



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

Caracterización fisicoquímica y  
estructural de las alginasas de *Astraea*  
*undosa*.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:  
RODOLFO GONZALEZ GATICA

DIRECTOR DE TESIS  
Dra. ALEJANDRA HERNÁNDEZ SANTOYO

ASESOR DE TESIS  
Dr. ALBERTO MONROY GARCIA

MÉXICO, D. F. 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Alejandra Hernández Santoyo, en el laboratorio de Bioquímica del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México

## AGRADECIMIENTOS

A mis Padres:

**Soledad y Samuel**

Por su amor, su comprensión y siempre impulsarme para lograr mis metas.

A mis Hermanos:

**Alejandra N. y José S.**

Por su cariño y apoyo, además de estar siempre cuando más los necesitaba.

A la **Dra. Alejandra Hernández Santoyo**

Por todo su apoyo y paciencia, además de guiarme para realizar éste trabajo.

A todos mis **AMIGOS** y compañeros, que sin ellos, hubiera sido muy difícil lograr esto, y ayudarme a mejorar en muchos aspectos de mi vida.

**Todo hombre debe decidir una vez en su vida, si se lanza a triunfar arriesgando todo, o si se sienta a contemplar el paso de los triunfadores.**

**LIA 06-06-04**

## ABREVIATURAS

- Å: Angstrom  
AFM: microscopía de fuerza atómica  
Alg I: Alginasa 1  
Alg II: Alginasa 2  
BCA: Acido bicinconínico  
BSA: Albúmina de suero de bovino  
CD: Dicroísmo circular  
DEAE: Dietilaminoetil  
DLS: Dispersión dinámica de luz  
DNS: Acido 3,5 dinitrosalicílico  
EDTA: Acido etilendiamino tetracético  
g: Fuerza centrífuga relativa  
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución  
IEF: Enfoque isoelectrico  
 $\lambda$ : longitud de onda  
PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida  
PEG: Polietilenglicol  
SDS: Dodecil sulfato de sodio  
Tris: Tris (hidroximetil) amino-metano  
U: Unidad de actividad  
UV: Ultravioleta  
M:  $\beta$ -D-manuronato  
G:  $\alpha$ -L-guluronato  
MES: ácido (2-[N-morfolino]etanosulfónico)

## CONTENIDO

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>1. INTRODUCCION</b> .....	<b>10</b>
1.1. POLISACÁRIDOS.....	10
1.2. POLISACÁRIDOS ALGALES .....	10
1.3. COMPOSICIÓN DEL ALGINATO.....	10
1.4. APLICACIONES DEL ALGINATO.....	13
1.5. ENZIMAS QUE HIDROLIZAN ALGINATO.....	13
1.6. DESCRIPCIÓN DEL MOLUSCO <i>ASTRAEA UNDOSA</i> .....	14
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>16</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>18</b>
3.1. OBJETIVOS PARTICULARES .....	18
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>19</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
5.1. EXTRACCIÓN DE GLICOHIDROLASAS.....	20
5.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ALGINOLÍTICA .....	20
5.3. CUANTIFICACIÓN DE LA ENZIMA PURIFICADA.....	21
5.4. CURVA DE CALIBRACIÓN .....	22
5.5. PREPARACIÓN DE LAS PERLAS INSOLUBLES DE ALGINATO .....	23
5.6. ESTUDIO DE MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA DE LAS PERLAS DE ALGINATO .....	23
5.7. PRUEBAS DE UNIÓN DE ALGINASAS DE DIFERENTE FUENTE A LAS PERLAS DE ALGINATO .....	24
5.8. PUIFICACIÓN DE LAS ALGINASA DE <i>ASTRAEA UNDOSA</i> . .....	25
5.9. CARACTERIZACIÓN DE LAS ENZIMAS PURIFICADAS.....	25
5.9.1. <i>Determinación del peso molecular</i> .....	25
5.9.2. <i>Determinación del punto isoeléctrico</i> .....	25
5.9.3. <i>Determinación de los valores óptimos de pH y temperatura</i> .....	26
5.9.4. <i>Determinación de la estructura secundaria</i> .....	26
5.9.5. <i>Dispersión Dinámica de Luz (DLS)</i> .....	28
5.9.6. <i>Efectos de diferentes aditivos sobre la actividad de las alginasas purificadas</i> . 30	
5.9.7. <i>Especificidad</i> .....	31
5.9.8. <i>Cristalización de las glicohidrolasas</i> .....	31
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>33</b>
6.1. PREPARACIÓN DEL SOPORTE PARA LA PURIFICACIÓN DE LAS ALGINASAS DE <i>ASTRAEA UNDOSA</i> . .....	33
6.2. ESTUDIOS DE MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA. ....	35
6.3. PURIFICACIÓN DE LAS ALGINASAS DE <i>A. UNDOSA</i> .....	45
6.4. ESTUDIOS ELECTROFORÉTICOS .....	47

6.5. EFECTO DEL pH Y LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD DE LAS ALGINASAS DE <i>A. UNDOSA</i> .....	48
6.6. ESPECIFICIDAD .....	50
6.7. EFECTO DE ADITIVOS .....	51
6.8. COMPORTAMIENTO EN SOLUCIÓN Y CONDUCTA DE AGREGACIÓN (DLS).....	55
6.9. ESTUDIOS DE DICROÍSMO CIRCULAR (DC).....	57
6.10. CRISTALIZACIÓN DE LAS ALGINASAS PURIFICADAS. ....	59
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>62</b>
<b>8. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>63</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>64</b>



## RESUMEN

Las alginasas son glicohidrolasas que se han estudiado poco, y a la fecha existen pocos reportes sobre su purificación. La actividad de estas enzimas se ha reportado en extractos obtenidos de varias especies de algas cafés, de algunos invertebrados marinos y de bacterias. Sin embargo, a pesar que se han identificado en numerosas fuentes, sólo se han caracterizado unas cuantas, ninguna de ellas de invertebrados marinos. Lo poco que se ha estudiado de ellas, el que a la fecha no existan estudios fisicoquímicos y estructurales para alginasas de invertebrados marinos, la actividad que presentan – varias veces mayor a la reportada para alginasas de otras fuentes – y la aplicación tan amplia que tienen tanto en medicina como en biotecnología hacen que su estudio sea de gran importancia. Es por ello que se diseñó el procedimiento para aislar y purificar las alginasas del hepatopáncreas de *Astraea undosa*, utilizando a su sustrato (alginato de sodio) como soporte de purificación.

Se aislaron y purificaron dos alginasas (Alg I y Alg II) del hepatopáncreas del molusco marino *Astraea undosa*, para ello se diseñó una técnica de purificación que consistió en la elaboración de perlas insolubles de alginato en amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 8 en presencia de  $\text{CaCl}_2$ . La polimerización del alginato y la consistencia del gel dependen de la concentración de  $\text{CaCl}_2$ . Se realizó el estudio microscópico de la superficie de las perlas obtenidas a diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ , utilizando la técnica de microscopía de fuerza atómica, esto con el fin de obtener las perlas con las mejores propiedades, para funcionar como soporte en la purificación. Las perlas formadas con concentraciones menores a 100 mM de  $\text{CaCl}_2$ , no funcionaron como soporte para la purificación por su consistencia frágil. Las perlas de consistencia más fuerte se utilizaron con extractos de dos moluscos; *Astraea undosa* y *Haliotis rufescens*, encontrando que las que funcionaron mejor fueron las de 100, 200 y 300 mM. Con las perlas formadas con 100 mM de  $\text{CaCl}_2$ , se realizó la purificación de las alginasas de *A. undosa*, lográndose purificar dos alginasas, a las que se llamaron Alg I y Alg II. La Alg I se purificó al homogenizar las perlas, ya que se mantuvo unida a estas, mientras que la Alg II se purificó al eluirla con amortiguador que contenía NaCl 1.0 M. Ambas enzimas mostraron ser proteínas ácidas con un punto isoeléctrico de 5 y 4.5 respectivamente y una masa de 54 y 44 kDa respectivamente. El pH y la temperatura óptima de actividad fueron de 8 y 30 °C respectivamente. Mediante estudios de dispersión dinámica de luz se determinó que estas

enzimas tienden a formar agregados conforme aumenta la temperatura, y que con la adición de polietilenglicol éstos agregados se mantienen en forma monodispersa. Por técnicas de dicroísmo circular, se observó que en ambas alginasas predomina la hoja beta, aunque el contenido de esta es mayor para la Alg I.

Se estudió el efecto de diferentes aditivos en la actividad alginolítica de estas enzimas, determinando que algunos cationes divalentes como el hierro, cobre, bario y mercurio producían una inhibición total de la actividad, y que en el caso del cobre dicha inhibición resultó reversible. Aditivos como el magnesio, aumentan hasta dos veces la actividad de las alginasas, el hierro aumenta la actividad tres veces en Alg I y el zinc aumenta dos veces la actividad de Alg II. Se comprobó que tanto Alg I como Alg II pueden degradar el ácido gulurónico y el ácido manurónico. Se montaron pruebas de cristalización con el fin de obtener cristales apropiados para posteriores estudios de difracción de rayos X. A la fecha se han obtenido cristales de ambas enzimas.

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Polisacáridos

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

### 1.2. Polisacáridos algales

Las algas marinas, constituyen una fuente importante de polisacáridos. Las macroalgas poseen una pared celular, química y estructuralmente más compleja y heterogénea que la de plantas terrestres, la que esta compuesta por mezclas de polisacáridos ramificados y sulfatados los cuales están asociados a proteínas y a iones como el calcio y el potasio. Los principales polisacáridos presentes en la mayoría de las macroalgas son la celulosa, el ácido algínico, el carragenano y el agar.<sup>2</sup>

### 1.3. Composición del alginato

Los alginatos son las sales del ácido algínico, polisacárido lineal constituido por el ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y su epímero, el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G). Estos se agrupan en bloques de secuencias MM, MG, unidos por enlaces glucosídicos  $\beta$  (1-4); y bloques GG, GM, unidos por enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1-4).<sup>3-16</sup> 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). En presencia de calcio u otros iones divalentes, los alginatos forman geles termo-irreversibles.

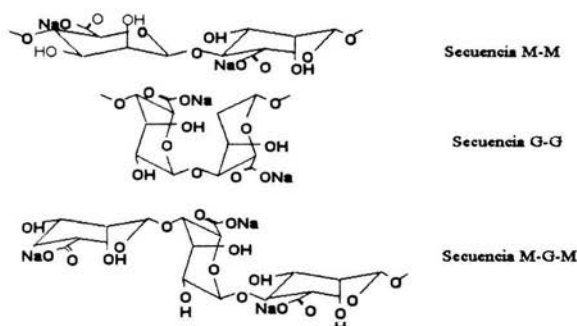


Figura 1. Estructura química del alginato<sup>17</sup>

La distribución de los monómeros M y G, le confiere al alginato la capacidad de formar geles con cationes polivalentes con los cuales reacciona en forma cruzada. Este es el caso del calcio, que se ubica en los espacios formados entre los bloques de ácido gulurónico, obteniéndose una estructura conocida como “caja de huevo” (Figura 2). Esto permite la unión de dos cadenas de polímero con lo que se consigue aumentar el peso molecular y el volumen de las moléculas, aumentando por consiguiente la viscosidad. Para que esto suceda, los alginatos deben poseer una cantidad suficiente del monómero gulurónico y una cierta proporción de los mismos deben estar en bloque para que se puedan producir uniones intermoleculares mediante el calcio (u otros cationes multivalentes). Estos enlaces dan lugar a la gelificación de la solución.

