i>	12
2.4. ENZIMAS QUE DEGRADAN POLISACÁRIDOS.....	13
2.5 POLISACÁRIDO LIASAS	13
2.6 ALGINASAS.....	14
2.6.1 <i>Mecanismo de acción de la alginato liasa</i>	15
2.6.3 <i>Aplicaciones de las alginasas</i>	18
2.7 ABULÓN ROJO, <i>HALIOTIS RUFESCENS</i>	20
3. ANTECEDENTES.....	21
3.1 TOPOLOGÍA DEL SITIO ACTIVO Y MECANISMO CATALÍTICO.	24
3.2 ALGINASAS EN GASTERÓPODOS MARINOS	25
4. OBJETIVOS.....	26
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	27
5.2 EXTRACCIÓN DE LAS ALGINASAS	27
5.3 PURIFICACIÓN DE LAS ALGINASAS DE <i>HALIOTIS RUFESCENS</i>	27
5.3.1 <i>Preparación de las perlas insolubles de alginato</i>	27
5.3.2 <i>Purificación</i>	28
5.4 CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA PURIFICADA.....	29
5.4.1 <i>Curva de calibración</i>	29
5.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ALGINOLÍTICA.....	30
5.5.1. <i>Fundamento de la técnica</i>	30
5.5.2 <i>Preparación del reactivo DNS</i>	31
5.5.3 <i>Determinación de la actividad de las alginato liasas de H. rufescens</i>	32
5.6 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLEULAR	33
5.6.1 <i>Electroforésis SDS-PAGE</i>	33
5.6.2 <i>Espectrometría de masas MALDI-TOF</i>	33

5.7 DETERMINACIÓN DE LOS VALORES ÓPTIMOS DE PH Y TEMPERATURA PARA LA ACTIVIDAD DE LAS ALGINASAS.....	34
5.8 EFECTO DE DIFERENTES ADITIVOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS DOS ALGINASAS PURIFICADAS.....	34
5.9 DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA.....	35
5.10 CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES.....	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
6.1 PURIFICACIÓN DE LAS ALGINASAS DE <i>H. RUFESCENS</i>	39
6.2 DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR.....	42
6.2.1 <i>Electroforesis</i>	42
6.2.2 <i>Espectrometría de masas</i>	43
6.2.3 <i>Determinación del contenido de azúcares totales de las alginasas puras</i>	44
6.3 EFECTO DEL PH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ALGINASAS DE <i>H. RUFESCENS</i>	45
6.4 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD DE LAS ALGINASAS DE <i>H. RUFESCENS</i>	46
6.6 EFECTO DE ADITIVOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ALGINASAS PURIFICADAS.....	49
6.7 ESTUDIOS DE DICROÍSMO CIRCULAR (DC).....	51
7. CONCLUSIONES.....	53
8. PERSPECTIVAS.....	54
9. REFERENCIAS.....	55

ABREVIATURAS

BCA: Ácido bicinconínico

BSA: Albúmina de suero de bovino

Da: Daltones

DC: Dicroísmo circular

DHB: Ácido 2,5-Dihidroxibenzoico

DNS: Ácido dinitrosalicílico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

G: Ácido gulurónico

GG: Bloque de ácido gulurónico

kDa: kilo daltones

M: Ácido manurónico

MM: Bloque de ácido manurónico

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

MG: Bloque de ácido manurónico y gulurónico

nm: Nanómetros

PEG: Polietilenglicol

PLs: Polisacárido liasas

rpm: Revoluciones por minuto

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio

Super DHB: mezcla de ácido 2,5-dihidroxibenzoico con ácido 2-hidroxi-5 metoxibenzoico en una relación 9:1

U: Unidad de actividad

UV: Ultravioleta

1. INTRODUCCIÓN

Las alginasas también conocidas como alginato liasas, alginato despolimerasas o polisacárido liasas son proteínas que pertenecen a un grupo de enzimas que rompen polisacáridos (EC 4.2.2 -), actúan principalmente sobre polisacáridos aniónicos mediante un mecanismo de eliminación β , formando un doble enlace entre el C-4 y el C-5, la eliminación del enlace 4-O-glicosídico y la producción de 4-desoxi-L-eritrohex-4-eno piranosiluronato en el extremo no reductor de los oligosacáridos resultantes. En particular, las alginasas despolimerizan el alginato (polisacárido gelificante) que se encuentra en gran abundancia como parte de la pared celular y del material intracelular en las algas pardas (*Phaeophyceae*)^{1,2}. Dicho polisacárido es un ácido hetero-poliurónico lineal compuesto de los ácidos α -L-gulurónico (G) y el ácido β -D-manurónico (M), unidos mediante enlaces α y β 1,4. Estos dos residuos se disponen en estructuras de bloque que comprenden bloques homopoliméricos G, bloques homopoliméricos M y bloques alternantes heteropoliméricos MG³.

Las alginasas han sido aisladas de diversas fuentes tales como las algas y moluscos marinos, hongos, bacterias y virus; se clasifican en tres grupos según su especificidad; si ésta es hacia bloques G (poliguluronato liasa, EC 4.2.2.11), ó a bloques M (polimanuronato liasa, EC 4.2.2.3), o bloques MG¹. Las alginasas con especificidad por bloques G o bloques M se conocen como alginasas monofuncionales mientras que las que reconocen bloques MG son llamadas alginasas bifuncionales⁴. Por otra parte, también se agrupan en tres tipos en función de sus masas moleculares: pequeñas (25-30 kDa), de tamaño medio (cerca de 40 kDa) y grandes (> 60 kDa)⁵.

A pesar de que se han identificado alginasas de diferentes fuentes, existen pocos reportes sobre su purificación en invertebrados marinos. Esto debido a que las alginasas de éstas fuentes sufren fuertes fenómenos de oligomerización que provocan la pérdida de actividad y precipitación de la enzima si este fenómeno no es controlado. Es por esto que en nuestro laboratorio se han diseñado técnicas novedosas que permiten purificar este tipo de proteínas en poco tiempo sin perder la actividad. Por lo anterior, en el presente proyecto se purificaron y caracterizaron

bioquímicamente dos alginasas del abulón rojo *H. rufescens* utilizando técnicas novedosas que incluyen a su sustrato como un medio para mantener su estabilidad.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Polisacáridos

Los polisacáridos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, pueden tener una función de reserva como el almidón, glucógeno, algunos β -D glucanos, fructanos y algunos galactomananos; pueden tener una función estructural, clasificándose en: fibrosos como la celulosa, quitina, 1,3- β -D mananos y de matriz, que se caracterizan por su capacidad de formar geles (agar, carragenano, alginato, etc.) o bien, pueden actuar como sustancias de reconocimiento celular (polisacáridos extracelulares antigénicos e inmunogénicos). Estos polímeros (celulosa, quitina, etc) también llamados glicanos, se clasifican por los carbohidratos que los forman, el tipo de enlace que los une, la longitud de sus cadenas y el grado de ramificación. Los homopolisacáridos están constituidos por un solo tipo de monosacárido, mientras que los heteropolisacáridos están constituidos de diferentes tipos de monosacáridos. Pueden estar unidos por enlaces glicosídicos tipo alfa o beta. Los enlaces alfa son más débiles, se rompen y forman con gran facilidad, por lo que se encuentran en los polisacáridos con funciones de alimentos de reserva, como el almidón o el glucógeno. El enlace tipo beta es mucho más estable y resistente, por lo que es característico de polisacáridos con función estructural, como es el caso de la celulosa. A diferencia de las proteínas, los polisacáridos generalmente no tienen pesos moleculares definidos^{6,7}

2.2. Polisacáridos de algas

Las algas marinas, constituyen una fuente importante de polisacáridos estructurales, mucopolisacáridos y polisacáridos de reserva que constituyen entre 4 a 76% del peso seco del alga. Las algas poseen una pared celular química y estructuralmente más compleja y heterogénea que la de plantas terrestres, ésta varía incluso dentro

de la misma planta. Dicha pared 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 polisacáridos que se encuentran en la pared celular son principalmente la celulosa, las hemicelulosas y polisacáridos neutros que le confieren un soporte físico al tallo en el agua. Las algas verdes contienen polisacáridos con ácido sulfúrico, galactanos sulfatados y xilanos. Las algas cafés contienen ácido algínico, fucoïdan (fucosa sulfatada), laminarina (β -1,3 glucano) y sargasano, mientras que las algas rojas contienen agar, carragenanos, xilanos, almidón florideano (glucano similar a la amilopectina), galactanos sulfatados solubles en agua, así como porfirán^{8,9}.

2.3. Alginato

El alginato es un polisacárido gelificante encontrado en gran abundancia como parte de la pared celular y material intracelular en algas pardas (*Phaeophyceae*). Es un ácido hetero-poliurónico lineal compuesto de unidades de ácido (1-4)- β -D-manurónico (M) y su epímero, el ácido α -L-gulurónico (G). Estos se agrupan en bloques de secuencias MM, MG, unidos por enlaces glicosídicos β (1-4); y bloques GG, GM, unidos por enlaces glicosídicos α (1-4). Aunque algunos alginatos pueden existir predominantemente como un tipo de bloque, los tres bloques pueden estar presentes dentro de una molécula de alginato. La distribución y contenido de los monómeros puede ser muy variada y va desde cadenas con secuencia alternas MGMGMG, o bien en bloques MMMGGGMMM, en las que el número de monómeros en los bloques es también muy variable (Figura 1). La mayoría del alginato con aplicación comercial es obtenido principalmente del alga gigante, *Macrocystis pyrifera* que crece en las costas de California y Baja California. Otra importante fuente son las laminariaceas que crecen en zonas rocosas poco profundas como la *Laminaria digitata*, *L. hyperborea* y *Eklonia cava*. Las menos utilizadas son las llamadas algas de rocas que crecen en la zona intermareal como *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* y *Pelvetia canaliculata*. Además, es también producido por dos familias de bacterias heterotróficas, del género *Pseudomonadaceae* y *Azotobacteriaceae*^{1,3,10,11}

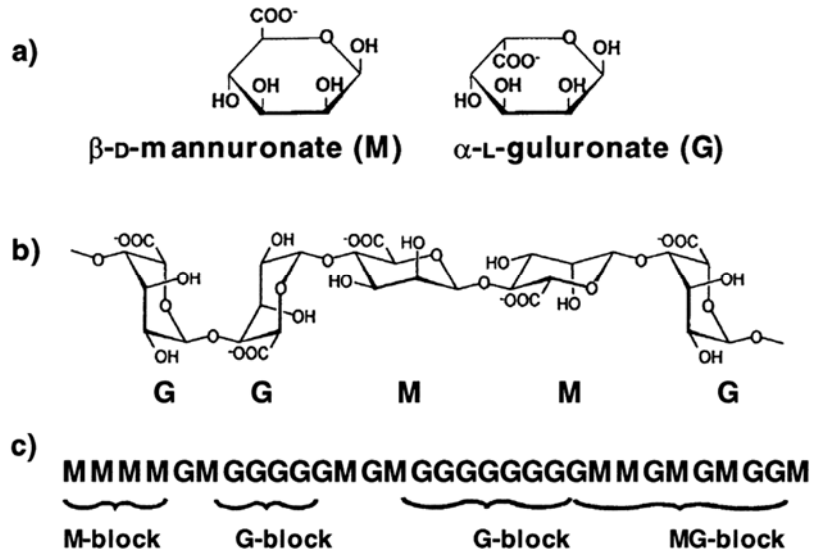


Figura 1. Características estructurales de los alginatos: (a) monómeros que forman el alginato, (b) tipos de enlaces entre bloques de alginato y (c) distribución de bloques.

2.3.1. Características fisicoquímicas del alginato

Las relaciones estructura-propiedad del alginato se han estudiado fuertemente debido a sus múltiples aplicaciones y a la extensa investigación farmacéutica que se ha desarrollado en este tema en los últimos años. Las propiedades físicas de los alginatos se rigen en gran medida por su composición y disposición de los residuos, el peso molecular del polímero y la concentración de la solución de cationes de entrecruzamiento que contienen^{12,13}. Una propiedad importante de este polímero, es su capacidad de formar geles en presencia de ciertos cationes divalentes (ó multivalentes), particularmente Ca^{2+} . Las propiedades físicas del gel dependerán de la relación de los ácidos urónicos dentro de las cadenas del polisacárido. Alginatos ricos en L-guluronato forman geles fuertes pero frágiles, mientras que los ricos en D-manuronato, forman geles débiles pero más flexibles. La relación de D-manuronato: L-guluronato (relación M:G) se puede utilizar como un índice de la naturaleza del gel que se formará en presencia de cationes divalentes. La variación en la fuerza de gel

puede relacionarse con el modo de unión de cationes, ya que se producen diversas estructuras de bloques dentro de la molécula de alginato. Todas las estructuras de bloques son polianiónicas y por lo tanto se van a formar enlaces intermoleculares iónicos con cationes di o multivalentes. Sin embargo, las regiones de poliguluronato también son capaces de quelar iones metálicos debido a la disposición espacial del anillo y del átomo de oxígeno e hidroxilo, por lo tanto forman una interacción más fuerte. Estas zonas de unión de bloques de poliguluronato se han comparado con la sección transversal de una “caja de huevo”, donde los iones Ca^{2+} son los “huevos” (Figura 2).

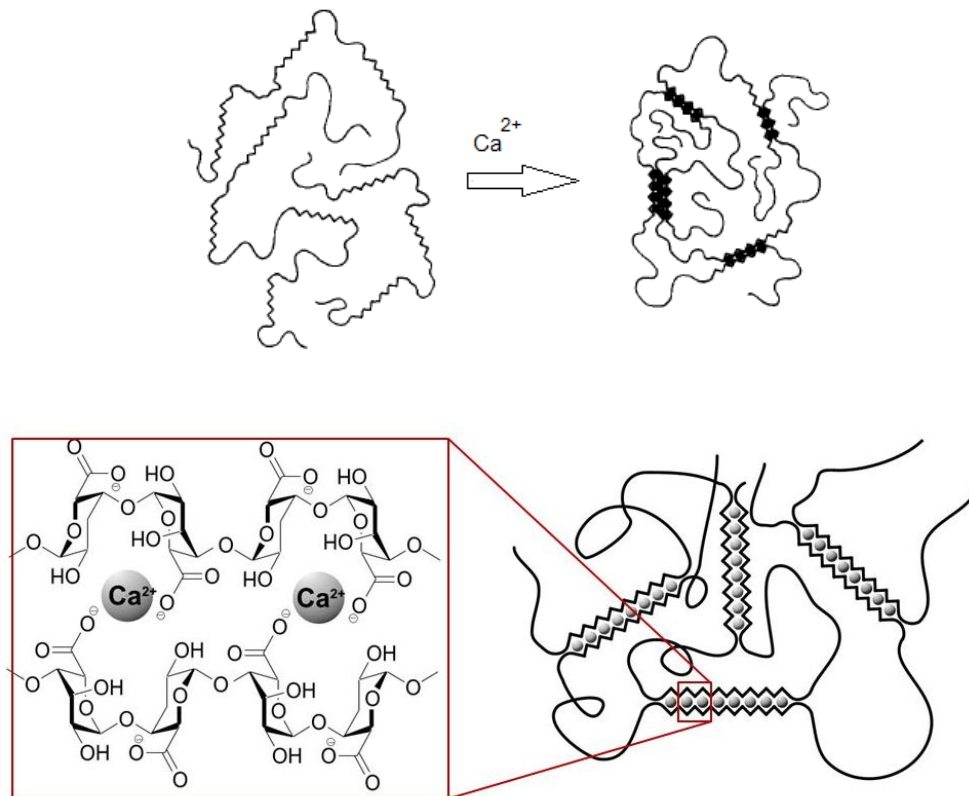


Figura 2. Formación de la estructura en forma de caja de huevo y la ubicación de los iones polivalentes que sirven de enlace de dos moléculas de polímero (Tomado de Gacesa)³².

2.3.2 Viscosidad

Aunque el alginato de sodio rico en ácido gulurónico es más soluble en agua que el alginato de sodio rico en manurónico¹⁴, la viscosidad de una solución de alginato está relacionada con la concentración de alginato y la longitud o número de monómeros presentes en los segmentos de alginato¹⁵. Alginatos con segmentos más largos se ha encontrado que tienen viscosidades más altas¹⁶. Esto implica que la viscosidad de la solución de alginato puede ser afectada por el peso molecular de los segmentos constituyentes del polímero de alginato. Es interesante señalar, sin embargo, que los alginatos de las bacterias no presentan tales correlaciones¹⁷.

2.3.3 Termoestabilidad

Se han realizado estudios de calorimetría diferencial de barrido para estudiar las propiedades térmicas y viscoelásticas de películas de alginato¹⁸. Geles de alginato termoestables se han formado en el intervalo de temperatura de entre 0 y 100 °C. Se sabe de la relación que existe entre la disminución de la rigidez del gel en función de un aumento de la temperatura¹⁹, la cual es inversamente proporcional.