Un gel de alginato no puede definirse como un sólido o una solución de forma categórica ya que presenta un estado intermedio donde los puntos de unión intermolecular representan el estado sólido.<sup>18-19</sup> Después de la gelificación las moléculas de agua están atrapadas en la matriz del alginato, pero todavía tienen la posibilidad de migrar, esto es de gran importancia en muchas aplicaciones (para encapsular o inmovilizar células). La capacidad del gel para retener agua se debe a fuerzas capilares, los alginatos forman geles térmicamente estables su resistencia es generalmente independiente de la longitud de la cadena, en la medida que la cadena supere una cierta longitud crítica (el grado de

polimerización debe exceder 200 monómeros para lograr una resistencia óptima del gel). La reactividad con el calcio en la formación de geles es una función directa de la longitud promedio de los bloques (G). Los alginatos que poseen grandes fracciones (GG) presentan una fuerte capacidad gelificante.

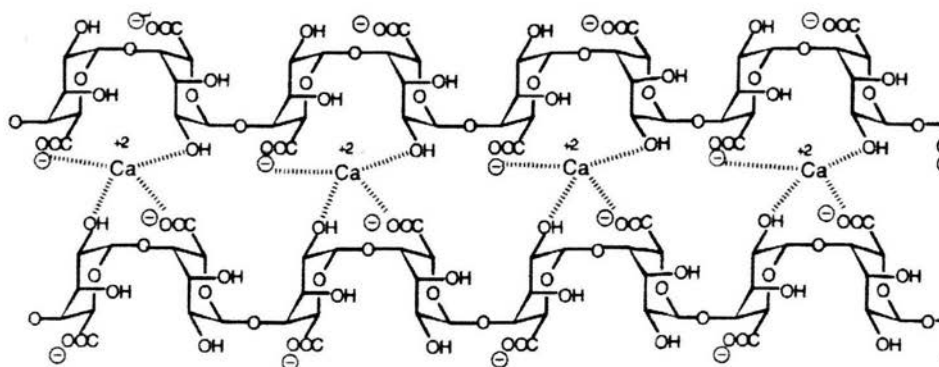


Figura 2. Formación de la estructura en forma de caja de huevo y la ubicación de los iones polivalentes que sirven de enlace de dos moléculas de polímero.

El alginato se encuentra en gran abundancia como parte de la pared celular y como material intracelular en algas cafées. La mayoría de los alginatos usados comercialmente son obtenidos de 3 géneros: *Macrocystis*, *Laminaria* y *Ascophyllum*. El alginato también es producido por dos familias de bacterias heterotróficas, *Pseudomonas* y *Azotobacter*. En contraste con los alginatos producidos por algas, los bacteriales pueden estar acetilados en la posición 2 y/o 3 del residuo M, esta acetilación afecta las propiedades del polímero.<sup>7,10</sup> Como los residuos M prefieren una conformación <sup>4</sup>C<sub>1</sub> mientras que los residuos G prefieren la conformación <sup>1</sup>C<sub>4</sub>, la cantidad relativa y distribución de los residuos G tienen un gran efecto en la estructura y propiedades de los polímeros. Los alginatos algales contienen los tres tipos de bloques, y la cantidad y distribución de cada tipo varía con la especie y con la parte del alga de donde se extraiga.<sup>8</sup> Los alginatos de *Pseudomonas* no contienen bloques G y debido a esto no pueden formar geles iónicos.<sup>10</sup> *Azotobacter vinelandii* produce alginato capsular que contiene mayor cantidad de bloques M y MG.

#### 1.4. Aplicaciones del alginato

Los alginatos son utilizados principalmente como aditivos para gelificar, emulsionar, estabilizar o viscosificar soluciones acuosas, también en el recubrimiento y protección de heridas y en la inmovilización de células y enzimas.<sup>3,17</sup>

No obstante sus aplicaciones, al alginato también se le ha asociado un efecto patógeno cuando es producido por la bacteria *P. aeruginosa* ya que provoca dificultad respiratoria en pacientes con fibrosis quística (CF). La función del alginato es formar una capa para proteger a la *P. aeruginosa* de ataques de anticuerpos, células fagocíticas, medicinas y otros agentes anti-bacterianos.<sup>10</sup> Este efecto incluye: adhesión de mucoide al epitelio traqueal, interferencia en la penetración efectiva de antibióticos contra las bacterias e interferencia con los leucocitos polimorfo nucleares. También incrementa la resistencia a la fagocitosis; suprime los mecanismos de defensa del huésped, afectando las funciones de neutrófilos y linfocitos, e incrementa la capacidad epifítica.<sup>17</sup> Además, el alginato ha sido implicado en los síntomas conocidos como “remojoamiento”, en donde tejidos intracelulares de plantas infectadas comienzan a llenarse de agua.<sup>17</sup>

Generalmente los herbívoros marinos, requieren de mecanismos para liberar y digerir los polisacáridos de almacenamiento y estructurales de las algas. Esto puede ser llevado a cabo por medio de tres mecanismos: 1) rompimiento mecánico, utilizando partes de la boca para romper las algas, para la ingestión; 2) bioquímicos, utilizando un sistema de enzimas para romper el material extracelular ingerido; y 3) microbiano, por bacterias entéricas para romper el material estructural ingerido.<sup>20</sup>

#### 1.5. Enzimas que hidrolizan alginato

Las alginasas también conocidas como liasas de alginato o alginato despolimerasas, hidrolizan el alginato por medio de un mecanismo de eliminación  $\beta$ , provocando la formación de un doble enlace entre C-4 y C-5, la eliminación del enlace glucosídico 4-O y la producción de 4-desoxi- $\alpha$ -L-eritro-hex-4-enepiranosiluronato en el extremo no reductor.<sup>5,6,10</sup>

Las alginasas se diferencian por sus características individuales, por su especificidad por alginatos acetilados o no acetilados y por el tipo de bloque que hidrolizan con mayor facilidad (M o G). Si prefieren alginatos ricos en bloques M, se clasifican como EC 4.2.2.3, poli (M) liasa [(1-4)- $\beta$ -D-manuronan liasa], si prefieren los G, se clasifican como EC 4.2.2.11, poli (G) liasa [(1-4)- $\alpha$ -L-guluronan liasa]. Aunque la mayoría de los organismos producen sólo una alginasa con una especificidad definida, algunos invertebrados marinos y bacterias producen dos o más enzimas y por lo menos una bacteria, *Alteromonas* sp de la cepa H-4 produce una liasa con múltiples especificidades.<sup>5</sup>

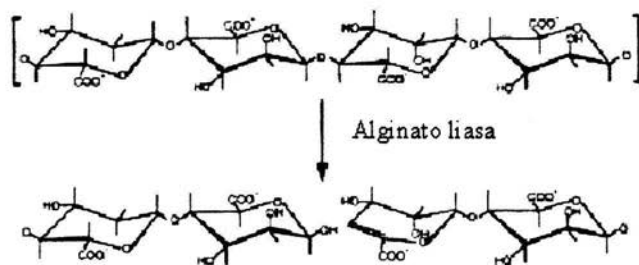


Figura 3. Sitio de división del alginato, polímero ( $\beta$ -D-manuronato) por la alginato liasa.

### 1.6. Descripción del molusco *Astraea undosa*

El gasterópodo marino, *Astraea undosa* (Figura 4), conocido como caracol panocha, es un molusco que habita con el abulón (*Haliotis* spp) en las costas rocosas del Pacífico de Baja California. Su talla máxima es de 10 cm en adultos reproductores. Posee una sola gónada, cuya forma es semejante a la de un cono enrollado sobre sí mismo a manera de espiral; a lo largo de éste, el tejido gonádico se mantiene en contacto íntimo con el hepatopáncreas o divertículo digestivo, formando el llamado cono hepatogonadal. El tejido gonádico se encuentra ocupando principalmente la parte exterior de la espira, y su volumen

está en relación con el grado de madurez del organismo; el hepatopáncreas se localiza en la porción ventral de la propia espira.

En esta especie hay diferenciación sexual; la diferencia gonadal entre hembras y machos es muy evidente en la etapa adulta; la gónada de las hembras es de color verde musgo, en tanto que la de los machos es de color crema. Sin embargo, en organismos recién desovados no se puede diferenciar.<sup>21-22</sup>



- Reino: Animalia
- Phylum: Mollusca
- Clase: Gastropoda
- Orden: Archaeogastropoda
- Superfamilia: Trochacea
- Familia: Atracinae
- Género: *Astraea*
- Especie: *A. undosa*

Figura 4. Clasificación sistemática del molusco *Astraea undosa*.



## 2. ANTECEDENTES

Las alginasas, se han estudiado menos que otras glicohidrolasa, como las celulasas y a la fecha, existen muy pocos reportes sobre su purificación. La actividad alginolítica de estas enzimas se ha reportado en extractos obtenidos de varias especies de algas cafés, incluyendo a *Laminaria digitana*, *Pelvetia canaliculata* y *Undaria pinnatifida*. Esta actividad también se ha detectado en el estilete cristalino de los moluscos marinos *Chromytilus meridionalis* y *Perna perna*<sup>4</sup>. También se han aislado de una variedad de bacterias incluyendo las marinas, *Bacillus circulans*, *Sphingomonas* sp, *Klebsiella* sp, y *Pseudomonas* sp.<sup>4,7,23-25</sup>

Estas enzimas pueden ser aisladas de algas marinas, moluscos, microorganismos y bacterias. Sin embargo, a pesar que se han identificado en numerosas fuentes, sólo se han caracterizado unas cuantas, ninguna de ellas de invertebrados marinos. Lo poco que se ha estudiado de ellas, el que a la fecha no existan estudios físicoquímicos y estructurales para alginasas de invertebrados marinos, la actividad que presentan – varias veces mayor a la reportada para alginasas de otras fuentes – y la aplicación tan amplia que tienen tanto en medicina como en biotecnología hacen que su estudio sea de gran importancia.

En 1999, se reportó la primera estructura cristalina de una alginasa proveniente de *Sphingomonas* sp.<sup>10</sup> 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.

En la Figura 5 (A) se observa el modelo de cinta de la alginasa A1-III, la cual esta compuesta por 12 hélices  $\alpha$  que forman una estructura de barril, obteniendo un tipo de túnel profundo que puede ser considerado el sitio activo de la enzima, esta enzima degrada principalmente los bloques de ácido manurónico del alginato. En la estructura de esta alginasa se observa que está constituida por 12 hélices  $\alpha$ , dos iones sulfato y dos puentes disulfuro (Cys49-Cys112 y Cys188-Cys189).<sup>10</sup>

En la Figura 5 (B) se observa la estructura terciaria de una alginasa extraída de bacterias *Alteromonas* sp, la determinación de esta estructura se obtuvo por refracción de rayos X en el año de 2002. En el año 2003 se determinó por refracción de rayos X la

estructura de otra alginasa (Figura 5 C), la cual se extrajo de *Corinobacterium* sp, esta alginasa degrada principalmente los bloques de ácido galurónico. Y en el año 2004 se determinó la estructura de otra alginasa (Figura 5 D), la cual extrajeron de la bacteria *Pseudomona aeruginosa*.

Es de gran interés, como estas alginasas tienen diferencias estructurales, las cuales se relacionan con la actividad catalítica, y con el tipo de residuo (manurónico o galurónico) del alginato que degradan con mayor facilidad.