2.3.4. Aplicaciones del alginato

La estructura del bloque de alginato determina las propiedades físicas del polisacárido, y en particular del tipo de gel formado en presencia de cationes divalentes, lo que ha favorecido su utilización como estabilizador, al incrementar la viscosidad y como gelificante en alimentos y bebidas; en la industria farmacéutica se ha utilizado en la encapsulación de compuestos activos con actividad antirradicales para prevenir enfermedades degenerativas y en la cicatrización de heridas, la reparación del cartílago, la regeneración ósea y la administración de fármacos, que tienen potencial en aplicaciones de regeneración tisular, también se han utilizado en la industria de biomateriales, papel e imprenta^{1,20-24}. La producción comercial de alginatos se lleva a cabo principalmente por procesos de extracción alcalina. Las algas pardas o marrón, se secan y se someten a diversos tratamientos químicos para eliminar las impurezas (metales pesados, endotoxinas, proteínas, hidratos de

carbono y otros polifenoles) normalmente presentes en las algas antes de ser transformadas en la materia prima final, que da como resultado un polvo en forma de sal de ácido¹.

2.4. Enzimas que degradan polisacáridos

Los carbohidratos son una clase muy extensa de macromoléculas esenciales que tienen todos los organismos. Estos se encuentran en su mayoría como oligo o polisacáridos, usualmente ligados a proteínas o lípidos. Dos reacciones químicas se utilizan predominantemente para la despolimerización enzimática de cadenas de polisacáridos: hidrólisis y eliminación β ^{25,26}. La hidrólisis se lleva a cabo a través de la adición de una molécula de agua para romper el enlace glicosídico, creando un nuevo extremo reductor en uno de los fragmentos, ya sea con la retención o inversión de la configuración en el C-1 y un anillo de hexosa saturado en el extremo no reductor del otro fragmento^{26,27}. La ruptura del enlace glicosídico por un mecanismo de eliminación β puede ocurrir cuando el azúcar es sustituido con un grupo ácido al lado del carbono que forma el enlace glicosídico dando lugar a la formación de un extremo reductor en un fragmento y un anillo insaturado en el extremo no reductor del segundo fragmento (Figura 3).

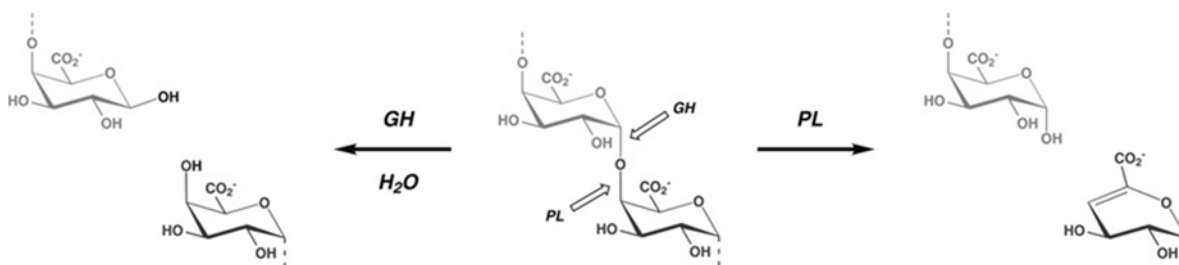


Figura 3. Enzimas que degradan polisacáridos. Glicohidroladas (GH) y Polisacárido liasas (PL) (Tomado de Lombard *et al.*)²⁸.

2.5 Polisacárido liasas

Las polisacárido liasas son un grupo de enzimas (EC 4.2.2.-) que cortan polisacáridos que contienen ácidos urónicos a través de un mecanismo de β -eliminación para generar un residuo de ácido hexenurónico insaturado y un nuevo

extremo reductor en el punto de ruptura (Figura 3). Estas proteínas son ubicuas en la naturaleza, se han encontrado desde bacteriófagos, arqueas y eubacterias, hasta eucariotes superiores como hongos, algas, plantas y mamíferos. Para todos estos organismos, las polisacárido liasas representan una estrategia complementaria a las glicosido hidrolasas (EC 3.2.1. -) para el rompimiento de polisacáridos sin la intervención de agua. Las polisacárido liasas están implicadas en diversos procesos bioquímicos incluyendo la degradación de biomasa, reciclaje de tejidos de matriz y patogénesis. Por otra parte, el uso generalizado de los ácidos poliurónicos en los sectores alimentario y médico hace a las polisacárido liasas, muy atractivas como catalizadores específicos para la modificación de sustratos tales como pectinas, alginatos y heparinas, en aplicaciones biotecnológicas. El mecanismo catalítico empleado por las polisacárido liasas se puede describir en términos generales como un conjunto de tres eventos: (i) abstracción del protón en C-5 en el anillo de azúcar de un ácido urónico o éster, por la cadena lateral de un aminoácido básico, (ii) estabilización del anión resultante por la deslocalización de la carga en el grupo carbonil de C-6 y el rompimiento del enlace O-4:C-4 facilitado por la donación de protones de un ácido catalítico para generar un ácido hexenurónico (o éster) en el nuevo extremo no reductor formado²⁸.

Las polisacárido liasas están clasificadas en 23 familias de acuerdo a su secuencia de aminoácidos (PL-1 a 23) en la base de datos CAZy²⁹. Dentro de estas familias se encuentran las alginato liasas o alginasas (PL - 5, 6, 7, 14, 15, 17 y 18).

2.6 Alginasas

Las alginato liasas catalizan la degradación del alginato por un mecanismo de eliminación β^1 y se clasifican en tres grupos según su especificidad por el sustrato: si son específicas hacia bloques G (poliguluronato liasa, EC 4.2.2.11 POLI G), hacia los bloques M (polimanuronato liasa, EC 4.2.2.3 POLI M), o hacia bloques MG^{1,5,30}. Considerando además de su secuencia de aminoácidos, a la estructura de estas proteínas, las alginato liasas se clasifican en las familias PL- 5, 7, 14 y 15, incluyendo algunas proteínas que hasta ahora se desconoce su función. Entre estas familias, las PL-5 y PL-7 actúan sobre los polímeros de alginato endolíticamente y producen

oligosacáridos mostrando diferencias entre ellas en la especificidad por el sustrato. La especificidad de una alginato liasa depende de la composición de los ácidos urónicos en el polímero de alginato, no del tipo de enlace. En contraste con la especificidad por el sustrato poli-M de las enzimas de la familia PL-5, las enzimas de la familia PL-7 exhiben diversas especificidades por el sustrato: *Sphingomonas sp* A1-II y *Corynebacterium sp.* (AlyPG) para poli-G, *Photobacterium sp* (AlxM) para poli-M y *P. aeruginosa* (PA1167) para poli-MG³¹.

2.6.1 Mecanismo de acción de la alginato liasa

Se ha propuesto que las alginato liasas funcionan mediante una reacción de 3 etapas (Figura 4)^{28,32}.

- 1) El grupo carboxilo en el sustrato tiene que ser neutralizado, posiblemente mediante la formación de un puente salino con un aminoácido cargado positivamente de la cadena lateral en el sitio activo de la proteína. La lisina puede ser éste aminoácido.
- 2) Una base cataliza la abstracción del protón en el C5 del ácido urónico con la correspondiente formación de un anión intermedio estabilizado por resonancia. El ácido aspártico, glutámico, histidina, lisina y cisteína, se han sugerido para este papel, en donde un residuo puede ser necesario como el extractor de protones y otro como el donante de protones, aunque el protón se puede derivar a partir del disolvente (medio ambiente).
- 3) La transferencia de electrones entre el grupo carboxilo para formar un doble enlace entre C-4 y C-5, resultan en la eliminación del enlace 4-O-glicosídico.

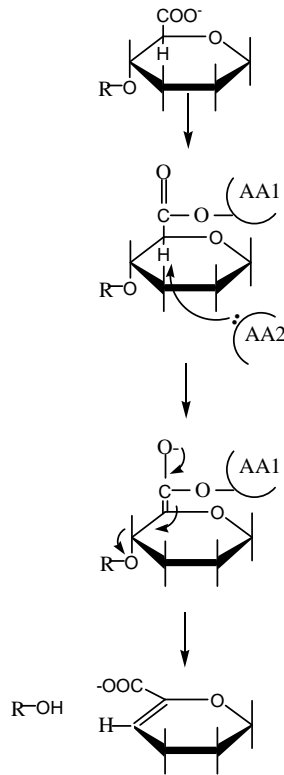
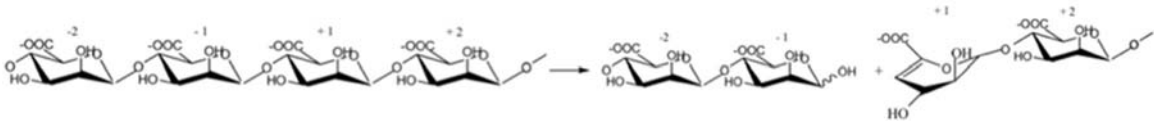


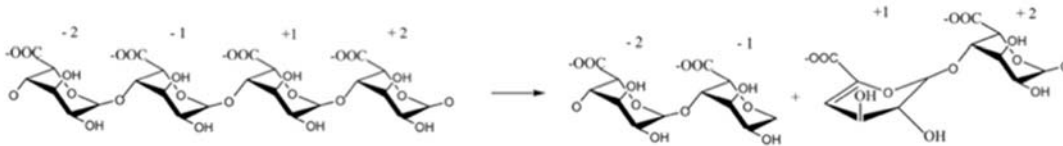
Figura 4. Mecanismo de reacción propuesto para las alginato liasas. Para simplificar el diagrama, el enlace entre el átomo de carbono y el grupo hidroxilo en la posición 2 y 3 se han omitido. AA1 y AA2 se refieren a los residuos de aminoácidos dentro del sitio activo de la enzima (Tomado de Gacesa)³².

El alginato se une a la alginasa a lo largo de una superficie o canal. Los sitios de interacción del ligando con la proteína se conocen como subsitios a los que se les asigna un número de acuerdo a la posición del azúcar con el que interactúan. Por tanto, el sitio de unión se divide en $+n$ y $-n$ subsitios ($n = 1,2,3,\dots$) y el sitio de corte por la enzima se produce entre los azúcares situados en los subsitios $+1$ y -1 . En la mayoría de las polisacárido liasas, los subsitios -2 a $+2$ son los determinantes más importantes de la especificidad por el sustrato^{26,33}. Para numerar los subsitios se sigue la nomenclatura propuesta por Davies en 1977³³ donde los azúcares se numeran como $+1$, $+2$, etc., a partir del sitio de corte y hacia el extremo reductor, mientras que se numeran -1 , -2 , etc. a partir del sitio de corte y hacia el extremo no reductor del sustrato (Figura 5)

Ácido polimanurónico (M): $[4\text{-}\beta\text{-D-M-(1-4)-}\beta\text{-D-M(1)}]_n$



Ácido poligulurónico (G): $[4\text{-}\alpha\text{-L-G-(1-4)-}\alpha\text{-L-G(1)}]_n$



Ácido polimanurónico-gulurónico (MG): $[4\text{-}\beta\text{-D-M-(1-4)-}\alpha\text{-L-G(1)}]_n$

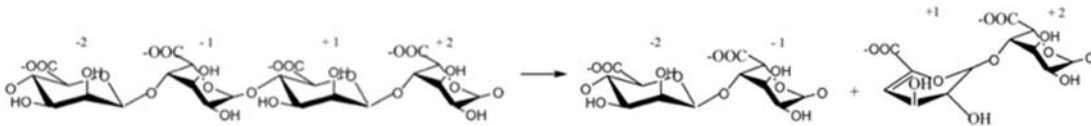
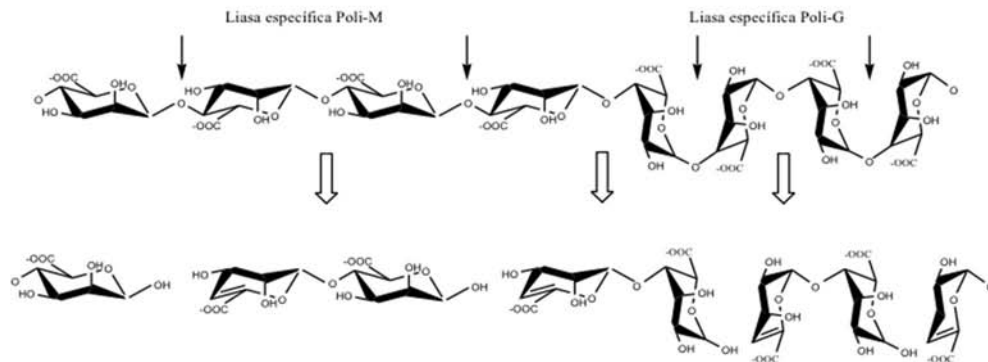


Figura 5. Sustratos de los diferentes tipos de alginasas y los productos de degradación del mismo mediante el mecanismo de eliminación β . (Tomado de Garron y Cygler)²⁶.

El alginato es degradado a oligómeros con un ácido urónico insaturado en el extremo no reductor, por la acción de la alginato liasa tipo *endo*. Esta alginasa puede presentar actividad específica poli M-, poli G-, o poli MG. Los oligómeros de alginato son posteriormente despolimerizados a monosacáridos insaturados por una alginato liasa tipo *exo*. Los monosacáridos son convertidos no enzimáticamente a ácido urónico 4-desoxi-L-eritro-5-hexoseulosa urónico (Figura 6). La mayoría de las alginato liasas son enzimas endolíticas y sólo unas cuantas poseen actividad exolítica³⁴.

A) Alginato liasa endolítica



B) Alginato liasa exolítica

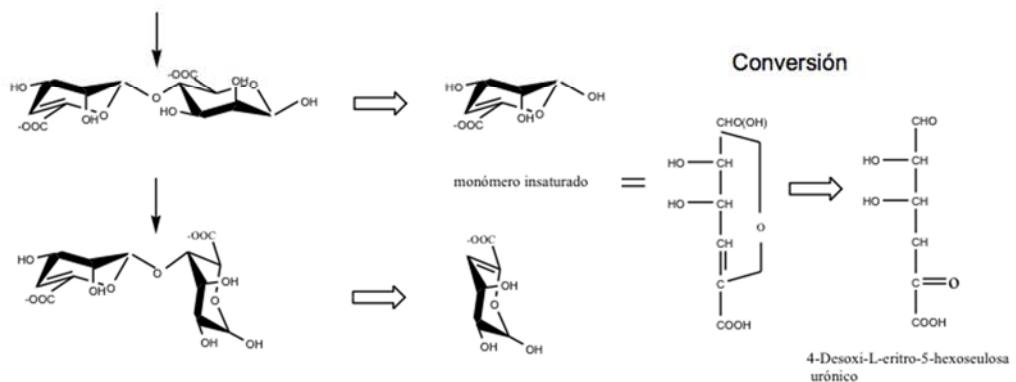


Figura 6. Degradación del alginato por un mecanismo de eliminación β . A) Alginato liasa endolítica y (B) Alginato liasa exolítica (Tomado de Kim *et al.*)³⁴.

2.6.3 Aplicaciones de las alginasas

Las alginato liasas obtenidas de fuentes marinas y bacterianas se han utilizado para analizar la estructura del alginato y así entender cómo la composición química del polisacárido influye en las propiedades físicas de este polisacárido tan importante por sus múltiples aplicaciones. Además, se han utilizado con éxito para la extracción de protoplastos, para la investigación de alimentos y la regeneración de una variedad de especies de algas y para producir bloques de poli (M), poli (G) y poli (MG) para estudios de especificidad de otras liasas^{1,35}.

Las alginasas son también importantes como biocatalizadores para la preparación de oligosacáridos funcionales que pueden estimular el crecimiento de células endoteliales humanas y la secreción de citoquinas citotóxicas de macrófagos humanos. Estas enzimas también pueden ser utilizadas como productos farmacéuticos para mejorar el efecto de antibióticos contra *Pseudomonas aeruginosa* en el tratamiento de la fibrosis quística y la endocarditis^{1,35-39}. Las biopelículas de exopolisacáridos es uno de los factores de virulencia más importantes para las infecciones pulmonares por bacterias patógenas. En el alginato bacterial sintetizado por *Pseudomonas aeruginosa* las posiciones del C2 y/o C3 de algunos de los residuos de ácido manurónico (M) son acetilados. Esta acetilación hace al alginato más resistente a la degradación, causando que las células de *P. aeruginosa* sean más resistentes a la fagocitosis y/o antibióticos³⁶.

Recientemente, la biomasa algal ha sido centro de atención como materia prima para la producción de biohidrógeno, bioetanol y biodiesel⁴⁰⁻⁴². Los lípidos y los hidratos de carbono de almacenamiento de las algas, se pueden utilizar para la producción de biodiesel y bioetanol, respectivamente. Las macroalgas cafées presentan varias características que las hacen una fuente de materia prima ideal para la producción de biocombustibles y compuestos químicos a partir de productos básicos renovables. Éstas poseen hasta un 40% de peso seco de alginato, no se requieren tierras de cultivo, fertilizantes o agua dulce para su cultivo. Debido a que estas macroalgas no contienen lignina, los azúcares pueden ser liberados por la simple molienda o trituración. Esta característica le da a las macroalgas una ventaja sobre la biomasa lignocelulósica, facilita el aumento de los rendimientos y evita la necesidad de pretratamiento e hidrólisis antes de la fermentación. Un estudio del Departamento de Energía estadounidense afirma que la productividad de las algas para producir etanol podría ser el doble que la de la caña de azúcar y cinco veces superior a la del maíz. Esto debido a que el 60% de la biomasa seca de las algas son carbohidratos fermentables y aproximadamente la mitad de ellos son alginato. Sin embargo, para la producción eficaz de etanol se requiere de enzimas que puedan hidrolizar el alginato, que es el polisacárido más abundante en este tipo de algas. De ahí la importancia de las alginasas para la producción de biocombustibles⁴⁰⁻⁴².