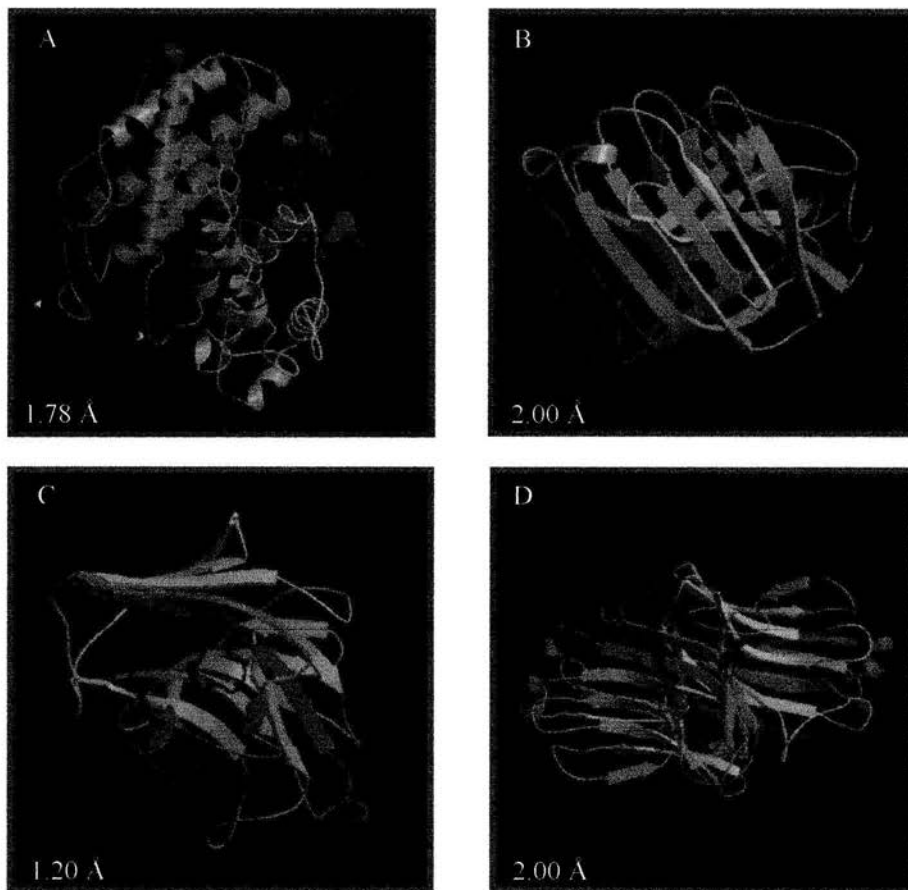


Figura 5. Estructura tridimensional de las alginasas que se han purificado de diferentes bacterias, observándose en cada recuadro la resolución con que se obtuvieron en la refracción de rayos X.

### 3. OBJETIVO GENERAL

Purificar y caracterizar fisicoquímica y estructuralmente las alginasas presentes en el hepatopáncreas de *Astraea undosa*.

#### 3.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Diseñar una técnica apropiada para purificar a las alginasas de *A. undosa* sin la pérdida de actividad, principal problema por el cuál no se han podido caracterizar alginasas de invertebrados.
- b) Utilizar la propiedades gelificantes del ácido algínico en presencia de cationes divalentes para formar una matriz de unión y caracterizarla por técnicas de microscopia de fuerza atómica
- c) Purificar las alginasas extraídas del hepatopáncreas de *Astraea undosa*
- d) Caracterizar bioquímicamente a las alginasas purificadas, esto es, determinar peso molecular, punto isoelectrico, estabilidad a diferentes temperaturas y valores de pH, especificidad por el sustrato.
- e) Determinar la estructura secundaria de las alginasas utilizando la técnica de dicroísmo circular.
- f) Realizar estudios de comportamiento de las enzimas en solución por técnicas de dispersión dinámica de luz.
- g) Determinar las condiciones óptimas de cristalización de las alginasas, para futuros estudios cristalográficos.

#### 4. HIPÓTESIS

En vista que no existen reportes para la obtención de alginasas con alto grado de pureza, a partir de tejidos de invertebrados marinos, debido a que estas pierden su actividad al extraerse del organismo y purificarse; por lo que solo se reportan de extractos crudos o parcialmente purificadas. Por lo que para el desarrollo de este proyecto partimos de dos hipótesis:

- a) Las glicohidrolasas de origen marino se podrán purificar con alto grado de homogeneidad si es posible utilizar a su sustrato como matriz de unión a modo de una cromatografía de afinidad, que nos permitirá mantenerlas estables y activas.
- b) Al conocer sus propiedades fisicoquímicas y estructurales podremos conocer más acerca de los mecanismos de acción y de las relaciones estructura-función

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Extracción de glicohidrolasas

Para evitar la desnaturalización de las proteínas, las etapas de purificación se realizaron generalmente a 4 °C. Se homogenizó el hepatopáncreas de *Astraea undosa* utilizando un homogenizador de tejidos Polytron PT-MR 2100 con amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8, sorbitol 100 mM. Una vez homogenizado se centrifugó a 22000 g (12,000 rpm) durante 30 min en una centrifuga BECKMAN refrigerada Modelo J2-21 y se retiró el tejido. El sobrenadante se congeló a -25 °C hasta su utilización.

### 5.2. Determinación de la actividad alginolítica

Para la determinación de la actividad alginolítica se empleó el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) el cual se basa en la reacción de los azúcares reductores con el ácido 3,5-dinitrosalicílico, que lo reducen a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico en un medio alcalino (Figura 6). Esta reacción da lugar a un cambio de coloración de amarillo a rojo-café. Debido a que el oxígeno puede interferir con la oxidación de la glucosa, se adiciona el metabisulfito de sodio, el cual no interfiere con la reacción que produce el color, pero absorbe el oxígeno disuelto.<sup>26</sup>

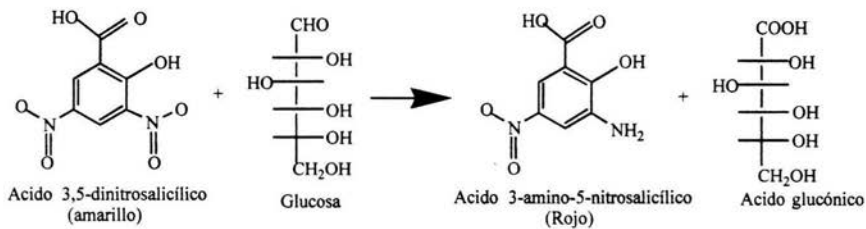


Figura 6. Reacción del ácido 3,5-dinitrosalicílico con un azúcar reductor.

El reactivo de DNS se preparó disolviendo 3.53 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, y 6.6 g de NaOH en 472 mL de agua destilada. Posteriormente se adicionó 102 g de tartrato de sodio y potasio, 2.53 mL de fenol (fundido en baño maría), 2.76 g de metabisulfito de sodio y se mezcló perfectamente.

Para determinar la actividad alginolítica se utilizó el alginato de sodio como sustrato (alginato de sodio 0.5 % en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8, sorbitol 100 mM). En la mezcla de reacción se colocaron 500  $\mu$ L del sustrato, 50  $\mu$ L de enzima y 450  $\mu$ L del amortiguador, se incubó por 90 min a 45 °C. Posteriormente se adicionaron 1000  $\mu$ L del reactivo de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) y se llevó a ebullición por 10 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se leyó la absorbencia a 550 nm.

Una unidad de actividad (U) se define como los  $\mu$ M de ácido D-Glucurónico hidrolizados por hora a 45 °C. La actividad específica se define como la actividad entre la concentración de proteína en la muestra (U/mg).

### 5.3. Cuantificación de la enzima purificada

Se utilizó el método del ácido bicinconínico (BCA) Smith *et al.*<sup>27</sup>, el cual emplea el reactivo BCA (BCA-200 23226 de PIERCE), que es sensible a la concentración de proteína en soluciones acuosas. Este sistema de reactivos A (amortiguador de carbonatos conteniendo BCA y tartrato de sodio, en NaOH 0.1 M) y B (solución de sulfato de cobre) es estable y compatible con detergentes iónicos y no iónicos y combina la reacción de proteínas con  $\text{Cu}^{+2}$ , en un medio alcalino dando lugar a la liberación de  $\text{Cu}^{+1}$  que reacciona con el ácido bicinconínico (Figura 7). El color púrpura del producto de la reacción es formado por la interacción de dos moléculas de BCA con un ión cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ), que es soluble en agua y exhibe un máximo de absorbencia a 562 nm.

La cantidad de proteína contenida en la muestra se determinó interpolando el valor de absorbencia en una curva de calibración elaborada con albúmina de suero de bovino a diferentes concentraciones.

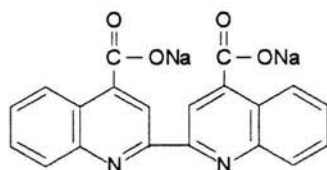


Figura 7. Estructura del ácido bicinconínico

#### 5.4. Curva de calibración

La construcción de la curva de calibración (Figura 8) y el análisis de las muestras se siguió el protocolo sugerido por el proveedor.

Se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de cada estándar en tubos de ensayo, utilizando 50  $\mu\text{L}$  del diluyente como blanco. A cada tubo se adicionó 1 mL del reactivo de trabajo, que se prepara mezclando 50 partes del reactivo A (amortiguador de carbonatos conteniendo ABC y tartrato de sodio, en NaOH 0.1 M), con una parte del reactivo B (solución de sulfato de cobre). Se incubó por 30 min a 60°C, se deja enfriar y se mide la absorbencia a 562 nm. Este método permite determinar concentraciones de proteína en un intervalo de 5 a 250  $\mu\text{g/mL}$

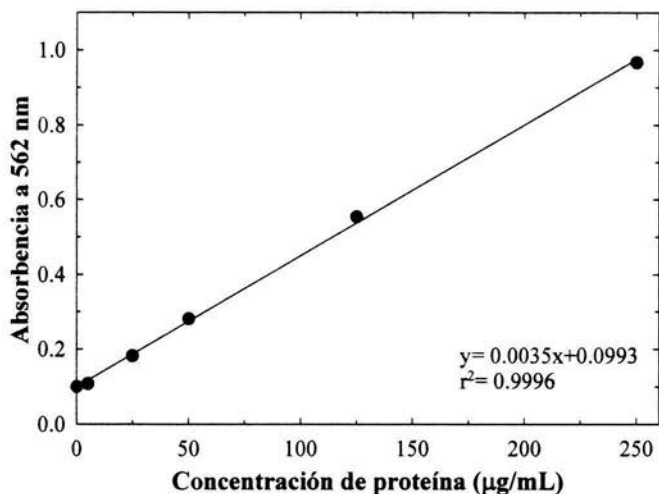


Figura 8. Curva de calibración de proteína utilizando el método del BCA a 60 °C y albúmina de suero de bovino como estándar.

## 5.5. Preparación de las perlas insolubles de alginato

Para la purificación de las alginasas de *Astraea undosa*, se diseñó una técnica en la que se emplea al sustrato como soporte. Para lo cual se prepararon perlas insolubles de alginato, haciendo uso de su propiedad para gelificar en presencia de calcio.<sup>28-30</sup> Se utilizaron amortiguadores de Tris-HCl 50 mM pH 8, con distintas concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  (5 mM, 10 mM, 30 mM, 50 mM, 70 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM y 500mM). A estos amortiguadores se les agregó por goteo una solución de alginato de sodio de alta viscosidad (14,000 cps) (SIGMA) al 2 % preparada en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8, con el fin de obtener las perlas de alginato con la mejor consistencia y ser utilizadas para la purificación de las alginasas. Una vez formadas las perlas, estas se lavan con el amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8 para eliminar el exceso de calcio.