2.7 Abulón rojo, *Haliotis rufescens*

El abulón rojo, *Haliotis rufescens*, es un gasterópodo marino herbívoro que habita en aguas poco profundas (de 3 a 7 m), aunque puede localizarse entre los 17 y 20 m de profundidad (Figura 7). Se distribuye desde Punta Concepción, California, EUA, hasta Bahía Magdalena, Baja California Sur, México. Se caracteriza por tener una concha ovalada con la superficie externa convexa y rugosa, arqueada en la región posterior y aplanada en la anterior, con una serie de perforaciones u orificios alineados sobre la región correspondiente a la cavidad respiratoria, la formación de la concha tiene lugar en los estadios larvarios y su crecimiento es generalmente anual⁴³.

El cuerpo del abulón, como el de todos los moluscos, presenta tres regiones: el pie, la masa visceral y el manto. El pie en los abulones es un músculo plano de forma oval, provisto de numerosos surcos transversales que permiten la fijación del organismo al sustrato; este músculo es grueso y llega a alcanzar hasta 20 o 25 centímetros de longitud; esta parte es la de consumo humano. La masa visceral es aplanada y ocupa hasta el último rincón de la concha. El manto es membranoso y se extiende por la cara interna de esta masa, cubriendo el borde de los orificios respiratorios; el manto interviene en la formación y crecimiento de la concha. Los hábitos alimentarios de estos moluscos cambian durante su desarrollo; son larvas que en sus primeros estadios son libre-nadadoras, forman parte del plancton y se alimentan de pequeños vegetales y animales planctónicos; conforme van creciendo y se fijan al sustrato, su alimentación se modifica para componerse principalmente de diatomeas que viven sobre la roca; posteriormente consumen algas macroscópicas que están adheridas al sustrato, como las del género *Macrocystis*⁴³. Las vísceras de estos organismos son eliminadas durante el proceso de enlatado y exportación. Sin embargo, éstas contienen una gran cantidad de enzimas que pueden ser utilizadas en diferentes áreas de la investigación y de la industria.

- Reino: Animalia
- Phylum: Mollusca
- Clase: Gastropoda
- Orden:
Archaeogastropoda
- Familia: Haliotidae
- Género: Haliotis
- Especie: *H. rufescens*



Figura 7. Clasificación del molusco marino *Haliotis rufescens*.

3. ANTECEDENTES

El alginato puede ser degradado enzimáticamente por alginato liasas (endo o exo)³⁴ mediante un mecanismo de eliminación β . Éstas enzimas fueron descritas por primera vez en 1962 por Preiss y Ashwell⁴⁴. Éstas pueden clasificarse en tres categorías, PG (α -L-guluronato) liasa (EC 4.2.2.11), PM (β -D-manuronato) liasa (EC 4.2.2.3) y PM/PG que son las que pueden degradar ambos tipos de alginatos^{26,34,45}, sin embargo, la mayoría son PM liasas. Estas enzimas se han clasificado también como endo y exo liasas con base en la posición del sitio de corte, predominando las endo liasas. Estas enzimas fueron detectadas por primera vez en bacterias⁴⁴, posteriormente se detectaron en algas, moluscos marinos y hongos^{1,45}. También se han asociado con bacteriófagos y virus. Estas enzimas se han encontrado tanto en organismos que sintetizan alginato como en organismos que no lo sintetizan. En los primeros, las alginasas son importantes en la biosíntesis y degradación de este polisacárido mientras que en los que no sintetizan alginato juegan un papel muy importante en la asimilación del mismo como fuente de carbono³⁴.

En 1999, se describió la primera estructura cristalográfica de una alginasa proveniente de *Sphingomonas sp.*⁴⁶ Esta bacteria, produce tres tipos de alginasas intracelulares, A1-I, II y III. La alginasa A1-II degrada preferentemente los alginatos no acetilados producidos por algas cafés, mientras que la alginasa A1-III degrada efectivamente el alginato acetilado producido por bacterias. A partir de entonces se han obtenido las estructuras de alginasas de *Alteromonas*⁴⁷, *Saccharophagus degradans*⁴⁸, *Paramecium bursaria*, *Chlorella virus*⁴⁹, *Agrobacterium fabrum*⁵⁰, *Zobellia galactanivorans*⁵¹, *Bacteroides ovatus*, *Corynebacterium*⁵² y *Pseudomonas aeruginosa*⁵³.

A la fecha, las alginasas se han clasificado en 7 de las 23 familias de polisacárido liasas (PL) en PL5, PL6, PL7, PL14, PL15, PL17 y PL18^{26,28,29,34}, así como también se han clasificado en 4 de los 6 tipos de plegamientos que éstas presentan (Tabla 1 y Figura 8).

Tabla 1. Familias de polisacárido liasas (PL) en las que se clasifican las alginasas reportadas a la fecha (EC 4.2.2.3) y el plegamiento que presentan.

Familia de polisacárido liasa (PL)	Plegamiento	Ejemplos en el PDB
5	(α/α) ₄ Toroide incompleto	1HV6, 1QAZ, 3EVH, 3EVL, 3EW4, 4E1Y, 4E23, 4E25, 4F10, 4F13
6	Hélice β (14 giros)	1DBG, 1DBO, 1OFL, 1OFM
7	Remolino β (β -Jelly roll)	1UAI, 1VAV, 2CWS, 2Z42, 2ZA9, 2ZAA, 2ZAB, 2ZAC, 4BE3, 3ZPY
14	Remolino β (β -Jelly roll)	3A0N, 3GNE, 3IM0
15	(α/α) _{5,6} Toroide incompleto + sandwich β antiparalelo	3A0O, 3AFL
17	No determinado	4NEI, 4OJZ, 4OK2, 4OK4
18	Remolino β (β -Jelly roll)	1J1T

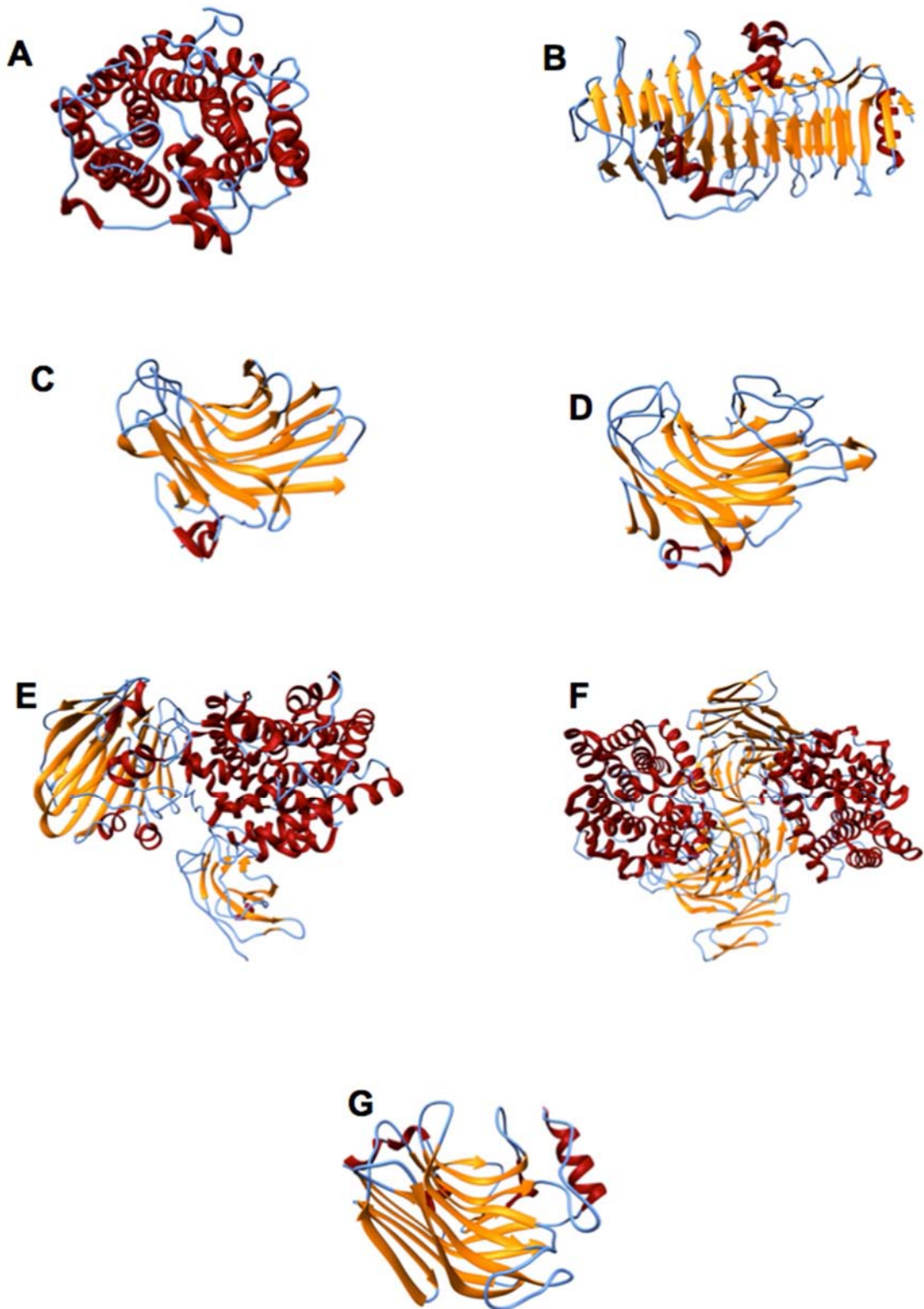


Figura 8. Familias de polisacárido liasas en las que se han clasificado a las alginas. Se presenta una algina representativa de cada familia A) PL5, B) PL6, C) PL7, D) PL14, E) PL15, F) PL17 y G) PL18 (Tomado de Garron y Cygler)²⁶.

3.1 Topología del sitio activo y mecanismo catalítico.

La reacción de eliminación β da lugar al rompimiento del enlace glicosídico adyacente a un grupo carboxilato para formar un nuevo extremo reductor y un azúcar insaturado en el extremo no reductor. Este proceso ocurre en tres pasos: 1) neutralización del grupo carboxilo C5 que disminuye el pKa del protón H5 lo que incrementa su susceptibilidad de abstracción (2) abstracción de protones que conduce a un intermediario enolato y (3) eliminación del enlace glicosídico con la transferencia de electrones del grupo carboxilato para formar un doble enlace entre C-4 y C-5. La reacción de β -eliminación requiere la participación de una base de Brønsted para aceptar el protón H-5 y un ácido de Brønsted para donar el protón al grupo saliente, recreando un nuevo extremo reductor²⁶. Las estructuras obtenidas por cristalografía de proteínas de las diferentes familias de polisacárido liasas, solas y en presencia de su sustrato, aunadas a estudios de mutagénesis han permitido estudiar su mecanismo de reacción a un nivel molecular.

Los mecanismos catalíticos presentes en las alginasas se dividen en dos categorías generales basadas en la naturaleza del grupo que neutraliza el carboxilo C-5 y los residuos que juegan el papel de base y ácido de Brønsted. La primera categoría se refiere a que la neutralización del grupo ácido sea asistida por un metal (generalmente calcio) con residuos de Lys o Arg como una base de Brønsted y una molécula de agua como un ácido de Brønsted. En la segunda categoría se incluye a aquellos mecanismos en los que la neutralización del grupo ácido la realizan la Asn/Gln o un Asp/Glu protonado con Tyr o His como una base de Brønsted y la Tyr como un ácido de Brønsted. A la fecha se sabe que el mecanismo enzimático es conservado en cada familia de PL (con algunas variaciones pequeñas producto de la evolución). Dicha conservación de características mecanicistas apoya la hipótesis de que existe un ancestro común entre las enzimas de la misma clase. Además, diferentes clases de plegamiento comparten el mismo mecanismo catalítico con similitudes sorprendentes en sus sitios activos, lo que indica una evolución convergente en que varios plegamientos diferentes adoptan la misma solución molecular para el problema del rompimiento de los enlaces en polisacáridos. En el caso de las alginasas se observan los dos tipos de mecanismos dependiendo de la

familia de PL a la que pertenecen y a la clase de plegamiento que presentan²⁶ (Tabla 2).

Tabla 2. Mecanismo catalítico asociado a cada familia de PL y a cada plegamiento en las alginasas.

Clase de plegamiento	Mecanismo	Familia de polisacárido liasa (PL)
β-Jelly roll	Tyr/His, Gln	PL7, PL18
	N.D.	PL14
β-Helix	Ca ²⁺	PL6
(α/α) ₄ Toroid	Tyr/His, Asn	PL5
(α/α) _{5,6} Toroid	Tyr/His, Arg	PL15
N.D. (AlyII)	N.D.	PL17

3.2 Alginasas en gasterópodos marinos

La primer poli manuronato liasa se identificó en 1968 por Nisizawa, Fujibayashi y Kashiwabara, en el molusco *Dolabella*⁵⁴. A la fecha se han aislado alginasas del abulón *Haliotis rufescens*, *Haliotis corrugate*⁵⁵, *Haliotis tuberculata*^{56,57}, *Haliotis discus hanna*^{58,59}, *Haliotis iris*⁶⁰, *Turbo cornutus*⁶¹, *Littorina sp.*⁶² *Omphalius rusticus* y *Littorina brevicula*⁶⁰, de la liebre marina *Dolabella auricular*⁶³, *Aplysia depilans*, *Aplysia californica*, *Aplysia juliana* y *Aplysia kuroda*^{56,64,65}. Estas enzimas son endolíticas y reconocen al manuronato (poly(M) liasa (EC 4.2.2.3) generando como productos di y trisacáridos insaturados. De manera excepcional, una enzima que actúa exolíticamente se aisló del abulón *H. discus hanna*⁶⁶. Esta enzima degrada no sólo al alginato, sino también trisacáridos insaturados que son generados por la actividad de la alginasa endolítica también encontrada en éste molusco.

En nuestro laboratorio, en estudios previos se ha observado que las alginasas del molusco marino *H. rufescens* presentan una actividad cerca de 30 veces mayor que las reportadas para alginasas de otras fuentes, además, no sólo resisten

temperaturas arriba de 90 °C sino que al calentarse su actividad se ve incrementada alrededor de 10 veces más. En adición a lo anterior, estas alginasas resisten una alta concentración de disolventes orgánicos, agentes desnaturalizantes y amplios intervalos de pH sin modificar su actividad. A la fecha en nuestro laboratorio se han diseñado técnicas novedosas que permiten purificar este tipo de proteínas en poco tiempo sin perder la actividad⁶⁷.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Purificar y caracterizar bioquímicamente a dos alginasas presentes en el hepatopáncreas del abulón rojo, *Haliotis rufescens*.

Objetivos específicos

- Establecer un protocolo para la purificación de las alginasas presentes en el hepatopáncreas de *H. rufescens*.

Determinar para cada alginasa purificada:

- La masa la masa molecular, las condiciones óptimas de pH y temperatura para su actividad y su estabilidad térmica.
- El efecto de aditivos sobre su solubilidad y actividad.
- La estructura secundaria por dicroísmo circular.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

Se trabajó con organismos de la especie *Haliotis rufescens*, comúnmente llamado abulón rojo, provenientes de la Bahía de Todos Santos, Ensenada Baja California, México. Los organismos se transportaron vivos al Instituto de Química donde se congelaron a -45 °C hasta su posterior utilización.

5.2 Extracción de las alginasas

Para evitar la desnaturalización de las proteínas, la purificación se realizó a 4 °C. Se homogenizó el hepatopáncreas de *Haliotis rufescens*, en presencia de un amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8. Una vez homogenizado se centrifugó a 13,000 x g durante 30 min y se retiró el precipitado. El sobrenadante se conservó a 4 °C hasta su utilización.

5.3 Purificación de las alginasas de *Haliotis rufescens*

5.3.1 Preparación de las perlas insolubles de alginato

En nuestro laboratorio en estudios previos se desarrolló una técnica para la purificación de alginasas de moluscos marinos. Ésta consiste en utilizar la propiedad que tiene el alginato de sodio de gelificar en presencia de cationes divalentes, en este caso, de calcio. Durante dichos estudios se analizó por microscopia de fuerza atómica la consistencia del gel que al formarse por goteo en una solución de CaCl₂, adquiere una forma de “perlas”; así como las concentraciones tanto de calcio como de alginato necesarias para obtener el polímero apropiado para purificar a éstas enzimas. Dichas “perlas” deben poseer cierta porosidad que permita que las alginasas difundan al interior y queden “atrapadas” en ellas⁶⁷.

Para la purificación de las alginasas de *H. rufescens* se consideró que en su hepatopáncreas pueden estar presentes enzimas con especificidad por el ácido manurónico (manuronidasa) o por el ácido gulurónico (guluronidasa), por lo que se prepararon perlas con diferente tipo de alginato según el siguiente procedimiento:

Se disolvió el alginato de sodio de alta viscosidad al 2% p/v (rico en bloques de guluronato) en un amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8 y se aplicó por goteo en una solución de CaCl_2 100 mM en Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 de tal forma que se formaron “perlas” de aproximadamente 5 mm de diámetro (Figura 9). Se realizó el mismo procedimiento con alginato de sodio de viscosidad intermedia al 3% p/v (rico en bloques de manuronato), pero en esta ocasión se utilizó una solución de CaCl_2 150 mM para favorecer una mejor consistencia de las perlas formadas, ya que cuando predomina el manuronato, la fuerza del gel es menor. Estas se lavaron con amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8 para eliminar el exceso de calcio.

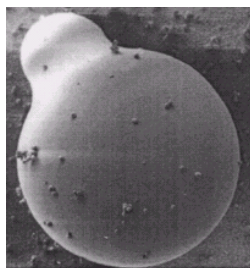


Figura 9. Perla formada al interaccionar el alginato de sodio con CaCl_2 (Tomado de González-Gatica)⁶⁷.

5.3.2 Purificación

El extracto del hepatopáncreas del molusco se incubó a 4 °C en presencia de las perlas de alginato durante 20 min. Estas se lavaron con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8 para eliminar las proteínas que no se unieron a ellas. Posteriormente, se realizaron lavados con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8 con distintas concentraciones de NaCl (0.2 M, 0.5 M, 1.0 M y 1.5 M), esto con el fin de eluir las proteínas unidas al polímero de alginato. Las perlas de alginato utilizadas en la purificación se conservaron en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8 con NaCl 0.2 M.

5.4 Cuantificación de la proteína purificada

Se utilizó el método de Smith y Krohn⁶⁸, el cual emplea el reactivo BCA (Protein Assay Reagent de PIERCE), que es muy sensible en la determinación espectrofotométrica de la concentración de proteína en soluciones acuosas. Este sistema de reactivos combina la reacción de proteínas con Cu^{+2} en un medio alcalino (produciendo Cu^{+1}), con un reactivo altamente selectivo y sensible de detección para Cu^{+1} , llamado ácido bicinconínico. El color púrpura del producto de la reacción es formado por la interacción de dos moléculas de BCA con un ion cuproso (Cu^{+1}), éste es soluble en agua y exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm. La cantidad de proteína contenida en la muestra se determinó interpolando el valor de absorbancia en una curva de calibración elaborada con albúmina de suero de bovino a diferentes concentraciones.

5.4.1 Curva de calibración

Para la construcción de la curva de calibración (Figura 10), se siguió el protocolo descrito por el proveedor del kit de cuantificación (PIERCE):

- 1) Se colocaron 50 μL de cada estándar en tubos apropiadamente marcados, utilizando 50 μL del diluyente como blanco.
- 2) Se adicionó a cada tubo 1 mL del reactivo de trabajo (Se prepara mezclando 50 partes del reactivo A del kit de BCA con una parte del reactivo B). Se mezcló e incubó por 30 min a 60°C. Una vez frías las muestras, se leyó la absorbancia de las mismas a 562 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Este método permite detectar concentraciones de 5 a 250 $\mu\text{g/mL}$ de proteína.

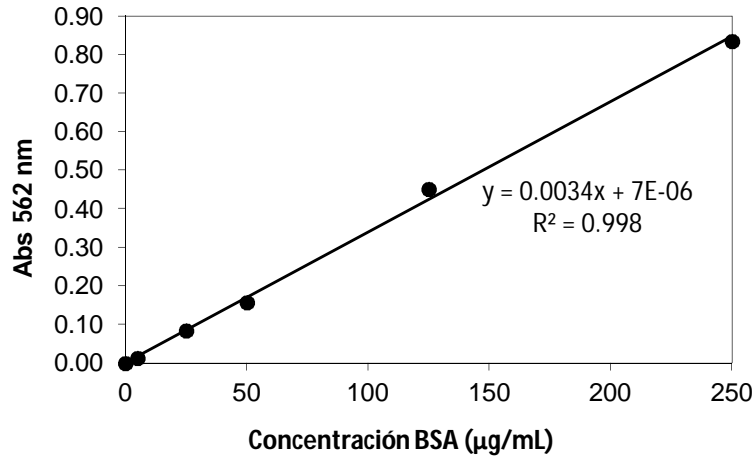


Figura 10. Curva de calibración utilizando el método de BCA a 60 °C y albúmina de suero de bovino como estándar.

5.5 Determinación de la actividad alginolítica

5.5.1. Fundamento de la técnica

La determinación de la actividad de las alginato liasas se llevó a cabo por la técnica del ácido dinitrosalicílico (DNS). Esta técnica de óxido-reducción se utiliza para determinar los azúcares reductores formados por la acción de las alginasas y se basa en la siguiente reacción química:

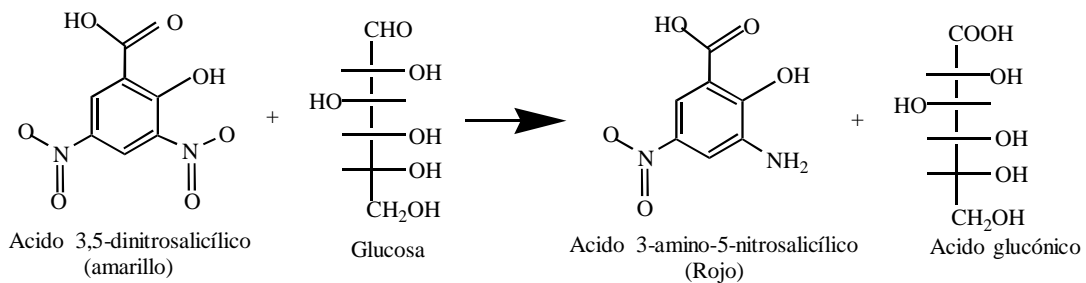


Figura 11. Reacción del ácido 3,5-dinitrosalicílico con un azúcar reductor.

El ácido 3,5-dinitrosalicílico (color amarillo) es reducido a ácido 3-amino-5-dinitrosalicílico (color rojo) por la presencia de azúcares reductores en un medio alcalino (Figura 11), mientras que los grupos aldehído de los carbohidratos son oxidados a carboxilos⁶⁹. El fundamento de esta técnica consiste en la oxidación de la glucosa, sin embargo, la glucosa en solución acuosa se encuentra en su forma cíclica que es muy estable y por lo tanto, no reacciona. Por esta razón, es necesario calentar la muestra para que el anillo se abra dejando expuesto el aldehído dando lugar a una reacción de oxidación⁷⁰.

La intensidad en el color ámbar es proporcional al contenido de azúcares reductores en la muestra. Este color se puede medir en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm. Para que ocurra la reacción es necesario proporcionar un medio alcalino; esto es posible gracias a la adición de NaOH el cual es una base fuerte. En solución acuosa se ioniza liberando Na^+ y OH^- al medio, el cual se alcaliniza, permitiendo la oxidación de la glucosa; en esta oxidación, el carbono del grupo aldehído se convierte en un ácido carboxílico por la pérdida de hidrógenos y la ganancia de oxígeno, obteniéndose de esta forma el ácido glucónico; por otro lado, el ácido 3,5 dinitrosalicílico es reducido gracias a la acción del tartrato de sodio y potasio y de la oxidación de la glucosa. El ácido pierde una de sus configuraciones 3 ó 5, principalmente la 3 por ser más reactiva, quedando ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, el cual produce una coloración de amarillo a rojo-café. La coloración es proporcional a la concentración de glucosa⁷⁰.

5.5.2 Preparación del reactivo DNS

Se disolvieron 3.53 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico y 6.6 g de NaOH en 472 mL de agua destilada. Posteriormente se adicionaron 102 g de tartrato de sodio y potasio, 2.3 mL de fenol (fundido en baño María) y 2.76 g de metabisulfito de sodio. Estos reactivos se mezclaron y almacenaron a 4°C en un recipiente que impidiera el paso de la luz.

5.5.3 Determinación de la actividad de las alginato liasas de *H. rufescens*

Para determinar la actividad en las diferentes muestras se realizó el siguiente procedimiento:

Para cada muestra analizada se incluyeron dos blancos, uno de sustrato y uno de enzima, éste con el fin de considerar los azúcares reductores presentes en la muestra y en el sustrato. Todos los blancos y las muestras se prepararon por triplicado. El sustrato consistió en una solución de alginato de sodio 0.5 % p/v en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8.

Los tubos de reacción se prepararon de la siguiente manera:

1. Blanco de muestra: 100 μ L de muestra y 400 μ L de solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM, pH 8.
2. Blanco de sustrato: 250 μ L de alginato de sodio al 0.5% y 250 μ L de solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM pH 8.
3. Muestras: 250 μ L de alginato de sodio al 0.5 %, 150 μ L del amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8 y 100 μ L de enzima. El volumen total de reacción fue de 500 μ L.

Todos los tubos se incubaron a 45°C por 30 minutos. Posteriormente se adicionó a cada tubo 500 μ L del reactivo de DNS y se llevó a ebullición por 10 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 550 nm. Este valor de absorbancia se interpoló en una curva patrón elaborada con ácido glucurónico (Figura 12). Una unidad de actividad (U) se define como los micromoles (μ M) de ácido D-Glucurónico hidrolizados en 30 min a 45 °C. La actividad específica se define como la actividad entre la concentración de proteína en la muestra (U/mg).

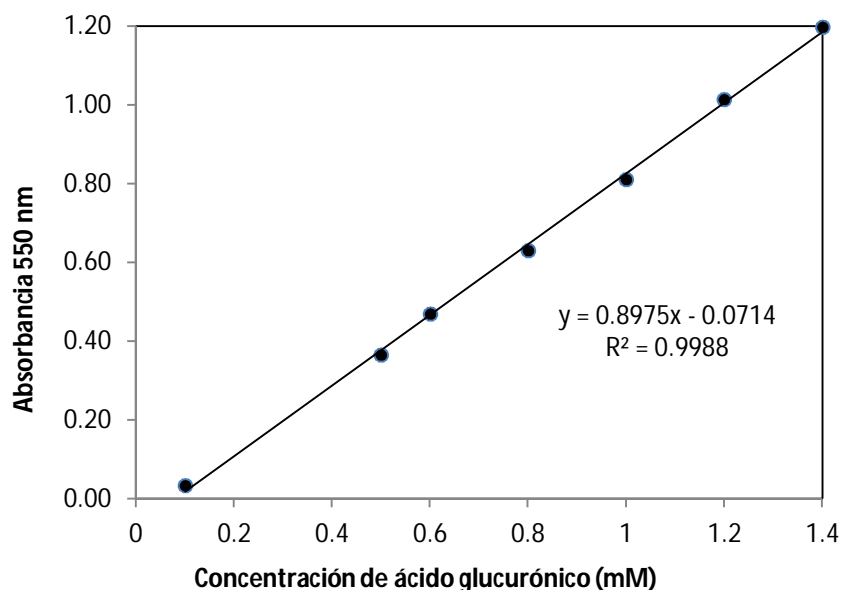


Figura 12. Curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores, utilizando ácido glucurónico como estándar

5.6 Determinación del peso molecular

5.6.1 Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis es un método para determinar la masa molecular y la pureza de una proteína⁷¹. Se utilizó la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sodico (SDS-PAGE) con una concentración de acrilamida al 10 % y utilizando β -mercaptoetanol como agente reductor, se utilizó para determinar la pureza y masa molecular de las alginasas. Se emplearon patrones con masas moleculares conocidas.

5.6.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF

Para determinar la masa molecular de las proteínas y verificar su pureza, se utilizó la técnica de espectrometría de masas mediante ionización-desorción por láser asistida por una matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) en un

equipo Microflex Bruker Daltonics. En esta técnica, la muestra de proteína está embebida en una matriz química en exceso que absorbe el calor de un haz láser usado como fuente de desorción o ionización. La luz del láser pulsado golpea la muestra sólida calentándola y vaporizándola, ionizando así los compuestos con una mínima descomposición, con lo que es posible observar el espectro que caracteriza la relación masa/carga de la muestra⁷².

La proteína con una concentración de 100 pmol/ μ L, se mezcló con una matriz de Super DHB (mezcla de ácido 2,5-dihidroxibenzoico con ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzoico en una relación 9:1) disuelta en una solución de 30 % acetonitrilo, 70 % agua y 0.1 % ácido trifluoroacético en una relación de 1:5. Se colocó 1 μ L de esta solución en el portamuestras y se dejó secar hasta que cristalizó. Posteriormente se analizó mediante la incidencia de un láser de nitrógeno de 20 Hz. Los espectros se registraron en modo lineal positivo.

5.7 Determinación de los valores óptimos de pH y temperatura para la actividad de las alginasas

Para determinar el pH óptimo para la actividad de las alginasas purificadas, se construyó una curva de actividad a diferentes valores de pH (3.0-10.0 con intervalos de una unidad), utilizando los amortiguadores fosfatos-HCl 50 mM (pH 3.0), acetatos 50 mM (pH 4.0, 5.0 y 6.0), Tris HCl 50 mM (pH 7.0 y 8.0) y fosfatos-NaOH 50 mM (pH 9.0 y 10.0). Después se realizó una curva de actividad específica *versus* temperatura a los valores de pH óptimos.

5.8 Efecto de diferentes aditivos sobre la actividad de las dos alginasas purificadas

Se evaluó el efecto de diferentes aditivos sobre la actividad de las alginasas puras, para esto, cada alginasa pura se incubó por 24 h a 4°C con el aditivo correspondiente. Posteriormente la solución se centrifugó a 11,000 rpm por 6 min y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm y la actividad mediante la cuantificación de los azúcares reductores liberados como se mencionó en 5.5.3. Para

este ensayo se utilizó el amortiguador al pH y a la temperatura óptima. Los aditivos y las concentraciones utilizados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Aditivos utilizados para evaluar su efecto en la actividad de las alginasas purificadas.

Aditivos	Concentración*	Aditivos	Concentración*
Blanco		Sorbitol	5 mM
BaCl ₂	5 mM	manitol	5 mM
CaCl ₂	5 mM	PEG	5 %
MnCl ₂	5 mM	PEG-Citrato	5 %
MgCl ₂	5 mM	Tween 20	0.06%
ZnSO ₄	5 mM	Glicerol	5 %
CoCl ₂	5 mM	NiCl ₂	5 mM
AlCl ₃	5 Mm	Li ₂ SO ₄	5 mM
Etanol	5 %	HgCl ₂	5 mM
Isopropanol	5 %	EDTA	5 mM
CuSO ₄	5 mM		

*Concentración final de cada aditivo en la mezcla de reacción.

5.9 Determinación de la estructura secundaria

La aplicación de la espectroscopía de dicroísmo circular (DC), en la determinación de la estructura secundaria de proteínas, se basa en la quiralidad de los aminoácidos que la conforman. La teoría de dicroísmo circular fue desarrollada por Neumann y Sratzke en 1990⁷³. Esta técnica utiliza las propiedades de la luz polarizada formada por dos componentes polarizados circulares, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. La interacción de la radiación con la muestra, induce un desfaseamiento y un cambio de magnitud en ambos componentes circularmente polarizados. Estos fenómenos provocan una rotación del plano de

polarización en un ángulo α y la distorsión de este plano genera una elipse. La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados varían de acuerdo con la longitud de onda incidente, obteniendo un espectro de la rotación o elipticidad contra la longitud de onda (λ)⁷⁴

Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm), de la radiación electromagnética. En la región del ultravioleta cercano, los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptofano, tirosina y fenilalanina. La asimetría en estos grupos químicos, se debe exclusivamente a su entorno ya que los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la macromolécula. Los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína y las señales obtenidas son sensibles a los cambios en la misma. Por otro lado, los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano, se deben principalmente a los enlaces peptídicos que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presente, es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices alfa, hojas beta, giros y lazos. (Figura 13)⁷⁴

El contenido de estructura secundaria de las alginasas puras se determinó por sus espectros de dicroísmo circular. Dichos espectros se obtuvieron a 20 °C en un espectropolarímetro JASCO J-700. Los experimentos se realizaron en una celda de 1 mm de paso de luz para la región del ultravioleta (UV) lejano (185-260 nm) y las lecturas fueron registradas cada 1 nm. Las muestras se dializaron contra un amortiguador de acetatos 10 mM pH 6.0, como blanco se realizó una corrida con dicho amortiguador en las mismas condiciones. Los resultados se expresan como elipticidad molar por residuo medio $[\theta]$.