## 5.6. Estudio de microscopía de fuerza atómica de las perlas de alginato

La microscopía de fuerza atómica (AFM) es una herramienta muy poderosa capaz de proveer datos topométricos, además de que permite la observación y la cuantificación de las superficies en escalas submicrométricas.<sup>31-35</sup> Una barra que contiene una punta (Figura 9) es puesta en contacto con la superficie de la muestra, la fuerza de repulsión iónica que ejerce la superficie sobre la punta inclina la barra hacia arriba, el grado de inclinación en la barra es medido con un láser el cual es refractado en la hendidura de un fotodetector, y esto es registrado como la topografía de la superficie.

En la microscopía de fuerza atómica, una punta afilada (normalmente con un radio de 10 nm), que esta localizada cerca del final de una pieza metálica, se desliza a través de la superficie de la muestra usando un escáner piezoeléctrico. Los cambios en la interacción punta-muestra son seguidos utilizando un sistema de detección óptico, en el cual un rayo láser transmitido es reflejado en la pieza metálica y llega a un fotodiodo sensitivo a la posición. Durante el barrido un parámetro de operación particular se mantiene en un nivel constante y las imágenes son generadas a través de un giro de retroalimentación entre el sistema de detección óptica y el escáner piezoeléctrico. El movimiento relativo de la punta sobre la muestra es usado para generar imágenes topográficas de la superficie.



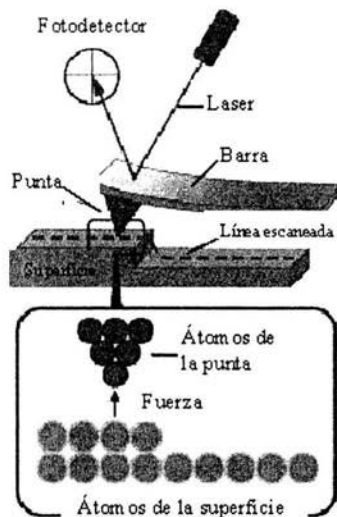


Figura 9. Mecanismo mediante el cual la punta recorre la superficie de la muestra, y donde la barra metálica refleja el rayo láser, el cual es registrado en el fotodetector.

Una vez formadas las perlas de alginato con las diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ , se analizó su superficie por medio de la técnica de microscopía de fuerza atómica, para esto se montaron películas de alginato con las diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  en un microscopio Nanoscope-IIIa. Las áreas analizadas fueron de 100, 50, 5 y 1  $\mu\text{m}$ .

### 5.7. Pruebas de unión de alginasas de diferente fuente a las perlas de alginato

Una vez caracterizadas las perlas, se estudió la unión de alginasas de invertebrados marinos a dichas perlas. Para esto se eligieron 2 organismos: *Haliotis rufescens* (abulón rojo) y *Astraea undosa* (caracol panocha). Se eligieron estos organismos porque habíamos encontrado que las alginasas de estas fuentes sufrían fuertes fenómenos de agregación una vez que se extraían del organismo por lo que no se podían purificar sin perder la actividad. Se trabajó con las perlas obtenidas a diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  con el fin de determinar cuál era la más apropiada para evitar los agregados y purificar este tipo de enzimas.

Se incubaron por separado los extractos de ambos moluscos con perlas en presencia del amortiguador Tris por 6 h a 4 °C. Posteriormente se lavaron las perlas con el mismo amortiguador para eliminar las proteínas no unidas. Para eluir las proteínas que se unieron a las perlas se utilizó NaCl a concentraciones de 0, 0.5, 1.0 y 3.0 M en el mismo amortiguador. Se realizaron 3 lavados de cada molaridad. Este procedimiento se realizó con los dos extractos unidos a las perlas con las diferentes concentraciones de CaCl<sub>2</sub>. Se cuantificó la proteína y se midió la actividad de cada uno de los lavados.

### **5.8. Puificación de las alginasa de *Astraea undosa*.**

Una vez analizadas las diferentes perlas se eligieron las de 100 mM de CaCl<sub>2</sub> para la puificación de las alginasas de *A. undosa* (ver resultados) siguiendo los mismos pasos ya citados en el punto anterior.

### **5.9. Caracterización de las enzimas puificadas**

#### **5.9.1. Determinación del peso molecular**

El peso molecular de las enzimas puras se determinó por electroforesis en microgeles homogéneos de SDS-poliacrilamida al 12.5 %, siguiendo el protocolo de PHARMACIA. Para obtener la curva de calibración se emplearon patrones con masas moleculares conocidas desde 14,400 hasta 94,000 daltones (Pharmacia electrophoresis calibration kit). El procedimiento para fijar, teñir y desteñir fue el reportado por Neuhoff *et al.*<sup>36</sup>

#### **5.9.2. Determinación del punto isoeléctrico**

Se utilizaron geles de poliacrilamida (0.35 x 0.43 x 50 mm) con gradiente de pH de 3-9 en un equipo de electroforesis Phast System de PHARMACIA. Para obtener la curva patrón se emplearon patrones con puntos isoeléctricos conocidos de 3-9 (Pharmacia electrophoresis calibration kit).

### 5.9.3. Determinación de los valores óptimos de pH y temperatura

Para determinar el pH óptimo de actividad de las alginasas purificadas, se construyó una curva de actividad a diferentes valores de pH (3.0-11.0 con intervalos de 0.5 de unidad), utilizando los amortiguadores glicina-HCl 50 mM (pH 3.0 y 3.5), acetatos 50 mM (pH 4.0, 4.5, 5.0 y 5.5), fosfatos 50 mM (pH 6.0, 6.5, 7.0 y 7.5), Tris HCl 50 mM (pH 8.0 y 8.5), glicina-NaOH 50 mM (pH 9.0, 9.5, 10.0 y 10.5), fosfatos-NaOH 50 mM (pH 11.0). Después se realizó una curva de actividad *versus* temperatura a los valores de pH óptimos.

### 5.9.4. Determinación de la estructura secundaria

La estructura secundaria de las dos alginasas se determinó por sus espectros de dicroísmo circular (CD) en la región del ultravioleta lejano (184-260 nm).

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. 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<sup>37</sup>. 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 de la luz. Estos fenómenos provocan una rotación del plano de polarización en un ángulo  $\alpha$  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, pudiéndose obtener un espectro de la rotación o elipticidad contra la longitud de onda ( $\lambda$ ).<sup>37</sup>

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 extremadamente sensibles a los cambios en la misma.<sup>37</sup>

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).<sup>37</sup>

El análisis del espectro de dicroísmo circular de una proteína cualquiera consiste en encontrar la combinación lineal de los 5 espectros base que logra reproducir el perfil de la mejor manera posible del espectro experimental. Una vez logrado esto y considerando que las señales son aditivas, se suma el producto del contenido de cada estructura secundaria de los espectros base por su coeficiente en la combinación lineal. Los resultados de esta adición representan la estimación experimental de los porcentajes de los residuos en cada una de las estructuras secundarias de la conformación de la proteína problema<sup>37</sup>. Para realizar este análisis, Hennessey y Johnson utilizaron como base de datos, los espectros de un conjunto de proteínas cuya estructura tridimensional era conocida y determinada. A partir de estos espectros, se demostró que basta la combinación lineal de 5 espectros base, para describir perfectamente los espectros experimentales. Además, se determinó que a cada uno de los 5 espectros base puede asignársele un contenido de estructura secundaria (Figura 10).

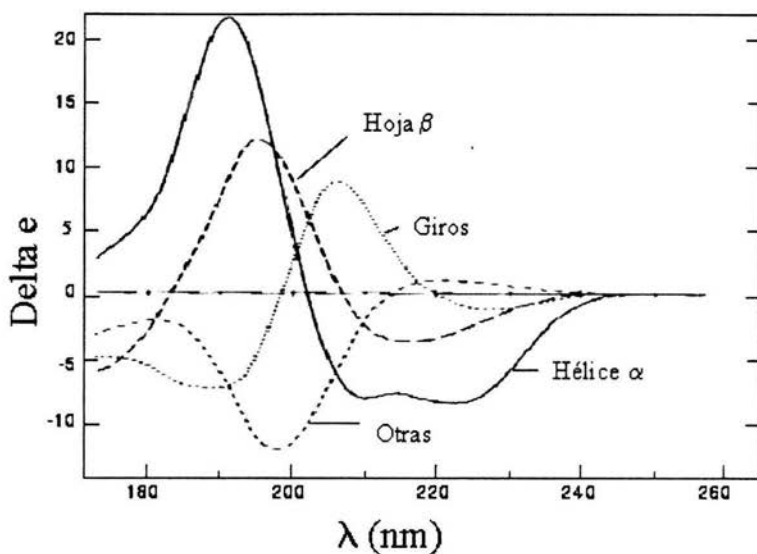


Figura 10. Espectros característicos de cada una de las contribuciones a la estructura secundaria, hélice alfa, hoja beta, giros y al azar.

La estructura secundaria de las glicohidrolasas puras se determinó por sus espectros de dicroísmo circular (CD). Dichos espectros se obtuvieron a 18 °C en un espectropolarímetro JASCO J-700, el cual se calibró con ácido (+)-10-canforsulfónico.<sup>38</sup> Los experimentos se realizaron en una celda de 1 mm para la región del ultravioleta (UV) lejano (184-260 nm). Los espectros se analizaron por medio de diferentes programas de desconvolución, esto con el fin de estimar el contenido de estructura secundaria de las enzimas purificadas. Cada muestra se analizó por triplicado.

### 5.9.5. Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz (DLS) es una técnica que permite medir el coeficiente de difusión traslacional ( $D_T$ ) de una molécula o agregados en solución. Con técnicas de DLS es posible determinar el coeficiente de difusión, el radio hidrodinámico, el peso molecular y la polidispersidad de la proteína.

Las partículas en solución se desplazan debido a que presentan movimientos brownianos. Esta movilidad está relacionada con el coeficiente de difusión y éste con el radio de la partícula. Iluminando la partícula con un rayo láser, la intensidad de la luz dispersada a un ángulo dado puede ser seguida en el tiempo. Como la partícula se mueve, la señal medida fluctuará. Midiendo las fluctuaciones y el camino en el cual ellas cambian, el coeficiente de difusión de las partículas y a partir de éste, el radio de la partícula pueden ser determinados con la ecuación de Stokes-Einstein. La dispersión de luz monocromática causada por las partículas en movimiento presentará fluctuaciones en su intensidad debido al movimiento browniano de las moléculas o agregados en solución.<sup>38</sup>

El análisis del decaimiento de la función de autocorrelación, es decir la medición de las fluctuaciones de la intensidad en función del tiempo correspondiente a la señal de la intensidad dispersada, proporcionará información cuantitativa acerca del comportamiento en solución de los agregados moleculares.  $D_T$  se relaciona con el radio hidrodinámico ( $R_H$ ), a través de la ecuación de Stokes-Einstein:  $D_T = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_H}$ , donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $\eta$  es la viscosidad de la solución,  $T$  es la temperatura absoluta y  $R_H$  el radio hidrodinámico.<sup>39-41</sup>

También es posible determinar el peso molecular por medio de la ecuación de Mark Houwink:  $D_T = A_0 M^u$ . Ésta considera la relación directamente proporcional del coeficiente de difusión traslacional con el peso molecular  $M$ , elevado a una potencia específica. Así, la constante de proporcionalidad que surge de esta ecuación toma en cuenta las propiedades del disolvente y se representa por  $A_0$ . Esta ecuación requiere de una estimación adecuada del factor de estructura ( $u$ ), que para el caso particular de proteínas esféricas tiene un valor de 0.33 y se aplica también a modelos cuasi-esféricos.<sup>41</sup>

Se pueden analizar los cambios en polidispersidad y en el peso molecular con respecto a factores como son pH, temperatura, concentración de la proteína y presencia de diferentes aditivos.