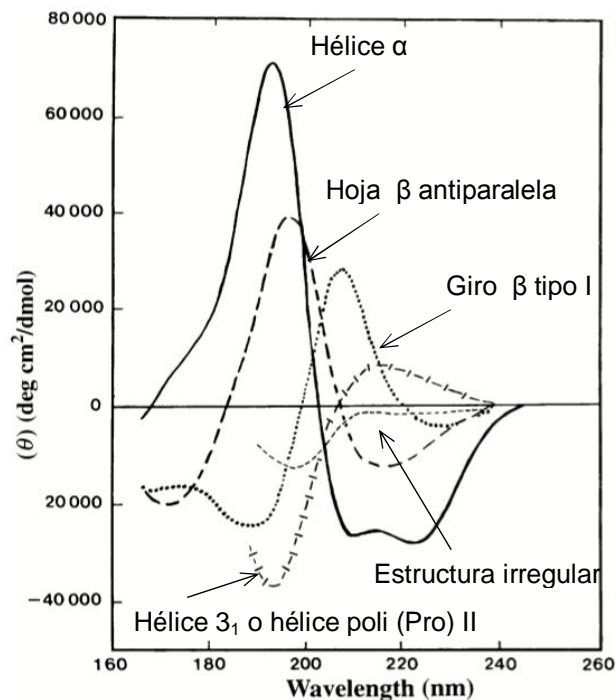


Figura 13. Espectros característicos asociados a cada una de las estructuras secundarias (Tomado de Kelly y Price)⁷⁴.

5.10 Cuantificación de carbohidratos totales

La determinación de carbohidratos totales se realizó mediante el método espectrofotométrico “fenol-sulfúrico” descrito por Dubois *et al.* (1956)⁷⁵. La curva de calibración (Figura 14) se realizó utilizando glucosa como estándar. La concentración de azúcares totales se expresa como μg glucosa/mL. En este ensayo se mezclaron 500 μL de la enzima con 15 μL de fenol al 5%, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se añadieron 1.5 mL de H_2SO_4 concentrado. Después de incubar por 20 min a 27 °C se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado. Como blanco para las lecturas se utilizó agua destilada aplicándole el mismo tratamiento.

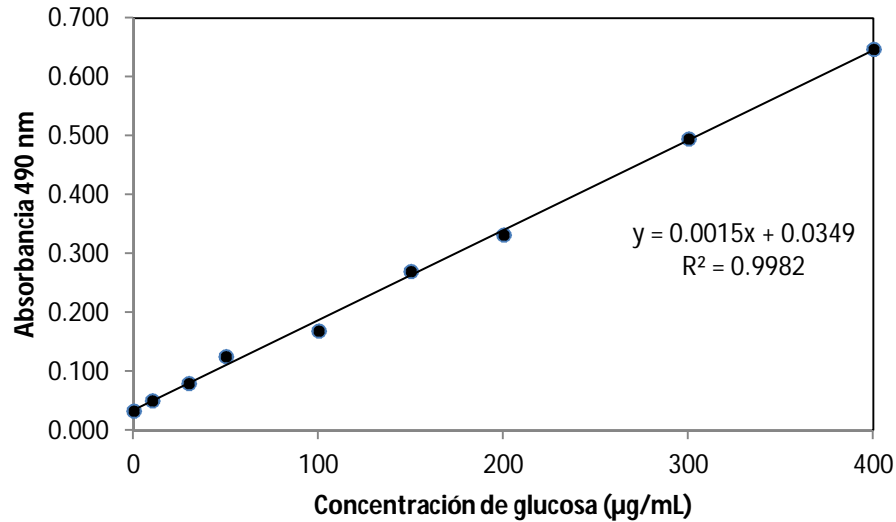


Figura 14. Curva de calibración utilizando glucosa como estándar.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A la fecha se han estudiado alginasas de diversas fuentes, principalmente de origen bacteriano, sin embargo, existen pocos estudios de alginasas de invertebrados marinos, aún cuando se sabe que sus actividades son muy altas. Una razón por la cual no se han caracterizado enzimas de dicha fuente es debido a que son muy inestables cuando se purifican por los métodos convencionales, agregándose fuertemente, perdiendo su actividad y precipitando. Por tal motivo, se buscó una forma alternativa de purificación utilizando su sustrato en forma polimérica como una matriz de afinidad. Un aspecto importante a considerar es el hecho de que la mayoría de las enzimas que degradan polisacáridos no pueden hacerlo de manera individual debido a la complejidad de los mismos. Es por esto que trabajan en forma de sistemas multienzimáticos formados por varias enzimas con diferente especificidad que en conjunto logran la degradación total del polímero⁷⁶⁻⁷⁹. Por lo anterior, pensamos que era muy probable que en el hepatopáncreas de *H. rufescens* se encontraran las dos alginasas necesarias para la hidrólisis total del alginato, esto es, una manuronidasa (degrada bloques de ácido manurónico) y una guluronidasa

(degrada bloques de ácido gulurónico). Partiendo de esta premisa, se prepararon dos tipos diferentes de “perlas” de alginato para purificar a ambas proteínas (ver métodos sección 5.3.1).

6.1 Purificación de las alginasas de *H. rufescens*

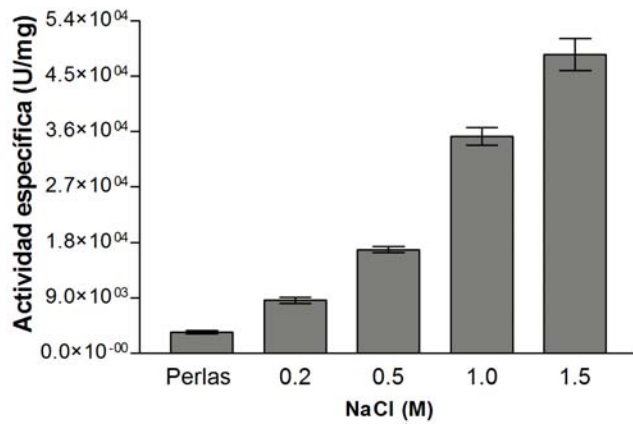
En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, ya se había detectado la presencia de alginasas con actividades específicas muy altas en extractos del hepatopáncreas del abulón rojo *H. rufescens*⁶⁷. Por lo anterior, se procedió a la purificación de las mismas siguiendo los protocolos descritos en la sección 5. Durante dicha purificación se observó que la actividad específica más alta se encontraba en la fracción eluída con el amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8 con 1.5 M de NaCl, sin embargo, observamos que una gran cantidad de proteína quedaba todavía unida a las perlas de alginato. Dicha proteína correspondía a la alginasa con una mayor afinidad por el azúcar que predominaba en la perla, ya sea ácido manurónico o gulurónico. Con el fin de extraer a la proteína de las perlas, se realizaron diferentes procedimientos como el aumento en fuerza iónica, cambio de pH, adición de agentes quelantes para que el polímero se solubilizara, etc. Sin embargo, en todos los casos perdíamos por completo la actividad de la proteína. Por lo anterior y dado que las perlas fueron elaboradas con su sustrato, decidimos ponerlas en un amortiguador Tris-HCl 50mM pH 8 con 0.2 M NaCl para favorecer su actividad y de esta manera fuera la propia enzima quien degradara la perla y quedara en forma soluble. Este procedimiento funcionó y logramos obtener una gran cantidad de proteína soluble y pura, sin embargo la actividad específica era muy baja (Figura 15 A y B). Fue interesante notar que durante el desarrollo de la prueba de actividad observamos que el blanco de proteína que se utiliza para eliminar el error que pudiera dar la presencia de azúcares en solución, mostraba una absorbancia muy alta a 550 nm, lo que indicaba la presencia de una alta concentración de azúcares reductores libres. Esto era lógico dado que habíamos dejado que las alginasas degradaran las perlas con la consecuente liberación de azúcares como producto, lo que provocó la inhibición de la proteína. Un caso muy común de regulación de la actividad de una enzima es la inhibición por el producto final, también llamada retro

inhibición o control feedback. En ella, el producto final de una reacción inhibe a la enzima la que recupera su actividad una vez que el producto es eliminado de la solución¹¹⁷. Para eliminar dichos azúcares, la proteína se dializó exhaustivamente contra el amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8, utilizando membranas de diálisis con corte de 3500 Da y se midió nuevamente la actividad enzimática observando que ésta se incrementaba notablemente. Este resultado corroboró dos aspectos importantes: que existía inhibición de la actividad de las enzimas por el producto y que dicha inhibición era reversible. Cabe señalar que fue necesario dializar por 3 días a las alginasas para poder eliminar por completo los azúcares producto de su actividad, esto puede deberse a que teníamos oligosacáridos de diferente tamaño y que sólo hasta que se alcanzaba un tamaño menor al tamaño de corte de la membrana podían ser eliminados. En la Figura 16 se muestra cómo se recupera la actividad durante los días en que se sometió a diálisis la solución proteica obteniendo la recuperación total de la actividad al tercer día.

Posteriormente, observamos que realizando una cromatografía de exclusión molecular en un sistema HPLC podíamos eliminar los azúcares, lo que permitía tener a las alginasas puras, activas y estables en un día.

De las perlas ricas en ácido manurónico se obtuvo a la manuronidasa pura, mientras que de las ricas en ácido gulurónico se obtuvo a la guluronidasa, ambas mostraron similar comportamiento de purificación (Figuras 15 A y B). La fracción con mayor actividad para ambas enzimas, fue aquella eluída con 1.5 M de NaCl, sin embargo ésta todavía mostraba impurezas a diferencia de la que se quedó unida a las perlas, misma que estaba pura como se demostró por electroforesis y espectrometría de masas. Es importante notar que la actividad de la manuronidasa es un orden de magnitud mayor que la de la guluronidasa (Figuras 17 y 18).

A)



B)

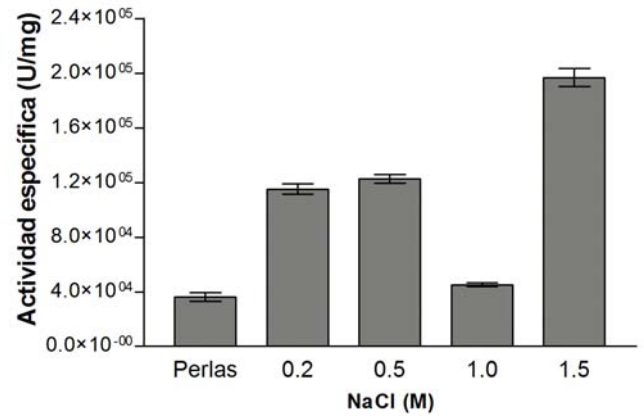


Figura 15. Purificación de las alginasas de *H. rufescens*. Se observa el perfil de elución de A) Guluronidasa y B) Manuronidasa.

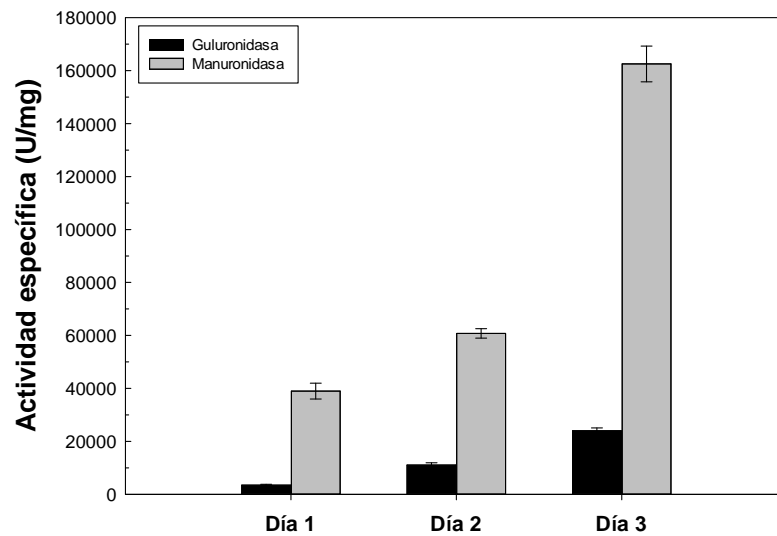


Figura 16. Recuperación de la actividad de las alginasas después de dializar las proteínas contra amortiguador Tris-HCl 0.05 M pH 8.0. Al tercer día se eliminan por completo los azúcares y se recupera la actividad de ambas enzimas.

6.2 Determinación de la masa molecular

6.2.1 Electroforesis

La masa molecular de las alginasas y la pureza de las mismas se estimó mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). En la Figura 17 se puede observar que las dos alginasas están puras. En ambos casos se observó una sola banda en el gel con masas de ~17 kDa para la manuronidasa y de ~36 kDa para la guluronidasa.

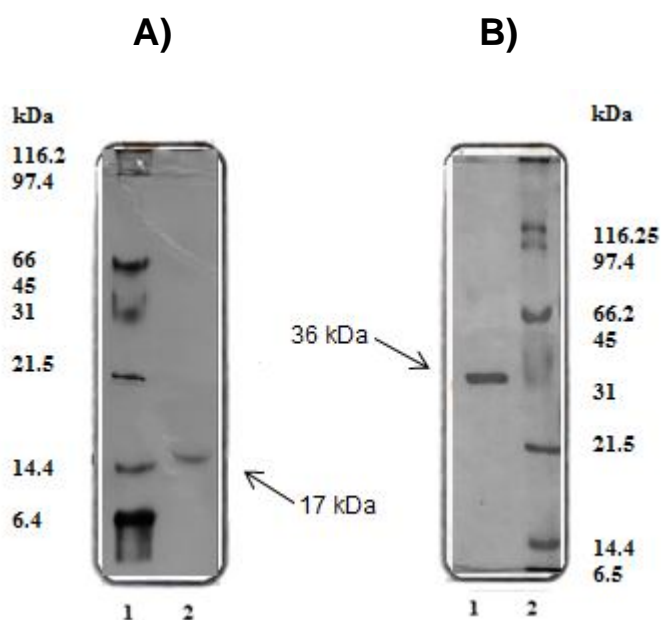


Figura 17. A) Gel SDS-PAGE al 10%. El carril 1 corresponde al marcador de masa molecular y el carril 2 a la manuronidasa purificada de *H. rufescens*. B) SDS-PAGE al 12%. El carril 1 corresponde a la guluronidasa purificada de *H. rufescens* y el carril 2 al marcador de masa molecular.

6.2.2 Espectrometría de masas

El segundo criterio de pureza que utilizamos y que además nos indicó la masa molecular precisa de las alginasas purificadas fue la espectrometría de masas, utilizando la fuente de ionización MALDI-TOF. Observamos que la masa de la Gulonidasa es de 36.3 kDa mientras que la de la Manuronidasa resultó ser de 8.5 kDa (Figura 18 A y B respectivamente). Comparando estos valores con los obtenidos con la electroforesis SDS-PAGE, donde la masa de la Manuronidasa es de ~17 kDa, observamos que se trata del dímero en dicho gel. Este tipo de comportamiento se ha observado en proteínas con fuerte tendencia a oligomerizar en las que aún en condiciones desnaturizantes no se logra romper la interacción proteína-proteína, incluso en el espectro de masas podemos observar las señales correspondientes al dímero e inclusive al trímero. Es importante mencionar que las formas oligoméricas son más activas que las monoméricas y es sólo cuando el oligómero es muy grande que se pierde la actividad y las proteínas precipitan. Éste debe ser el mecanismo por el cuál las alginasas de esta fuente presentan actividades tan altas, mayores a las reportadas para alginasas de otras fuentes ya que al oligomerizar exponen un mayor número de sitios catalíticos¹⁰⁰⁻¹⁰². Los valores de masa molecular reportados a la fecha para diferentes alginasas son: 74 kDa para la alginasa del alga *Undaria pinnatifida*^{80,81}, 34 kDa y 40 kDa para los invertebrados *H. tuberculata*⁸² y *Littorina sp.*^{83,84} respectivamente y de 28 a 100 kDa para bacterias marinas¹. Por lo anterior, la Manuronidasa de *H. rufescens*, es la alginasa más pequeña reportada a la fecha. Cabe señalar que para que se pudieran obtener los espectros de masas de ambas alginasas, se probaron diferentes matrices; sin embargo, sólo con la matriz Super-DHB se pudieron obtener los espectros adecuados. Esta matriz se recomienda cuando se analizan proteínas glicosiladas, lo que nos sugirió que las alginasas de *H. rufescens* podrían tener azúcares en su estructura. Para corroborar lo anterior se determinó el contenido de azúcares totales por el método de Dubois⁷⁵.

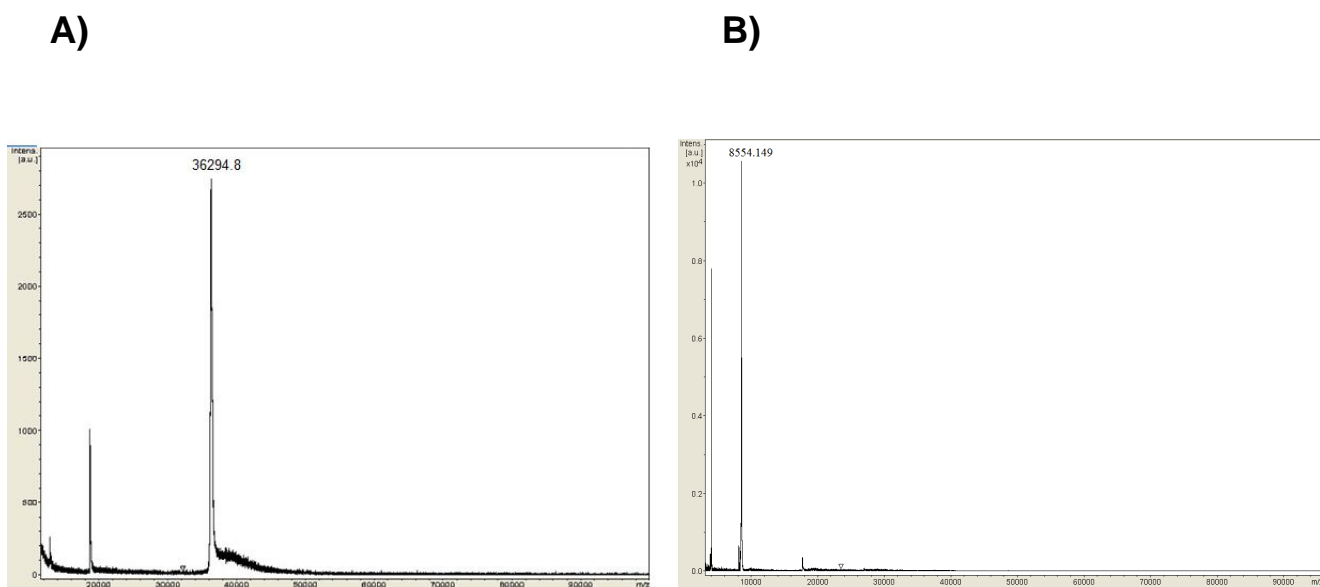


Figura 18. Espectro de masas de las alginasas de *H. rufescens*. A) Guluronidasa B) Manuronidasa. Para el análisis se utilizó Super-DHB como matriz.

6.2.3 Determinación del contenido de azúcares totales de las alginasas puras

Cuando se determinó el porcentaje de glicosilación de las alginasas utilizando el método de Dubois⁷⁵, se observó que el de la guluronidasa era del 85.7% mientras que el de la manuronidasa era de 83.4 %. Los resultados obtenidos indican que ambas proteínas se encuentran altamente glicosiladas. A la fecha no se han reportado porcentajes de glicosilación para ninguna alginasa, sin embargo, existen reportes de otras proteínas altamente glicosiladas donde incluso, como en el caso de la Flageliasialina, los porcentajes de glicosilación pueden llegar a ser tan altos como 90% (Tabla 4). Es importante notar que este método de cuantificación de azúcares depende de la concentración de proteína utilizada en el ensayo y los métodos colorimétricos de cuantificación de proteína tienen interferencia cuando la proteína está glicosilada, dando valores de concentración poco precisos. Por lo anterior, es muy probable que la cuantificación no sea muy precisa y que quizás se esté sobrestimando el contenido de azúcares en la proteína; éste contenido debe ser alto para generar dicha interferencia, pero no sabemos qué tanto. Es por esto que es

necesario determinar la secuencia de aminoácidos de la proteína para obtener el coeficiente de extinción con base en dicha secuencia y con éste determinar la concentración de proteína y así tener una estimación más precisa.

Otra forma de estimar los porcentajes de glicosilación es por espectrometría de masas. Con esta técnica, la proteína se desglicosila y se analiza su masa con y sin azúcares. Es importante señalar que en muchas proteínas glicosiladas, mientras más alto es el grado de glicosilación, es mayor su tendencia a oligomerizarse debido a que se establecen interacciones azúcar-proteína ó azúcar-azúcar entre los monómeros de proteína, induciendo la oligomerización de la misma. Este mecanismo, se ha observado en proteínas extremófilas ya que al oligomerizarse protegen zonas lábiles de la proteína haciéndolas más estables¹⁰³⁻¹⁰⁸.

Tabla 4. Porcentaje de glicosilación en diversas proteínas

Proteína	Glicosilación (%)	Referencia
Eritropoyetina	40	Kim, 2005 ⁸⁵
Glicoproteínas del VIH	> 50	Irungu, 2007 ⁸⁶
Glicoforina A	60	Ouagari, 1995 ⁸⁷
Mucina	> 50 – 90	Braga, 1993 ⁸⁸ ; Strous, 1992 ⁸⁹
Flagelasialina	80 – 90	Kasekarn, 2012 ⁹⁰

6.3 Efecto del pH sobre la actividad de las alginasas de *H. rufescens*

Al analizar cómo afectaba el pH a la actividad de las alginasas purificadas, observamos que ambas presentan actividad enzimática en un amplio intervalo de pH, mostrando su máxima actividad a un pH de 5 (Figura 19). Comparando los valores óptimos de pH reportados para diferentes alginasas con el pH óptimo de las purificadas en el presente trabajo, observamos que éste varía dependiendo de la fuente de las enzimas. Algunos de estos valores son: pH de 9.6, 8.0, 7.4-7.6 y 5.6

para la alginasas de los invertebrados *Aplysia depilans*⁶⁵, *H. tuberculata*⁵⁷, *H. corrugata*⁵⁵ y *Littorina sp*^{83,84} respectivamente. En general, los valores descritos tienden a ser más básicos en comparación con el óptimo de *H. rufescens*, excepto por la *Littorina sp*, cuyo valor es cercano a 5.0.

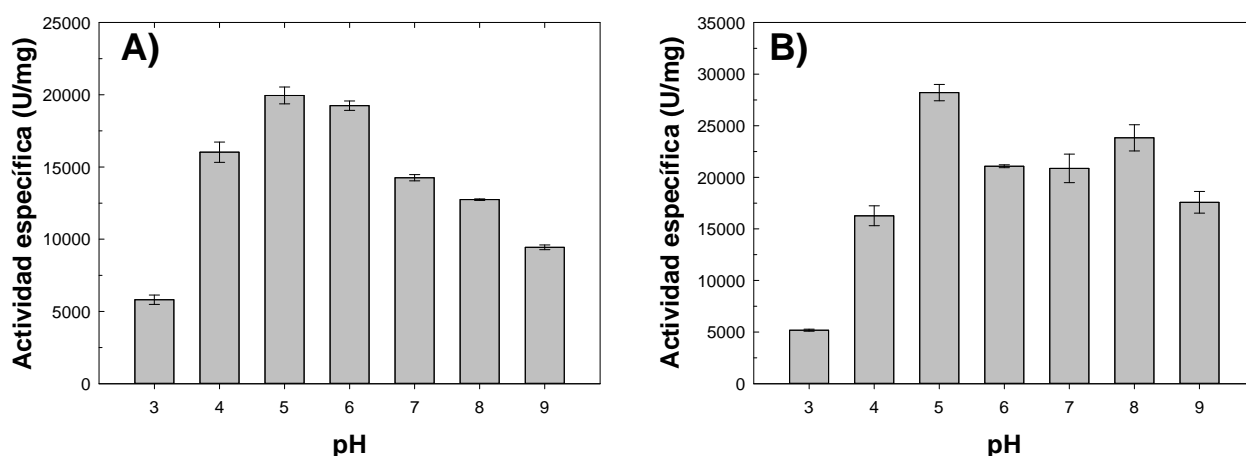


Figura 19. Efecto del pH sobre la actividad de las alginasas purificadas del hepatopáncreas de *H. rufescens*. A) Guluronidasa, B) Manuronidasa.

6.4 Efecto de la temperatura en la actividad de las alginasas de *H. rufescens*

Se observó que las dos alginasas purificadas son muy activas en todo el intervalo de temperaturas probadas, incluso a 90°C seguían siendo muy activas. Con el fin de evaluar su estabilidad, ya que podrían presentar actividades altas pero ser muy inestables a ciertas temperaturas, incubamos a las proteínas por 1 hr a cada temperatura y posteriormente se les midió la actividad a 40 y a 80°C que fueron los dos óptimos encontrados, cabe señalar que se decidió medir la actividad a 80°C, debido a que a 90°C ya había hidrólisis del sustrato por la temperatura. En el caso de la manuronidasa (Figura 20A) observamos que después de preincubar tanto a 40°C como a 80°C la actividad de la proteína se incrementó notablemente. Es importante

notar que el mayor incremento en la actividad se observó cuando se preincubó a la proteína a 80 °C.

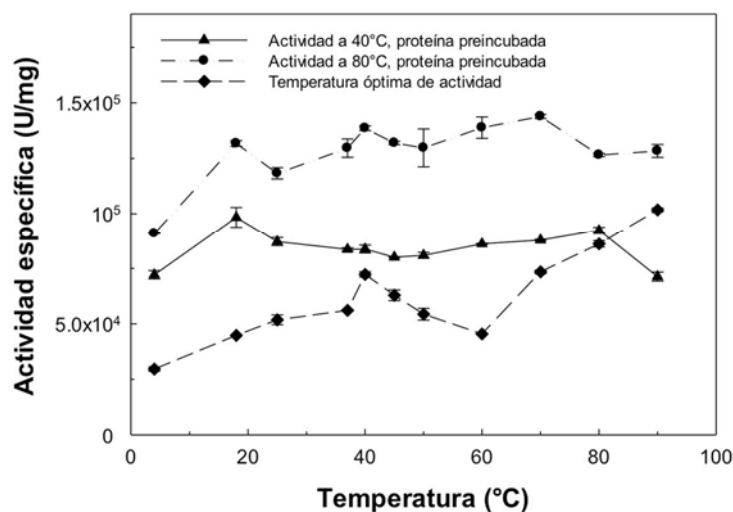
Si comparamos un solo punto en el gráfico de la actividad óptima de la manuronidasa (Figura 20A), por ejemplo a 40°C y lo comparamos con los valores obtenidos con la proteína preincubada se observa que sin este tratamiento, la actividad de la enzima es de 7.2×10^4 U/mg, si se preincuba a la enzima a 40°C la actividad se incrementa a 8.3×10^4 U/mg y si se preincuba a 80°C la actividad de la enzima es de 1.38×10^5 U/mg. Es decir, la actividad de la enzima se incrementa 66,313 Unidades si se preincuba a 80°C.

Por otro lado, la guluronidasa de *H. rufescens* aunque mostró un comportamiento muy similar y también es muy estable a las temperaturas probadas, mostró ser menos estable que la manuronidasa. Se observó que después del tratamiento térmico se incrementa la actividad pero no de forma tan notable como con la manuronidasa (Figura 20 B). Estos resultados indican que estas proteínas son termorresistentes, manteniendo su actividad muy elevada aún después de 1 hr de incubación a 90 °C. Esta termorresistencia puede ser favorecida por la presencia de azúcares en su estructura ya que se ha observado que los azúcares pueden favorecer interacciones que aumentan la estabilidad de las proteínas. Dicha estabilidad también puede ser debida a procesos de oligomerización que permiten proteger zonas lábiles dentro de la molécula¹⁰³⁻¹⁰⁸.

En nuestro laboratorio se ha observado un comportamiento similar en diversas glicohidrolasas de origen marino donde se observan dos óptimos, uno a temperatura relativamente baja (entre 40-45 °C) y otro a temperaturas elevadas (alrededor de 80 °C). En este tipo de proteínas se observó que a temperaturas cercanas a 45°C estas tenían su primer óptimo de actividad y que al incrementarse la temperatura había un descenso en la actividad seguida de un cambio conformacional que se observó por dicroísmo circular, a este cambio le seguía un proceso de oligomerización que permitía a las proteínas proteger zonas lábiles mediante mecanismos de asociación y podían soportar temperaturas más elevadas mostrando el segundo óptimo alrededor de 80°C (datos próximos a publicarse).

Algunos valores óptimos de temperatura reportados para diferentes alginasas son; aproximadamente 37 °C para las alginasas obtenidas del invertebrado *Spisula solidissima*⁹¹, 30°C para el alga *Undaria pinnatifida*^{80,81} y de 35°C para la bacteria *Alteromonas sp*^{92,93}. Dichos valores se encuentran cercanos al primer óptimo de temperatura de la Manuronidasa y la Guluronidasa (40 °C); sin embargo, no se reportan óptimos de temperatura tan elevados como lo serían 80-90 °C.

A)



B)

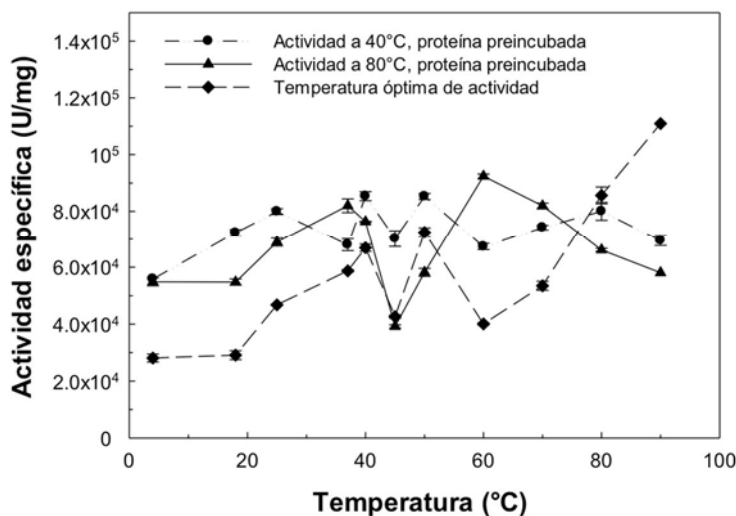
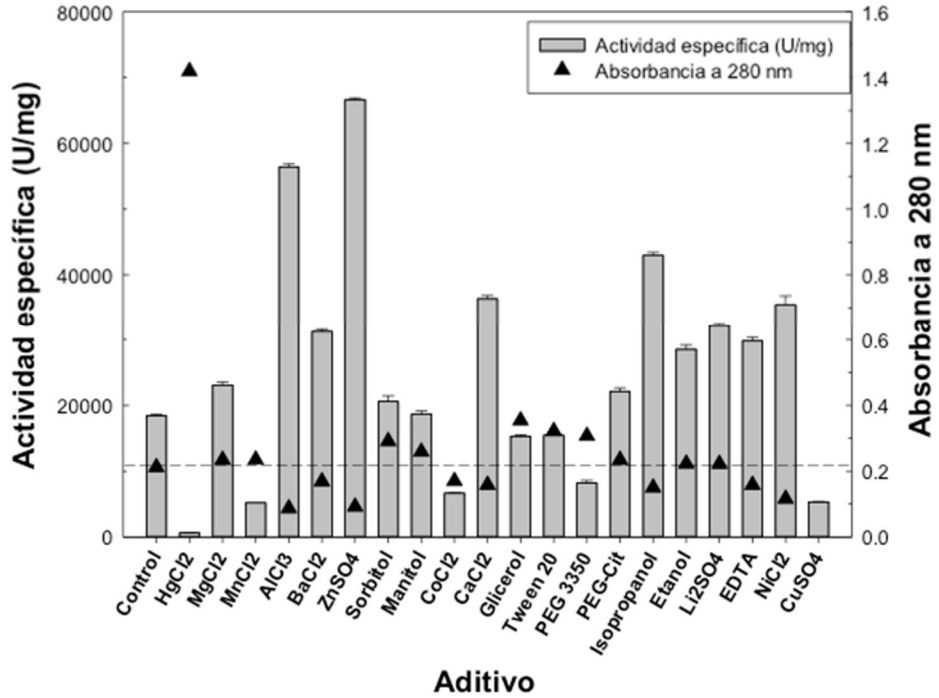


Figura 20. Efecto de la temperatura y Estabilidad térmica en la actividad de A) Manuronidasa, B) Guluronidasa de *H. rufescens*

6.6 Efecto de aditivos sobre la actividad de las alginasas purificadas

La actividad de las proteínas así como su solubilidad puede verse afectada de diferente manera por la presencia de iones, detergentes u otros aditivos que pueden estabilizar o desestabilizar su estructura en solución. Debido a lo anterior y a que tanto la manuronidasa como la guluronidasa puras tendían a agregarse, se decidió evaluar una serie de aditivos que se ha reportado que pueden tener algún efecto en la actividad y estabilidad de diversas enzimas (Tabla 3). En la Figura 22A se observa que en el caso de la Manuronidasa el zinc fue el aditivo que incrementó más su actividad específica, seguido por el aluminio, isopropanol, calcio y níquel, sin embargo, disminuyeron su solubilidad, mientras que aditivos que favorecían la solubilidad como el Hg, glicerol y PEG 3350 provocaban una disminución en la actividad. Esto puede ser resultado de fenómenos de oligomerización ya que habíamos observado que los oligómeros de mayor tamaño presentaban la mayor actividad, esto quizá por la exposición de un mayor número de sitios catalíticos, por lo que al solubilizar a los oligómeros, la actividad disminuye. Por otro lado, la Guluronidasa sólo mostró un incremento en su actividad con la adición del detergente Tween 20. Este tipo de detergentes Tienen muy baja CMC y son generalmente tensoactivos suaves, que no afectan a la actividad de proteína y son eficaces en la solubilización de las mismas¹¹⁶. Es interesante notar que ambas enzimas fueron inhibidas fuertemente por el mercurio, dicho efecto se ha observado en enzimas que poseen en su sitio catalítico grupos tiol o sulfidrilos libres que al interaccionar con el mercurio forman mercaptidos impidiendo que funcione el sitio catalítico de la enzima¹¹⁵.