En este estudio se evaluó el comportamiento de las alginasas puras, con el fin de caracterizar su comportamiento en solución, analizando los cambios en polidispersidad y en el peso molecular con respecto a la temperatura. Para este tipo de estudios se utilizó un equipo de dispersión dinámica de luz DynaPro-801 (PROTEIN SOLUTION, Co.) y el paquete

computacional Dynamics, versión 5.0 (PROTEIN SOLUTION, Co.). Cada una de las enzimas puras (300 µL), se inyectaron a través de filtros Anotop 10 de 0.2 µm (Wathman) en el equipo mencionado.

### 5.9.6. Efectos de diferentes aditivos sobre la actividad de las alginasas purificadas

Se evaluó el efecto de diferentes aditivos sobre la actividad de las alginasas puras. En la Tabla 1 se muestran los aditivos estudiados. La actividad se midió cuantificando la cantidad de azúcares reductores liberados, después de dejar incubar la enzima con el aditivo correspondiente.

Tabla 1. Aditivos específicos utilizados para estudiar su efecto en la actividad de las alginasas purificadas.

Aditivos	Concentración*	Aditivos	Concentración*
Blanco		manitol	0.1 %
CaCl <sub>2</sub>	5 mM	PEG	0.1 %
MnCl <sub>2</sub>	5 mM	trealosa	0.1 %
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	FeSO <sub>4</sub>	5 mM
ZnCl <sub>2</sub>	5 mM	HgSO <sub>4</sub>	5 mM
CuSO <sub>4</sub>	10 mM	LiCl	5 mM
EDTA	5 mM	BaCl <sub>2</sub>	5 mM
DTT	0.01 mM	AlCl <sub>3</sub>	5 mM
sorbitol	0.1 %		

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

### 5.9.7. Especificidad

Para determinar la especificidad de las alginasas purificadas, se emplearon dos tipos de alginatos; uno rico en bloques gularónicos y otro rico en bloques manurónicos (SIGMA). Las pruebas de actividad se realizaron como se mencionó anteriormente, modificando el tipo de sustrato.

### 5.9.8. Cristalización de las glicohidrolasas

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

Para inducir la cristalización es necesario llevar muy lentamente el sistema soluto-solvente a un estado de solubilidad mínima y así alcanzar un grado limitado de sobresaturación.<sup>42</sup> Para lograr esto es necesario considerar todas las variables que afectan la cristalización como son: concentración de proteína, temperatura, pH, fuerza iónica, presencia de aditivos específicos (ver tabla 1) y de agentes precipitantes. Estos últimos pueden ser de tres tipos, 1) sales como el sulfato de amonio, 2) precipitantes orgánicos de volatilidad baja como el 2-metil-2, 4-pentanodiol (MPD) y 3) polietilenglicol de diferentes pesos moleculares.

El método de difusión de vapor es el más popular y ha demostrado ser el más útil para el estudio de numerosas condiciones con cantidades mínimas de proteína. Existen dos técnicas que utilizan la difusión de vapor: la de la “gota asentada” y la de la “gota suspendida” (Figura 11). Esta última fue la que se empleó para intentar la cristalización de las alginasas. Con este método, la solución de proteína y el agente precipitante se colocan en cubreobjetos siliconizados. Por otro lado, a un pozo o recipiente pequeño (generalmente se usan cajas Limbro) se agrega 1 mL de la solución de agente precipitante a una concentración del doble de la que se encuentra en la solución de la proteína y se le aplica grasa de vacío en la parte superior del pozo. El cubreobjetos se coloca arriba del pozo, de



tal forma que la gota de proteína queda suspendida en el interior y finalmente se sella con la grasa. Al llegar a un equilibrio de presiones de vapor, la solución conteniendo a la proteína tiende a alcanzar un grado limitado de sobresaturación.<sup>43</sup> Estas condiciones pueden modificarse a fin de optimizarlas y lograr obtener cristales apropiados para los estudios de difracción de rayos X.

Las pruebas de cristalización de las diferentes glicohidrolasas se montaron utilizando una concentración de proteína de 2.55 mg/mL para Alg I y 1.784 mg/mL para Alg II. Se colocaron gotas de 10  $\mu$ L de los cuales 5  $\mu$ L correspondían a la proteína y 5  $\mu$ L al agente precipitante. Además, sólo se colocaron 300 mL del agente precipitante en el receptáculo inferior, con el fin de aumentar el tiempo para que se alcance la saturación. Estas pruebas se colocaron a 4 °C, en cámaras de temperatura controlada.



Figura 11. Método de difusión de vapor en gota colgante para cristalizar proteínas.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio de las alginasas de invertebrados ha sido un campo poco estudiado, debido a la problemática que se presenta en su purificación, proceso en el cual pierden la actividad, este fenómeno se observó durante la purificación de las alginasas de *Astraea undosa*, donde las enzimas perdían su actividad al purificarlas utilizando las técnicas cromatográficas convencionales. Debido a esto, se diseñó una técnica de purificación cromatográfica, en la que se utilizó a su sustrato (ácido alginico) como soporte.

### 6.1. Preparación del soporte para la purificación de las alginasas de *Astraea undosa*.

Se prepararon perlas de alginato de sodio con diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  (5, 10, 30, 50, 70, 100, 200, 300 y 500 mM) con un tamaño aproximado de 5 mm (Figura 12) como se mencionó en los métodos.

Con el fin de analizar las características de las perlas formadas se realizaron estudios de microscopía de fuerza atómica. Para esto, se formaron películas de alginato de alta viscosidad al 2.0 %, en presencia de  $\text{CaCl}_2$  en concentraciones de 0, 30, 50, 70, 100, 300 y 500 mM. Las perlas formadas a una concentración de  $\text{CaCl}_2$  de 5 y 10 mM no se estudiaron ya que su consistencia era muy frágil y no servían para ser utilizadas como soporte en una purificación.

En el análisis óptico de la superficie de las películas se observa que a mayor concentración de  $\text{CaCl}_2$  la consistencia de la película es más firme y con una textura menos rugosa (Figura 13). Una solución viscosa de alginato polimeriza en presencia de cationes divalentes, lo cual puede ser explicado por el modelo de la caja de huevo, que explica que cada ión metálico divalente une a dos grupos carboxílicos de las moléculas de alginato colindantes<sup>32</sup> y por ello la estructura del polímero estará ordenada de tal manera que obtendrá una forma menos rugosa. Es por ello que a mayor concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  tendremos un gel más fuerte, liso y con mayor firmeza, como pudimos observarlo en la consistencia de las perlas.

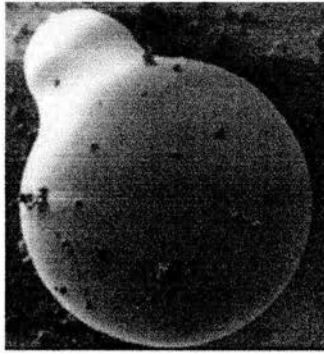


Figura 12. Perla obtenida mediante la interacción del alginato de sodio con  $\text{CaCl}_2$ .

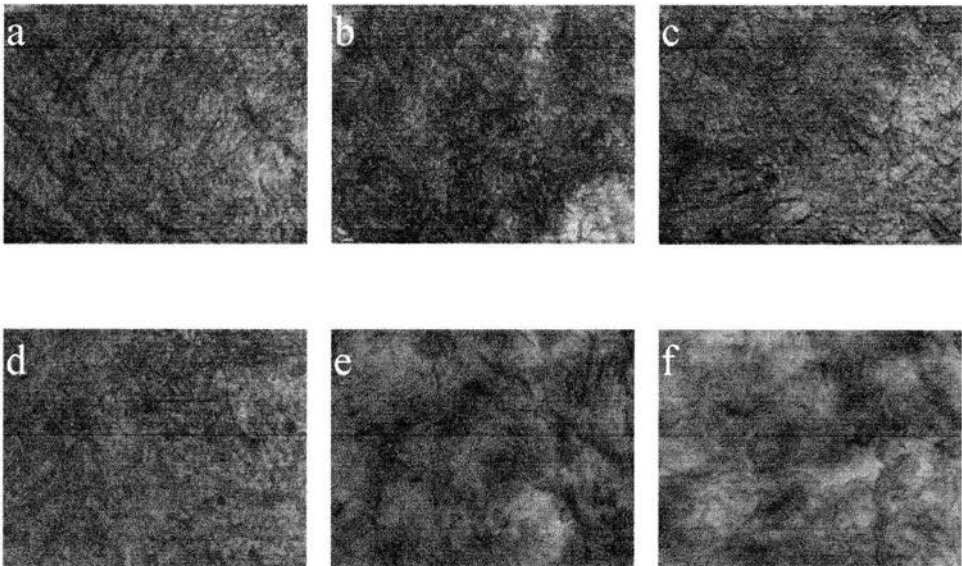


Figura 13. Imágenes ópticas de las películas preparadas con alginato de sodio de alta viscosidad al 2.0 %, con diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ : (a) 30 mM, (b) 50 mM, (c) 70 mM, (d) 100 mM, (e) 300 mM y (f) 500 mM.

## 6.2. Estudios de microscopia de fuerza atómica.

Con esta técnica se estudió la superficie de las películas de alginato de sodio en presencia de diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ . En la figura 14 se muestran las imágenes obtenidas con las películas de alginato de sodio sin calcio, estas presentan una superficie porosa. Al analizar un área de 1 y 5  $\mu\text{m}$ , se observan dos superficies con consistencia diferente, que pueden apreciarse por la diferencia de color. Estas corresponden a los bloques de ácido gulurónico y manurónico presentes en el alginato (Figura 14 c y d).

En las películas formadas en presencia de calcio se observa que presentan porosidades, cuyo diámetro y altura varía con la concentración de  $\text{CaCl}_2$  utilizado. Las películas en las cuales la concentración de  $\text{CaCl}_2$  es alta, presentaron una superficie menos porosa que las de concentraciones bajas (Figuras 15, 16 y 17). Además se observa que conforme aumenta la concentración de  $\text{CaCl}_2$ , la consistencia es más dura y menos rugosa. A bajas concentraciones del  $\text{CaCl}_2$ , la consistencia es más frágil, porosa y rugosa. La porosidad presente en este tipo de películas puede permitir el paso de sustancias hacia el interior de ellas

A la fecha se han descrito propiedades importantes de este tipo de geles, tal es el caso de la fuerza mecánica, porosidad, uniformidad de gel, biocompatibilidad e influencia sobre células encapsuladas, estas propiedades dependen de la composición del alginato (la relación entre ácido manurónico y gulurónico, la frecuencia y tamaño de los bloques de ácido gulurónico, el peso molecular), la concentración del mismo, el catión presente y del tiempo de gelificación.<sup>44</sup>

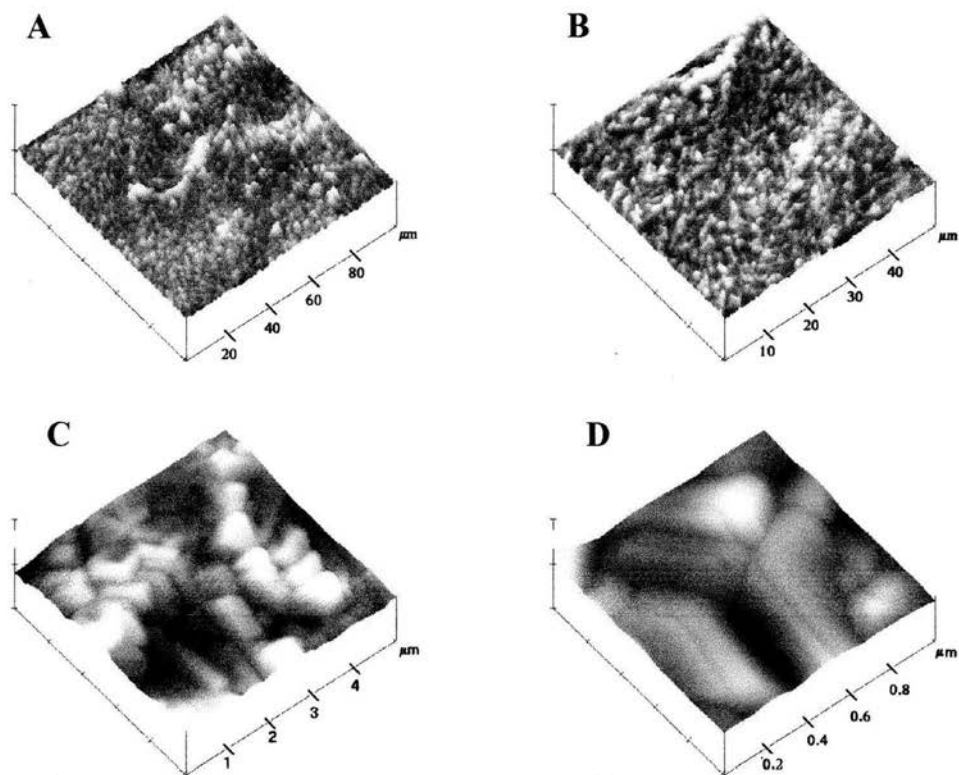


Figura 14. Imágenes de microscopía de fuerza atómica de la película de alginato de sodio al 2.0 %. En un área de: (a) 100  $\mu\text{m}$ , (b) 50  $\mu\text{m}$ , (c) 5  $\mu\text{m}$  y (d) 1  $\mu\text{m}$ .

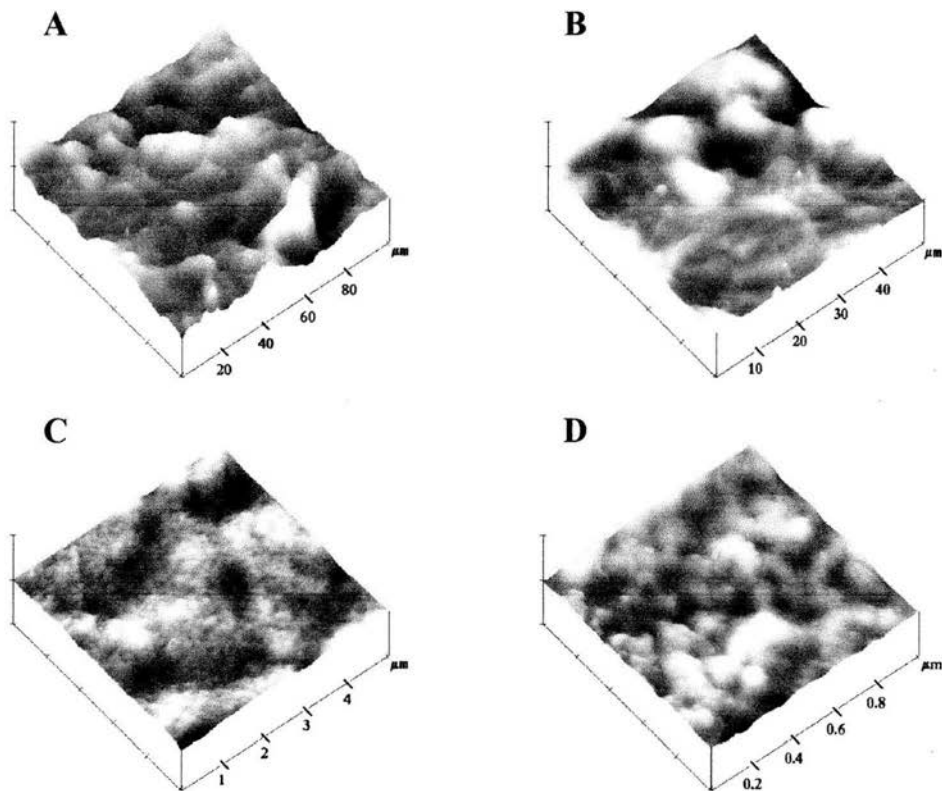


Figura 15. Imágenes de microscopía de fuerza atómica de la película de alginato de sodio al 2.0 % con 30 mM de cloruro de calcio. El área observada fue de: (a) 100  $\mu\text{m}$ , (b) 50  $\mu\text{m}$ , (c) 5  $\mu\text{m}$  y (d) 1  $\mu\text{m}$ .

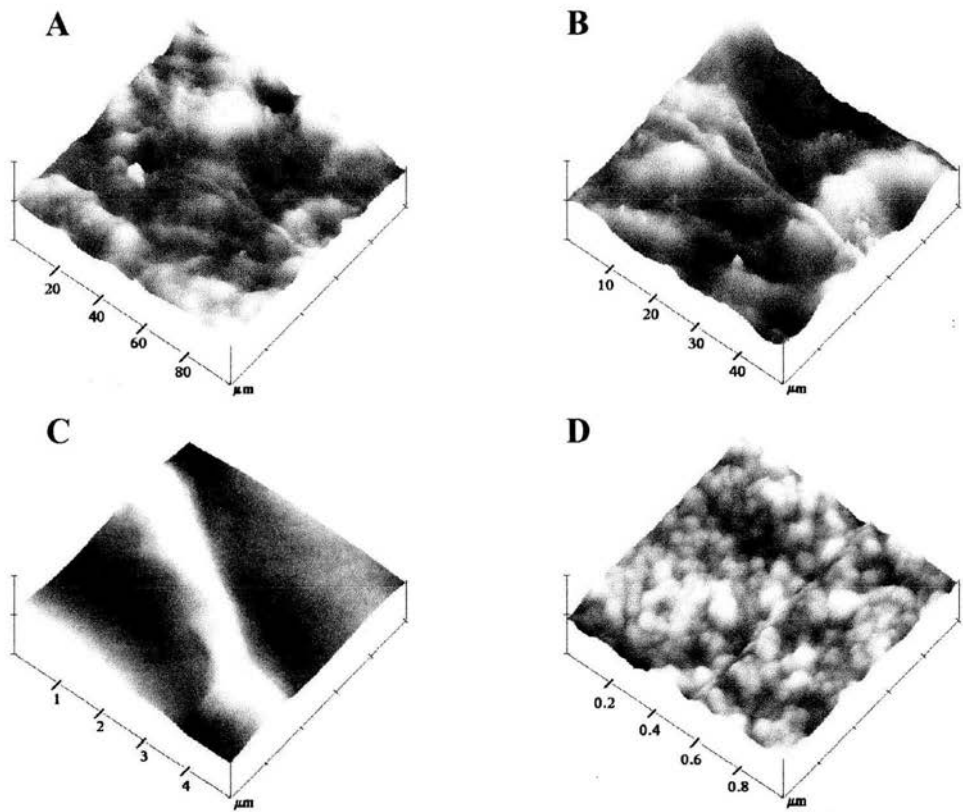


Figura 16. Imágenes de microscopía de fuerza atómica de la película de alginato de sodio al 2.0 % con 100 mM de cloruro de calcio. El área observada fué de: (a) 100  $\mu\text{m}$ , (b) 50  $\mu\text{m}$ , (c) 5  $\mu\text{m}$  y (d) 1  $\mu\text{m}$ .

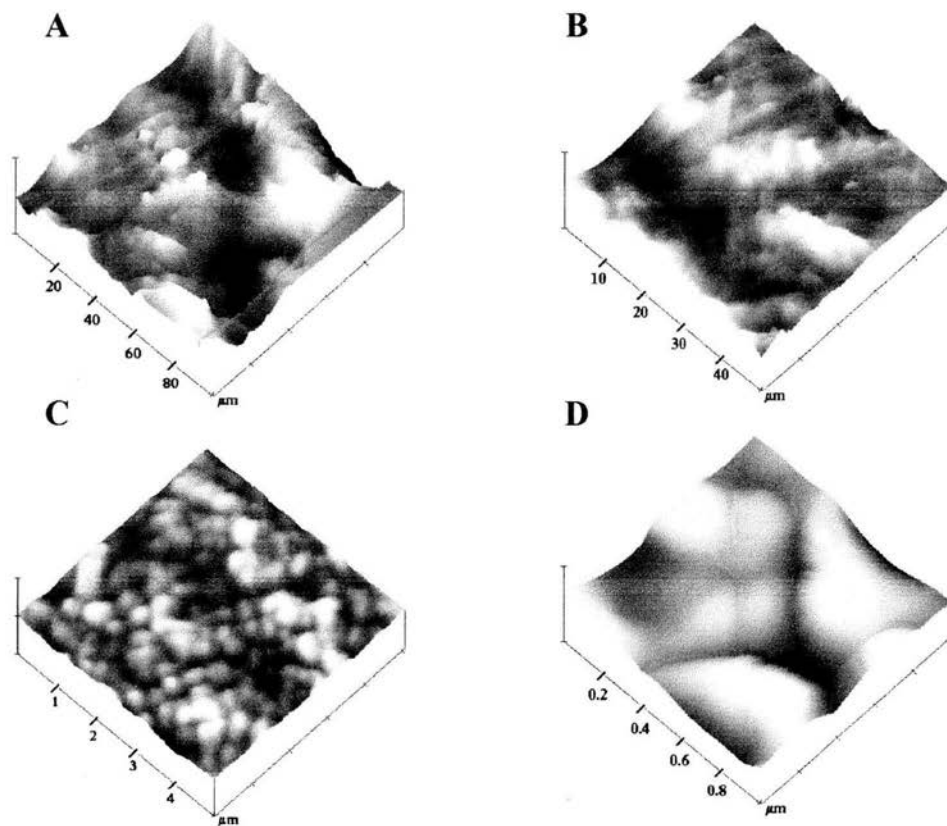


Figura 17. Imágenes de microscopía de fuerza atómica de la película de alginato de sodio al 2.0 % con 300 mM de cloruro de calcio. El área observada fue de: (a) 100  $\mu\text{m}$ , (b) 50  $\mu\text{m}$ , (c) 5  $\mu\text{m}$  y (d) 1  $\mu\text{m}$ .