A)



B)

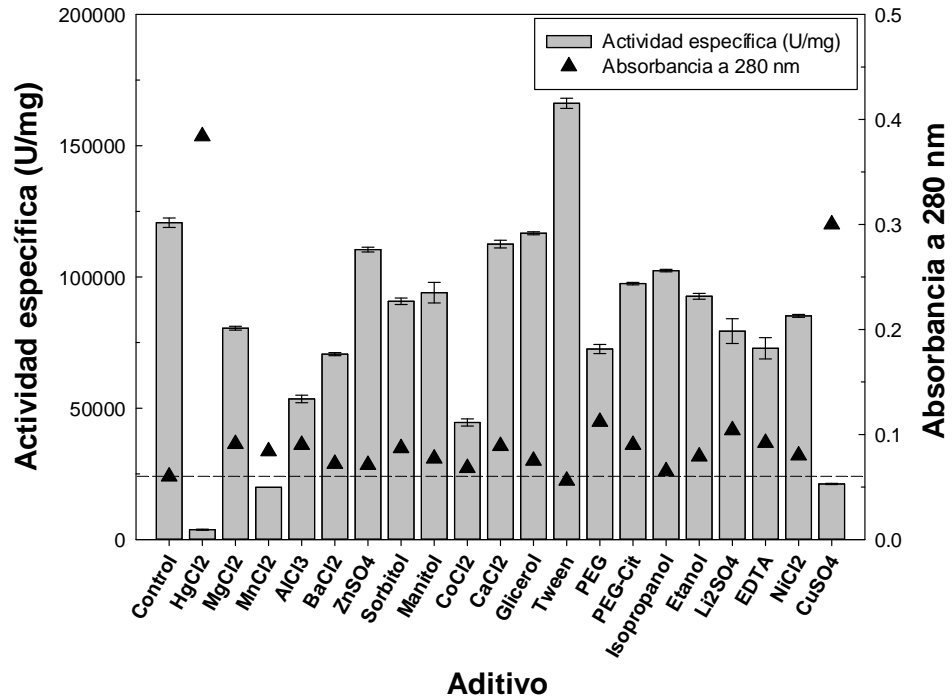


Figura 22. Efecto de diferentes aditivos sobre la actividad y solubilidad de las alginas de *H. rufescens* A) Manuronidasa, B) Guluronidasa la línea discontinua muestra la absorbancia a 280 nm del control.

6.7 Estudios de dicroísmo circular (DC)

Mediante técnicas de dicroísmo circular en el UV lejano determinamos la conformación y el contenido de estructura secundaria de las alginasas puras. En la Figura 23A se muestra el espectro obtenido con la Guluronidasa, este indica que se trata de una proteína intrínsecamente desordenada (PID). Estas proteínas existen y funcionan aún sin una estructura terciaria bien definida, lo que desafía el paradigma clásico de la estructura-función que establece que una proteína no es funcional hasta que adquiere su estructura terciaria. Las PID pueden llevar a cabo funciones esenciales que incluyen la regulación de la transcripción y la traducción, la transducción de la señal celular, fosforilación de proteínas, el almacenamiento de pequeñas moléculas, como chaperonas y la regulación del auto-ensamblaje de grandes complejos multiprotéicos tales como el flagelo bacteriano y el ribosoma. Las proteínas intrínsecamente desordenadas generalmente funcionan por reconocimiento molecular en donde motivos pequeños o segmentos desordenados son los que se utilizan en el reconocimiento de un determinado ligando induciéndose la formación de estructuras ordenadas aunque en muchas ocasiones las estructuras desordenadas se mantienen o se ordenan muy poco^{95-99, 109-113}. Se ha observado que este tipo de proteínas debido a su gran flexibilidad estructural, pueden reconocer diferentes ligandos resultando en proteínas que pueden realizar diferentes funciones (proteínas promiscuas)^{112,113}. Con el fin de evaluar el efecto de los aditivos que incrementaron la actividad de la manuronidasa en su estructura, se realizaron estudios de dicroísmo circular en presencia de dichos aditivos (Figura 23 A); se observó que el isopropanol favorece la desestructuración mientras que el Ca^{2+} y el Zn^{2+} la estructuran. La mayor estructuración se obtuvo en presencia del zinc que favoreció la formación de una estructura rica en hojas β . En diferentes estudios, se ha observado que iones divalentes como el Zn^{2+} inducen la formación de estructura secundaria, promueven la multimerización y el incremento en la actividad de las enzimas¹¹⁴.

La manuronidasa de *H. rufescens* (Figura 23 B) mostró una mayor estructuración, con un mínimo cercano a 220 nm que corresponde con estructura de hoja β . De la misma manera que con la guluronidasa, el zinc provocó un incremento

en la señal de la intensidad tanto positiva como negativa que nos habla de una mayor estructuración, la adición de calcio no provocó cambio alguno en la enzima, lo que habla de su alta especificidad por iones zinc. Algo interesante de notar fue que en los espectros de DC de ambas alginasas se observa una señal positiva entre 240 y 260 nm. Esta señal está relacionada con la coordinación de metales, lo que se corrobora al observar como dicha señal se incrementa con la adición de Zinc. Este efecto se observó con mayor intensidad en la manuronidasa (Figura 23 B).

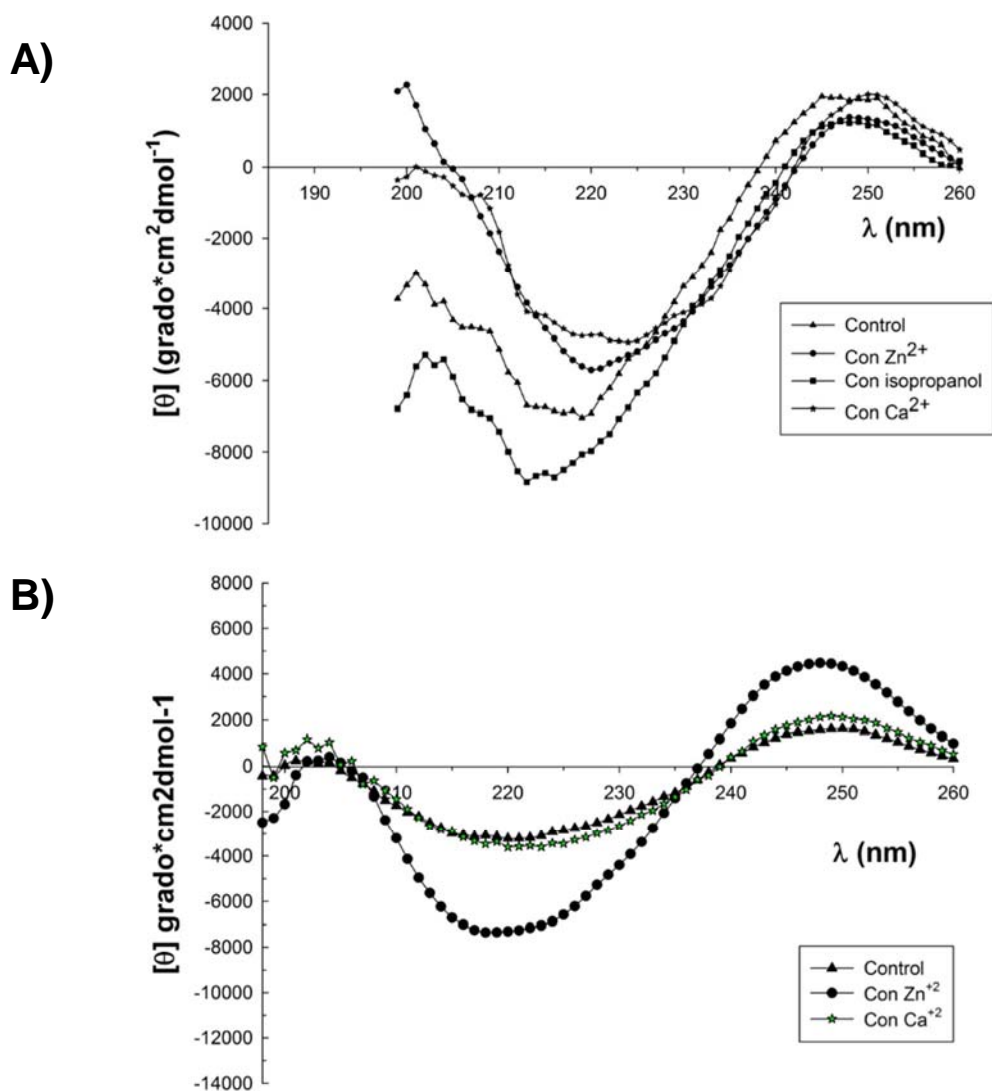


Figura 23. Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de las alginasas de *H. rufescens* A) Guluronidasa y B) Manuronidasa. Los espectros se realizaron en ausencia de aditivos y en presencia de aquellos que favorecieron su actividad.

7. CONCLUSIONES

En el presente estudio se estableció un protocolo para la purificación en un solo paso de dos alginasas, una manuronidasa y una guluronidasa del hepatopáncreas del abulón rojo *H. rufescens*. Ambas enzimas poseen actividades específicas muy elevadas y son activas en un amplio intervalo de pH y temperatura, conservando su actividad aún después de incubar por 1 hr a 90 C, lo que las hace de interés para futuras aplicaciones a nivel industrial.

Las dos alginasas purificadas presentaron una fuerte tendencia a oligomerizar, este comportamiento puede ser inducido por el alto contenido de carbohidratos que presentaron en su estructura y que favorecen la asociación de las proteínas. Esta también puede ser la razón de la actividad tan alta y de la termorresistencia que presentaron ambas proteínas ya que al oligomerizar, se exponen más sitios catalíticos y se protegen zonas lábiles de las proteínas favoreciendo la actividad y estabilidad de las mismas.

La manuronidasa de *H. rufescens* resultó ser la alginasa de menor masa molecular reportada a la fecha, y junto con la guluronidasa, logran la hidrólisis total del alginato. La inhibición que ambas enzimas muestran en presencia de mercurio puede indicar que en su sitio catalítico hay grupos tiol libres que reaccionan con el mercurio inhibiendo a la proteína. En ambas alginasas el Zn^{2+} favorece la estructuración de las proteínas induciendo la formación de hojas β , que es un elemento de estructura secundaria que favorece la oligomerización.

8. PERSPECTIVAS

- 1) Secuenciar a las alginasas y con esta secuencia realizar un modelo estructural para comprobar el grado de estructuración de cada proteína.
- 2) Determinar el coeficiente de extinción utilizando la secuencia o bien determinarlo por espectrometría de masas con la proteína glicosilada y desglicosilada. Esto con el fin de tener una cuantificación de proteína más precisa que permita una mejor estimación del contenido de carbohidratos totales y del contenido de estructura secundaria de manera precisa.
- 3) Realizar estudios de dispersión dinámica de luz para confirmar y analizar los mecanismos de oligomerización que sufren estas enzimas y el efecto de iones como el Zn en su estructura oligomérica.
- 4) Verificar la especificidad de cada alginasa con oligosacáridos con secuencias específicas, es decir bloques M o bloques G.

9. REFERENCIAS

1. Wong, T.Y., Preston, L.A., 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.
2. Michaud, P., Da Costa, A., Courtois, B., Courtois, J. (2003) Polysaccharide lyases: recent developments as biotechnological tools. *Crit Rev Biotechnol* **23**: 233-266.
3. Gacesa, P. (1988) Alginates. *Carbohydr Polym* **8**, 161-182.
4. Iwamoto, Y., Iriyama, K., Osatomi, K., Oda, T., Muramatsu, T. (2002) Primary structure and chemical modification of some amino acid residues of bifunctional alginate lyase from a marine bacterium *Pseudoalteromonas sp.* strain No. 272. *J Prot Chem* **21**: 455-463.
5. Osawa, T., Matsubara, Y., Muramatsu, T., Kimura, M., Kakuta, Y. (2005) Crystal structure of the alginate (poly- α -L-gulonate) lyase from *Corynebacterium sp.* at 1.2 Å resolution. *J Mol Biol* **345**: 1111-1118.
6. Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (2005) Principles of biochemistry fourth edition, W.H. Freeman pp. 1119.
7. Aspinall, G. O. (1982) General Introduction. On: The Polysaccharides. Aspinall, G. O., Ed. Academic Press. 1:1-18.
8. Polne-Fuller, M., Gibor, A. (1987) Microorganisms as digestors of seaweed cell walls. *Hydrobiologia*. pp. 151-152, 405-409.
9. Senthilkumar, K., Manivasagan, P., Venkatesan, J., Kim, S.K. (2013) Brown seaweed fucoidan: biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *Int J Biol Macromol* **60**: 366-374.
10. Skjak-Braek, G., Grasdalen, H., Larsen, B. (1986) Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates. *Carbohydr Res* **154**, 239-50.

11. Guiseley, K.B. (1989) Chemical and physical properties of algal polysaccharides used for cell immobilization. *Enzyme Microb Technol* **11**, 706-716.
12. Draget, K.I., Ostgaard, K., y Smidsrød, O. (1990) Homogeneous alginate gels a technical approach. *Carbohydr Polym* **14**, 159-178.
13. Martinsen, A., Skjåk-Braek, G., Smidsrød, O. (1989) Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng* **33**, 79-89.
14. Jiménez-Escrg., A., Sánchez-Muniz, F.J. (2000) Dietary fibre from edible Seaweeds: Chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutr Research* **20**, 585-598.
15. Gombotz, W.R., Wee S. (1998) Protein release from alginate matrices. *Adv Drug Deliv Rev* **31**: 267- 285.
16. Berth, G. (1992) Methodical aspects of characterization of alginate and pectate by light scattering and viscometry coupled with GPC. *Carbohydr Polym* **19**, 1-9.
17. Rehm, B.H., Valla, S. (1997) Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **48**: 281-288.
18. Miura, K., Kimura, N., Suzuki, H., Miyashita, H.Y., Nishio, Y. (1999) Thermal and Viscoelastic Properties of Alginate/Poly (vinyl alcohol) Blends Cross-Linked with Calcium Tetraborate. *Carbohydr Polym* **39**: 139-144.
19. Andresen, I.L., Smidsroed, O. (1977) Temperature dependence of the elastic properties of alginate gels. *Carbohydr Res* **58**: 271- 279.
20. Chapman, V.J., Chapman, D.J. (1980) Seaweeds and Their Uses (3rd ed). London: Chapman and Hall. pp. 334.
21. Tramper, J., De Man, A. (1986) Characterization of *Nitrobacter agilis* immobilized in calcium alginate. *Enzyme Microb Technol* **8**, 472-476.

22. Wang, L., Khor, E., Wee, A., Lim, L.Y. (2002) Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: Assessment of incisional wound healing. *J Biomed Mater Res* **63**: 610-618.
23. Anbinder, P.S., Deladino, L., Navarro, A.S., Amalvy, J.I., Martino, M.N. (2011) Yerba Mate Extract Encapsulation with Alginate and Chitosan Systems: Interactions between Active Compound Encapsulation Polymers. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences* **1**: 80-87.
24. Sun, J., Tan, H. (2013) Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials* **6**, 1285-1309.
25. Yip, V.L., Withers, S.G. (2004) Nature's many mechanisms for the degradation of oligosaccharides. *Org Biomol Chem* **2**: 2707-2713.
26. Garron, M-L., Cygler, M. (2010) Structural and mechanistic classification of uronic acid-containing polysaccharide lyases. *Glycobiology* **20**:1547-1573.
27. McCarter, J.D., Withers, S.G. (1994) Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol* **4**: 885-892.
28. Lombard, V., Bernard, T., Rancurel, C., Brumer, H., Coutinho, P.M., Henrissat, B. (2010) A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycomics. *Biochem J* **432**: 437-444.
29. Lombard, V., Golaconda, H., Drula, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B. (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* **42**: 490-495.
30. Li, J.W., Dong, S., Song, J., Li, C.B., Chen, X.L., Xie, B.B., Zhang, Y.Z. (2011) Purification and Characterization of a Bifunctional Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. SM0524. *Mar Drugs* **9**:109-123.

31. Yamasaki, M., Ogura, K., Hashimoto, W., Mikami, B., Murata, K. (2005) A structural basis for depolymerization of alginate by polysaccharide lyase family-7. *J Mol Biol* **352**: 11-21.
32. Gacesa, P. (1992) Enzymic degradation of alginates. *Int J Biochem* **24**: 545-552.
33. Davies, G.J., Wilson, K.S., Henrissat, B. (1997) Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem J* **321**: 557-559.
34. Kim, H.S., Lee, C-G, Lee, E.Y. (2011) Alginate Lyase: Structure, Property, and Application. *Biotechnol Bioprocess Eng* **16**: 843-851.
35. Boyen, C., Kloareg, B., Polne-Fuller, M., Gibor, A. (1990) Preparation of alginate lyases from marine molluscs for protoplast isolation in brown algae. *Phycologia* **29**: 173-81.
36. Cotton, L., A., Graham, R.J., Lee, R.J. (2009) The role of alginate in *P. aeruginosa* PAO1 biofilm structural resistance to gentamicin and ciprofloxacin. *J Exp Microbiol Immunol* **13**: 58-62.
37. Sánchez-Solís, M., Salcedo-Posadas, A., Vázquez, C., Gartner, S., (1999) Fibrosis quística. Protocolos diagnósticos y terapéuticos en pediatría. *Neumología* 281-290.
38. Bayer, A.S., Park, S., Ramos, M.C., Nast, C.C., Eftekhari, F., 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.
39. Mrsny, R.J., Lazazzera, B.A., Daugherty, A.L., Schiller, N.L., Patapoff, T.W. (1994) Addition of a bacterial alginate lyase to purulent CF sputum in vitro can result in the disruption of alginate and modification of sputum viscoelasticity. *Pulm Pharmacol* **7**: 357-366.