Una vez preparadas y analizadas las perlas de alginato, éstas se probaron como soporte en la purificación de las alginasas de diferente fuente. Para dicho estudio se trabajó con el homogenizado del hepatopáncreas de dos especies de moluscos, *Astraea undosa* (caracol panocha) y *Haliotis rufescens* (abulón rojo) como se mencionó en los métodos.

Las perlas obtenidas con concentraciones de 5 y 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  se disolvieron con los primeros lavados con el amortiguador, sin poder probar con el extracto, por lo que se continuó el estudio con las perlas de 30 a 500 mM de  $\text{CaCl}_2$ .

Una vez adicionado el extracto a las perlas, observamos que en las concentraciones de 30, 50 y 70 mM de  $\text{CaCl}_2$ , estas se disolvían con los primeros lavados, esto debido a su consistencia no muy fuerte y la gran porosidad que presentaban, que permitía que las alginasas penetraran y pudiera hidrolizar de manera muy eficiente a la perla, por lo que no fueron apropiadas para ser utilizadas como soporte ya que no se lograba eluir a la proteína antes de que se solubilizara la perla, por lo que la proteína no sólo no se separaba sino que se contaminaba con el alginato. A diferencia de las perlas formadas con concentraciones bajas de  $\text{CaCl}_2$ , las de mayor concentración (100, 200, 300 y 500) fueron lo suficientemente fuertes para servir como soporte en la purificación.

En la Figura 18 se presenta la absorbencia a 280 nm de cada una de las fracciones eluidas de las perlas cuando se aplicó el extracto de *H. rufescens*, se observa una mayor unión a las perlas preparadas con 100 y 300 mM de  $\text{CaCl}_2$  en donde la proteína unida pudo eluirse con 0.5 y 1.0 M de NaCl. Un comportamiento similar ocurre con el extracto de *A. undosa* (Figura 19), donde las perlas preparadas con 100 y 300 mM de  $\text{CaCl}_2$  dieron los mejores resultados.

En las Tablas 2 a 5 se puede observar el resumen de la purificación de las alginasas de *H. rufescens* utilizando las perlas de alginato a diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ . Las perlas que funcionaron mejor como soporte según la actividad específica y la purificación de las alginasas fueron las preparadas con 300 mM de  $\text{CaCl}_2$ . La actividad específica más alta se obtiene en las fracciones eluidas con 0.5 y 1M de NaCl. La fracción obtenida lavando con 1M de NaCl mostró una sola banda en geles de poliacrilamida SDS-page comprobando así su pureza.

En las tablas 6-9 se presenta la purificación de las alginasas de *A. undosa*. En estas se puede observar que los mejores resultados se obtuvieron con las perlas preparadas con

100, 200 y 300 mM de  $\text{CaCl}_2$ . La proteína se eluye casi por completo con 0.5 y 1 M de NaCl. Las fracciones obtenidas con 1M de NaCl, mostraron una sola banda en geles SDS-PAGE, por lo que se alcanzó un alto grado de pureza, mientras que en las fracciones de 0.5 M se observaron varias bandas en los geles, indicando que en ese lavado no se obtenía pura a la enzima. Cabe señalar que se observó que quedaba proteína con actividad alginolítica unida a las perlas, la cual no se había logrado despegar con los diferentes lavados, sin embargo esta pudo separarse al inhibir la actividad de la enzima con  $\text{Cu}^{+2}$ . Esta inhibición es reversible por lo que después de agregarle EDTA se recupera su actividad. Esta enzima mostró una banda en geles de SDS-PAGE y mostró ser diferente a la eludida con 1M de NaCl.

Observamos que las perlas de alginato de calcio pueden servir como soporte para purificar alginasas de invertebrados con un alto grado de pureza, de una manera sencilla y económica y que además mantiene estables a las enzimas. Este había sido un punto muy difícil de lograr, ya que las alginasas de moluscos se inestabilizan cuando se purifican, perdiendo su actividad en pocas horas por lo que no se habían logrado caracterizar. Con estos resultados decidimos purificar y caracterizar a las alginasas de *A. undosa*.

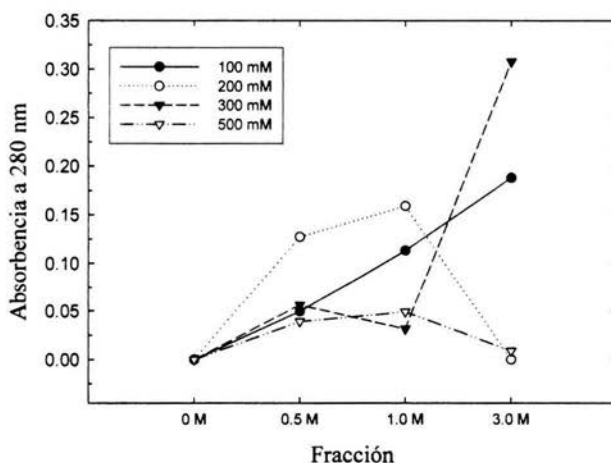


Figura 18. Perfil de elución del extracto de *H. rufescens* de las perlas de alginato formadas con diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ .

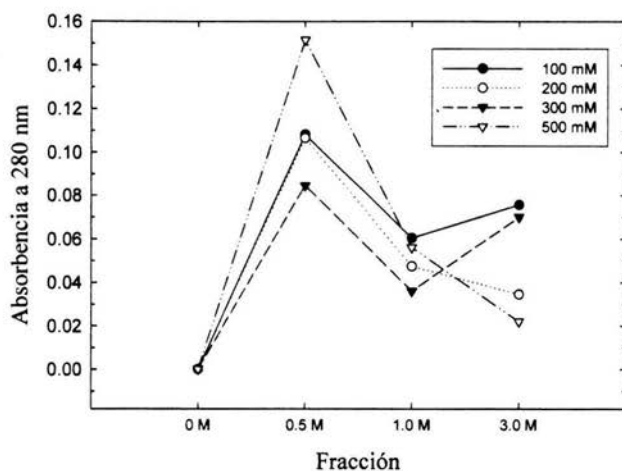


Figura 19. Perfil de elución del extracto de *A. undosa* de las perlas de alginato formadas con diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ .

Tabla 2. Purificación de las alginasas de *H. rufescens*, utilizando perlas de alginato de sodio de alta viscosidad, preparadas con 100 mM de  $\text{CaCl}_2$ .

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Purificación (%)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	6994	11	1	100
0.5 M NaCl	77.23	69.214	6.292	1.104
1.0 M NaCl	176.28	33.001	3	2.52
3.0 M NaCl	293.28	2.955	0.269	4.193

Tabla 3. Purificación de las alginasas de *H. rufescens*, utilizando perlas de alginato de sodio de alta viscosidad, preparadas con 200 mM de CaCl<sub>2</sub>

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Purificación (%)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	6994	11	1	100
0.5 M NaCl	198.12	26.249	2.386	2.833
1.0 M NaCl	248.04	18.512	1.683	3.546
3.0 M NaCl	18.72	41.594	3.781	0.268

Tabla 4. Purificación de las alginasas de *H. rufescens*, utilizando perlas de alginato de sodio de alta viscosidad, preparadas con 300 mM de CaCl<sub>2</sub>.

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Purificación (%)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	6994	11	1	100
0.5 M NaCl	87.36	45.042	4.095	1.249
1.0 M NaCl	49.15	154.736	14.067	0.703
3.0 M NaCl	479.71	1.523	0.138	6.859

Tabla 5. Purificación de las alginasas de *H. rufescens*, utilizando perlas de alginato de sodio de alta viscosidad, preparadas con 500 mM de CaCl<sub>2</sub>.

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Purificación (%)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	6994	11	1	100
0.5 M NaCl	60.84	51.245	4.659	0.87
1.0 M NaCl	76.44	91.509	8.319	1.093
3.0 M NaCl	14.04	7.531	0.685	0.201

Tabla 6. Purificación de las alginasas de *Astraea undosa*, utilizando perlas de alginato de sodio de alta viscosidad, preparadas con 100 mM de CaCl<sub>2</sub>.

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Purificación (%)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	6026.8	3.381	1	100
0.5 M NaCl	168.646	127.65	37.75	2.798
1.0 M NaCl	94.390	109.508	32.285	1.566
3.0 M NaCl	117.936	12.647	3.74	1.957

Tabla 7. Purificación de las alginasas de *Astraea undosa*, utilizando perlas de alginato de sodio de alta viscosidad, preparadas con 200 mM de CaCl<sub>2</sub>.

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Purificación (%)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	6026.8	3.381	1	100
0.5 M NaCl	166.15	119.442	35.323	2.757
1.0 M NaCl	74.11	155.911	46.108	1.23
3.0 M NaCl	54.236	16.207	4.793	0.896

Tabla 8. Purificación de las alginasas de *Astraea undosa*, utilizando perlas de alginato de sodio de alta viscosidad, preparadas con 300 mM de CaCl<sub>2</sub>.

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Purificación (%)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	6026.8	3.381	1	100
0.5 M NaCl	131.83	169.378	50.91	2.187
1.0 M NaCl	47.736	92.498	27.355	0.792
3.0 M NaCl	109.2	11.238	3.324	1.812

Tabla 9. Purificación de las alginasas de *Astraea undosa*, utilizando perlas de alginato de sodio de alta viscosidad, preparadas con 500 mM de CaCl<sub>2</sub>.

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Purificación (%)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	6026.8	3.381	1	100
0.5 M NaCl	236.496	57.827	17.101	3.924
1.0 M NaCl	874.536	7.843	2.319	14.511
3.0 M NaCl	34.32	26.889	7.952	0.569

### 6.3. Purificación de las alginasas de *A. undosa*

Para la purificación de las alginasas de *A. undosa* se utilizaron las perlas preparadas con 100 mM de CaCl<sub>2</sub>, logrando purificar 2 alginasas (Alg I y Alg II), con rendimientos de 0.45 y 0.19 % respectivamente (ver Tabla 10).

Tabla 10. Purificación de las Alginasas I y II de *Astraea undosa*.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica* (U/mg)	Rendimiento (%)	Purificación (%)
Extracto total	250	3141.75	3.063	100	1
Purificación con perlas de alginato					
Alg I	27.5	14.03	103.83	0.45	33.90
Alg II	27.5	6.14	67.61	0.19	22.07

\*Una unidad de actividad (U) se define como los  $\mu$ M de ácido D-Glucurónico hidrolizados por hora a 45 °C. La actividad específica se define como la actividad entre la concentración de proteína (U/mg).

La alginasa II se obtuvo al eluir la de las perlas con amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 1 M, mientras que la Alg I se quedó unida a las perlas. Para purificar la Alg I, a estas perlas se les adicionó amortiguador Tris y se homogenizaron, con la ayuda de un homogenizador de tejidos Polytron PT-MR 2100 posteriormente. Las perlas homogenizadas se centrifugaron para separar el alginato insoluble y se trabajó con el sobrenadante, el cual fue dializado con membrana de celulosa con un tamaño de poro de 6,000 a 8,000 Da para eliminar los restos de alginato de sodio soluble.