40. Beer, L.L., Boyd, E.S., Peters, J.W., Posewitz, M.C. (2009) Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Curr Opin Biotechnol* **20**: 264-271.
41. Wargacki, A.J., Leonard, E., Win, M.N., Regitsky, D.D., Santos, C.N., Kim, P.B., Cooper, S.R., Raisner, R.M., Herman, A., Sivitz, A.B., Lakshmanaswamy, A., Kashiyama, Y., Baker, D., Yoshikuni, Y. (2012) An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. *Science* **335**: 308-313.
42. Wei, N., Quarterman, J., Jin, Y.S. (2013) Marine macroalgae: an untapped resource for producing fuels and chemicals. *Trends Biotechnol* **31**: 70-77.
43. Mateus, H. (1986) Los abulones en México, primera edición, secretaria de pesca. Centro de documentación y biblioteca. pp. 21-31.
44. Preiss, J., Ashwell, G. (1962) Alginic acid metabolism in bacteria. *J Biol Chem* **237**: 309-316.
45. Michaud, P., Da Costa, A., Courtois, B., Courtois, J. (2003) Polysaccharide lyases: recent developments as biotechnological tools. *Crit Rev Biotechnol* **23**: 233-266.
46. Yoon, H.J., Mikami, B., Hashimoto, W., 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,
47. Iwamoto, Y., Araki, R., Iriyama, K., Oda, T., Fukuda, H., Hayashida, S., Muramatsu, T. (2001) Purification and characterization of bifunctional alginate lyase from *Alteromonas* sp. strain no. 272 and its action on saturated oligomeric substrates. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**: 133-42.
48. Park, D., Jagtap, S., Nair, S.K. (2014) Structure of a PL17 Family Alginate Lyase Demonstrates Functional Similarities among Exotype Depolymerases. *J Biol Chem* **289**: 8645-8655.

49. Ogura, K., Yamasaki, M., Yamada, T., Mikami, B., Hashimoto, W., Murata, K. (2009) Crystal structure of family 14 polysaccharide lyase with pH-dependent modes of action. *J Biol Chem* **284**, 35572-35579.
50. Ochiai, A., Yamasaki, M., Mikami, B., Hashimoto, W., Murata, K. (2010) Crystal structure of exotype alginate lyase Atu3025 from *Agrobacterium tumefaciens*. *J Biol Chem* **285**: 24519-24528.
51. Thomas, F., Lundqvist, L.C., Jam, M., Jeudy, A., Barbeyron, T., Sandström, C., Michel, G., Czjzek, M. (2013) Comparative characterization of two marine alginate lyases from *Zobellia galactanivorans* reveals distinct modes of action and exquisite adaptation to their natural substrate. *J Biol Chem* **288**, 23021-23037.
52. Osawa, T., Matsubara, Y., Muramatsu, T., Kimura, M., Kakuta, Y. (2005) Crystal structure of the alginate (poly alpha-L-guluronate) lyase from *Corynebacterium* sp. at 1.2 Å resolution. *J Mol Biol* **345**: 1111-1118.
53. Yamasaki, M., Moriwaki, S., Miyake, O., Hashimoto, W., Murata, K., Mikami, B. (2004) Structure and function of a hypothetical *Pseudomonas aeruginosa* protein PA1167 classified into family PL-7: a novel alginate lyase with a beta-sandwich fold. *J Biol Chem* **279**: 31863-31872.
54. Nisizawa, K., Fujibayashi, S., Kashiwabara, Y. (1968) Alginate lyases in the hepatopancreas of a marine mollusc, *Dolabella auricula* Solander. *J Biochem* **64**: 25-37.
55. Nakada, H.I., Sweeny, P.C., (1967) Alginic acid degradation by eliminases from abalone hepatopancreas. *J Biol Chem* **242**, 845-851.
56. Boyen, C., Kloareg, B., Polne-Fuller, M., Gibor, A., (1990) Preparation of alginate lyases from marine molluscs for protoplast isolation in brown algae. *Phycology* **29**: 173-181.
57. Heyraud, A., Colin-Morel, P., Girond, S., Richard, C., Kloareg, B., (1996) HPLC analysis of saturated or unsaturated oligoguluronates and oligomannuronates

Application to the determination of the action pattern of *Haliotis tuberculata* alginate lyase. *Carbohydr Res* **291**: 115-126.

58. Shimizu, E., Ojima, T., Nishita, K., (2003) cDNA cloning of an alginate lyase from abalone, *Haliotis discus hannai*. *Carbohydr Res* **338**: 2841-2852.

59. Suzuki, H., Suzuki, K., Inoue, A., Ojima, T., (2006) A novel oligoalginate lyase from abalone, *Haliotis discus hannai*, that releases disaccharide from alginate polymer in an exolytic manner. *Carbohydr Res* **341**, 1809-1819.

60. Hata, M., Kumagai, Y., Rahman, M.M., Chiba, S., Tanaka, H., Inoue, A., Ojima, T., (2009) Comparative study on general properties of alginate lyases from some marine gastropod mollusks. *Fisher Sci* **75**: 755-763.

61. Muramatsu, T., Hirose, S., Katayose, M., (1977) Isolation and properties of alginate lyase from the mid-gut gland of wreath shell *Turbo cornutus*. *Agricul Biol Chem* **41**: 1939-1946.

62. Elyakova, L.A., Favarov, V.V., (1974) Isolation and certain properties of alginate lyase VI from the mollusk Littorina sp. *Biochim Biophys Acta* **358**: 341-354

63. Nisizawa, K., Fujibayashi, S., Kashiwabara, Y., (1968) Alginate lyases in the hepatopancreas of a marine mollusk *Dolabella auricula* Solander. *J Biochem* **64**, 25-37.

64. Wakabayashi, T., Kuboi, T., Tuboi, T., Kaji, M., Hara, M., (1999) Preparation of high yields of algal protoplasts using buccal juice of sea hare and commercial cellulase. *Mar Biotechnol* **1**: 407-410.

65. Rahman, M.M., Inoue, A., Tanaka, H., Ojima, T. (2010) Isolation and characterization of two alginate lyase isozymes, AkAly28 and AkAly33, from the common sea hare *Aplysia kurodai*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **157**, 317-325.

66. Suzuki, H., Suzuki, K., Inoue, A., Ojima, T., (2006) A novel oligoalginate lyase from abalone, *Haliotis discus hannai*, that releases disaccharide from alginate polymer in an exolytic manner. *Carbohydr Res* **341**: 1809-1819
67. González-Gatica, R. (2004) *Caracterización fisicoquímica y estructural de dos alginasas de *Astraea undosa**. Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México.
68. Smith, P.K., Krohn, R.L., (1985) Measure of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85.
69. Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicyc Acid Reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* **31**: 426-428.
70. Routh, J., Eyman, D., Burton, D. (1990) *Compendio Esencial de Química General, Orgánica y Bioquímica*, tomos I y II. Segunda Edición. Editorial Reverté. Bogotá, Colombia. pp. 78-81.
71. Garfin, D.E. (1990) One dimensional gel electrophoresis. *On: Methods in Enzymology*. vol 182. Academic press. pp. 425.
72. Fuchs, B., Schiller, J. (2009) Application of MALDI-TOF mass spectrometry in lipidomics. *European Journal of Lipid Science and Technology* **111**: 83-98.
73. Neumann, N., Snatzke, G. (1990) Circular dichroism of proteins. In *Proteíns: Form and Function*. R. A. Bradshaw and M. Purton, eds (Cambridge: Elsevier Trends Journals). pp. 107-116.
74. Kelly, S., Price, N. (1997) The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim Biophys Acta* **1338**: 161-185.
75. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*. **28**: 350-356.

76. Hernández-Santoyo, A., Hernández-García, E., Rodríguez-Romero, A. (1999) Celulosomas, sistemas multienzimáticos. *Rev Soc Quim Mex* **43**: 137-142.
77. Bayer, E.A., Belaich, J.P., Shoham, Y., Lamed, R. (2004) The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu Rev Microbiol* **58**: 521-554.
78. Alekseeva, S.A., Bakunina, I.Y., Nedashkovskaya, O.I., Isakov, V.V., Mikhailov, V.V., Zvyagintseva, T.N. (2004) Intracellular alginolytic enzymes of the marine bacterium *Pseudoalteromonas citrea* KMM 3297. *Biochem* **69**: 262-269.
79. Presečki, A.V., Blažević, Z.F., Vasić-Rački, D. (2013) Complete starch hydrolysis by the synergistic action of amylase and glucoamylase: impact of calcium ions. *Bioprocess Biosyst Eng* **36**: 1555-1562.
80. Shiraiwa, Y., Abe, K., Sasaki, S.F., Ikawa, T., Nisizawa, K. (1975) Alginate lyase activities in the extracts from several brown algae. *Bot Mar* **18**: 97-104.
81. Watanabe, T., Nisizawa, K. (1982) Enzymatic studies on alginate lyase from *Undaria pinnatifida* in relation to texture-softening prevention by ash-treatment (Haiboshi). *Bull Jpn Soc Scie Fish* **48**: 243-49.
82. Boyen, C., Kloareg, B., Polne-Fuller, M., Gibor, A. (1990) Preparation of alginate lyases from marine molluscs for protoplast isolation in brown algae. *Phycologia* **29**: 173-81.
83. Elyakova, L.A., Favorov, V.V. (1974) Isolation and certain properties of alginate lyase VI from the mollusk *Littorina sp.* *Biochim Biophys Acta* **358**: 341-354.
84. Favorov, V.V., Vozhova, E.I., Dcniscnko, V.A., Elyakova, L.A. (1979) A study of the reaction catalysed by alginate lyase VI from the sea mollusc, *Littorina sp.* *Biochim Biophys Acta* **569**, 259-266.

85. Kim, Y.K., Shin, H.S., Tomiya, N., Lee, Y.C., Betenbaugh, M.J., Cha, H.J. (2005) Production and N-glycan analysis of secreted human erythropoietin glycoprotein in stably transfected *Drosophila* S2 cells. *Biotechnol Bioeng* **92**: 452-461.
86. Go, E.P., Irungu, J., Zhang, Y., Dalpathado, D.S., Liao, H.X., Sutherland, L.L., Alam, S.M., Haynes, B.F., Desaire, H. (2008) Glycosylation site-specific analysis of HIV envelope proteins (JR-FL and CON-S) reveals major differences in glycosylation site occupancy, glycoform profiles, and antigenic epitopes' accessibility. *J Proteome Res* **7**: 1660-1674.
87. Ouagari, K., Teissié, J., Benoist, H. (1995). Glycophorin A protects K562 cells from natural killer cell attack. Role of oligosaccharides. *J Biol Chem* **270**: 26970-5.
88. Braga, V., Gendler, S. (1993) Modulation of Muc-1 mucin expression in the mouse uterus during the estrus cycle, early pregnancy and placentation. *J Cell Sci* **105**: 397-405.
89. Strous, G.J., Dekker, J. (1992) Mucin-type glycoproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **27**: 57-92.
90. Kasekarn, W., Kanazawa, T., Hori, K., Tsuchiyama, T., Lian, X., Garénaux, E., Kongmanas, K., Tanphaichitr, N., Yasue, H., Sato, C., Kitajima, K. (2012) Pig sperm membrane microdomains contain a highly glycosylated 15-25-kDa wheat germ agglutinin-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* **426**: 356-362.
91. Jacober, L.F., Rice, C., Rand, A.G. Jr. (1980) Characterization of the carbohydrate degrading enzymes in the Surf Clam crystalline style. *J Food Sci* **45**: 381-85.
92. Sawabe, T., Ezura, Y., Kimura, T. (1992) Purification and characterization of an alginate lyase from marine *Alteromonas* sp. *Nippon Suisan Gakkaishi* **58**, 521-27.
93. Sawabe, T., Ohtsuka, M., Ezura, Y. (1997) Novel alginate lyases from marine bacterium *Alteromonas* sp. strain H-4. *Carbohydr Res* **304**: 69-76.

93. Tey, L.H., Loveridge, E.J., Swanwick, R.S., Flitsch, S.L., Allemann, R.K. (2010) Highly site-selective stability increases by glycosylation of dihydrofolate reductase. *FEBS J* **277**: 2171-2179.
94. Natalello, A., Doglia, S.M., Carey, J., Grandori, R. (2007) Role of flavin mononucleotide in the thermostability and oligomerization of *Escherichia coli* stress-defense protein WrbA. *Biochemistry* **46**, 543-553.
95. Uversky, V.N., Dunker A.K. (2010) Understanding protein non-folding. *Biochim Biophys Acta* **1804**:1231-1264.
96. Dyson, H.J., Wright P.E. (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:197-208.
97. Hazy, E., Tompa, P. (2009) Limitations of induced folding in molecular recognition by intrinsically disordered proteins. *Chemphyschem* **10**:1415-1419
98. Uversky, V.N., Gillespie J.R., Fink A.L. (2000) Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions?. *Proteins* **41**: 415-427.
99. Uversky, V.N. (2011) Intrinsically disordered proteins from A to Z. *Int J Biochem Cell Biol* **43**:1090-103
100. Gotte, G., Libonati, M. (2014) Protein Oligomerization, Oligomerization of Chemical and Biological Compounds, Dr. Claire Lesieur (Ed.), ISBN: 978-953-51-1617-2, InTech, DOI: 10.5772/57489. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/oligomerization-of-chemical-and-biological-compounds/protein-oligomerization>
101. Garnham, C.P., Campbell, R.L., Walker, V.K., Davies, P.L. (2011) Novel dimeric β -helical model of an ice nucleation protein with bridged active sites. *BMC Struct Biol* **11**:36.
102. Ali, M.H., Imperiali, B. (2005) Protein oligomerization: how and why. *Bioorg Med Chem* **1**;13:5013-20.

103. Tey, L.H., Loveridge, E.J., Swanwick, R.S., Flitsch, S.L., Allemann, R.K.(2010) Highly site-selective stability increases by glycosylation of dihydrofolate reductase. *FEBS J* **277**:2171-9.
104. Solá, R.J., Griebenow, K. (2009) Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *J Pharm Sci* **98**:1223-45.
105. Öberg, F., Sjöhamn, J., Fischer, G., Moberg, A., Pedersen, A., Neutze, R. (2011) Glycosylation increases the thermostability of human aquaporin 10 protein. *J Biol Chem* **286**:31915-23.
106. Wang, S., Dong, Z.Y., Yan, Y.B. (2014) Formation of high-order oligomers by a hyperthermostable Fe-superoxide dismutase (tcSOD). *PLoS One*. **9**.
107. Demirjian, D.C., Morís-Varas, F., Cassidy C. S. (2001) Enzymes from extremophiles. *Curr Opin Chem Biol* **5**:144-51.
108. Reed, C.J., Lewis, H., Trejo, E., Winston, V., Evilia, C. (2013) Protein adaptations in archaeal extremophiles. *Archaea* **2013**:373275.
109. Tompa, P. (2012) Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap. *Trends Biochem Sci* **37**:509-16.
110. Uversky, V.N. (2011) Intrinsically disordered proteins from A to Z. *Int J Biochem Cell Biol* **43**:1090-103.
111. Van der Lee, R., Buljan, M., Lang, B. (2014) Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem Rev* **114**:6589-631.

112. Babu, M.M., Van der Lee, R., De Groot, N.S., Gsponer, J. (2011) Intrinsically disordered proteins: regulation and disease. *Curr Opin Struct Biol* **43**:2-40.
113. Vavouri, T., Semple, J.I., Garcia-Verdugo, R., Lehner, B. (2009) Intrinsic protein disorder and interaction promiscuity are widely associated with dosage sensitivity. *Cell* **138**:198-208.
114. Yi, S., Boism, B.L., Brickenden, A., Konermann, L., Choy, W.Y. (2007) Effects of zinc binding on the structure and dynamics of the intrinsically disordered protein prothymosin alpha: evidence for metalation as an entropic switch. *Biochemistry* **46**:13120-30.
115. Heneine, I.F., Kimmel, J.R. (1972) The sulfhydryl groups of papaya lysozyme and their relation to biological activity. *J Biol Chem* **247**:6589-96.
116. Linke, D. (2009) Detergents: an overview. *Methods Enzymol* **463**:603-17.
117. Takahashi, S., Pryciak, P.M. (2008) Membrane localization of scaffold proteins promotes graded signaling in the yeast MAP kinase cascade. *Curr Biol* **18**: 1184-91.