#### 6.4. Estudios electroforéticos

Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida se determinó el peso molecular de las dos alginasas purificadas siendo estos de 54 y 44 kDa respectivamente. El punto isoeléctrico de las alginasas resultó ser ácido, de 5 y 4.7 para Alg I y II respectivamente (Figura 20). Algunos valores de masa molecular y punto isoeléctrico reportados para alginasas de diferentes fuentes son; masa molecular de 32 kDa y pI de 4.7 para las alginasas purificadas de *Alteromonas* sp. cepa H-4, 32 kDa y pI de 7.5 para las purificadas de *Turbo cornutus*, para las tres alginasas (ALY-I, II y III) purificadas de *Sphingomonas* sp, se tienen los siguientes valores, masa molecular de 60, 25 y 38 kDa y pI de 9.03, 6.82 y 10.16 respectivamente.<sup>6-7</sup>

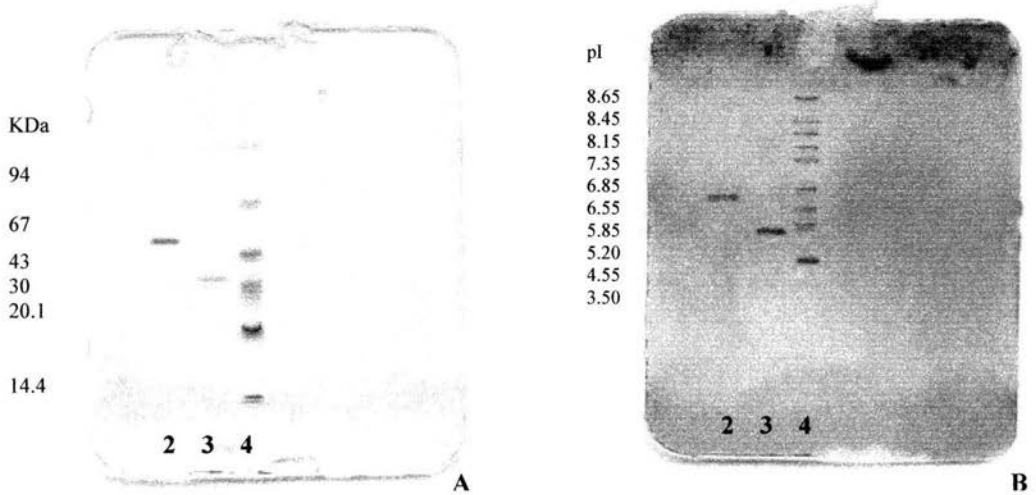


Figura 20. A) SDS-PAGE de las alginasas purificadas, B) Enfoque isoeléctrico. El carril 4 corresponde a los estándares de masa molecular y punto isoeléctrico conocidos. Los carriles 2 contienen Alg I, y los carriles 3 contienen Alg II.



### 6.5. Efecto del pH y la temperatura en la actividad de las alginasas de *A. undosa*

Al estudiar el efecto del pH y temperatura en la actividad de las alginasas purificadas, se observó que el pH óptimo para las dos enzimas es de ocho. En los valores entre 4 y 5 se observa disminución en la actividad de ambas enzimas, debido a que el pI está cercano a esos valores y por lo tanto la proteínas adquieren una carga de cero y tiende a precipitar (Figura 21). Los valores óptimos de pH reportados, para diferentes alginasas, varia dependiendo de la fuente, algunos de estos valores son; pH de 7.0-8.0 para las alginasas obtenidas de *P. citrea* KMM 3297,<sup>4</sup> pH de 6.9-7.3 para las obtenidas de *Azotobacter vinelandii*,<sup>5</sup> pH 8.0 para las enzimas A1 I y A1 II de *Sphingomonas* sp cepa A1.<sup>7</sup> Las alginasas obtenidas de fuentes marinas tienen óptimos de 7.5 en el alga *Pelvetia canaliculata*<sup>6</sup> y pH 6.0 para el invertebrado *Spisula solidissima*.<sup>6</sup>

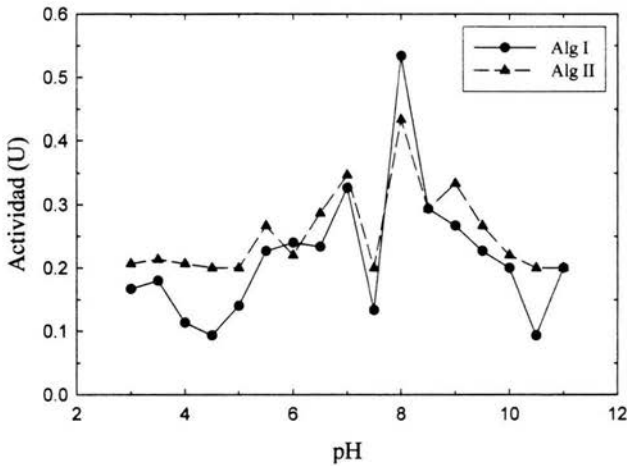


Figura 21. Efecto del pH en la actividad de la Alg I y Alg II.

La temperatura óptima de actividad de Alg I y II fue de 30 °C (Figura 22). Cabe señalar que en ambas enzimas, se observó un segundo pico de actividad a 45 °C, pero con un valor menor que a 30 °C.

Se han reportado distintos valores de temperatura óptima para alginasas purificadas de distintas fuentes. Para alginasas obtenidas de bacterias son; de 35-45 °C para las enzimas alginolíticas obtenidas de *P. citrea* KMM 3297<sup>4</sup>, es a temperatura ambiente para las enzimas obtenidas de *Azotobacter vinelandii*,<sup>5</sup> 45 °C y 70 °C para la enzima A1 I y A1 II respectivamente, obtenidas de *Sphingomonas sp* cepa A1.<sup>7</sup>

Para la alginasa obtenida de la alga *Pelvetia canaliculata*<sup>6</sup> la temperatura óptima de actividad es de 30 °C y para invertebrados marinos el valor es de 37 °C (*Spisula solidísima*<sup>6</sup>).

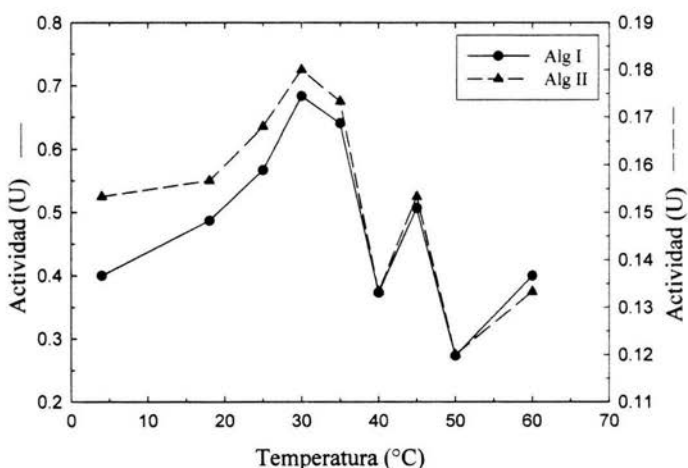


Figura 22. Efecto de la temperatura en la actividad de la Alg I y Alg II.

## 6.6. Especificidad

Para conocer el tipo de bloque degradado (manurónico o gulurónico) por Alg I y Alg II, se emplearon en la prueba de actividad dos tipos de alginatos, el alginato de alta viscosidad que contiene bloques gulurónicos en mayor proporción y alginato de baja viscosidad con mayor proporción de bloques manurónicos. En las pruebas realizadas se observó que tanto Alg I como Alg II degradan ambos tipos de alginatos (Figura 23). Este tipo de enzimas a diferencia de las obtenidas de bacterias no pueden degradar los alginatos acetilados.

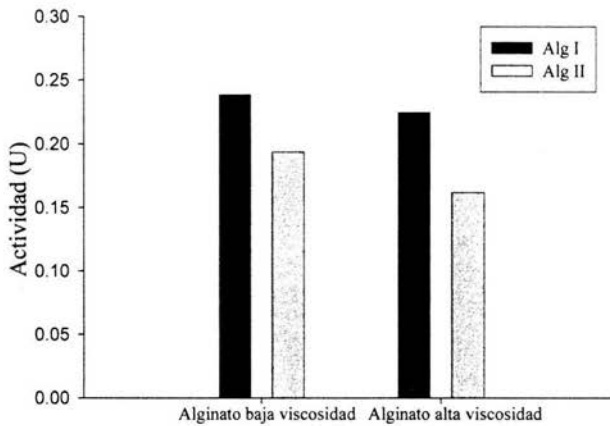


Figura 23. Actividad de Alg I y Alg II sobre alginato con diferente composición de bloques G y M. En el alginato de alta viscosidad predominan los bloques gulurónicos, mientras que en el de baja viscosidad predominan los manurónicos.

## 6.7. Efecto de aditivos

Si a un sistema enzimático se añaden sustancias que impiden la realización de la actividad de la enzima, se dice que el sistema ha sido inhibido, y la sustancia usada con estos fines se denomina inhibidor. Algunas veces, ciertos aditivos dan lugar a incrementos en la actividad enzimática.

En nuestro estudio utilizamos los aditivos que comúnmente tienen algún efecto en la actividad de diversas enzimas (Tabla 1). En la Figura 24 se puede observar que el mercurio, el cobre y el hierro inhiben por completo la actividad de Alg I, mientras que el calcio la incrementa. El litio, bario y aluminio, inhiben la actividad de Alg I hasta cerca de un tercio.

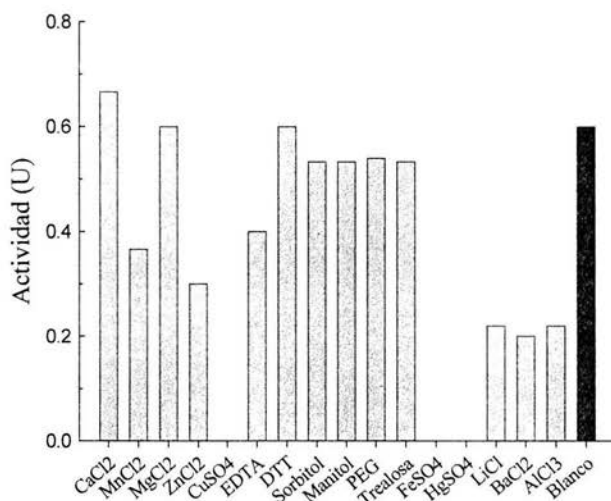


Figura 24. Efecto diferentes aditivos en la actividad de la Alg I.

En la Figura 25 se puede observar que Alg II es inhibida por completo con mercurio, cobre, hierro y bario. El manganeso, litio y aluminio, disminuyen notablemente su actividad, mientras que el magnesio y el calcio la incrementan.

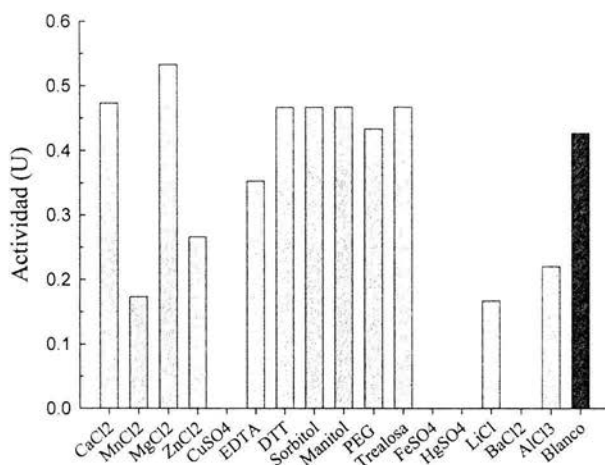


Figura 25. Efecto de diferentes aditivos en la actividad de la Alg II.

En las mediciones de actividad, en la prueba blanco (enzima + amortiguador) se observó un alto contenido de azúcares reductores, por lo que nos dimos cuenta que aún existía un elevado contenido de alginato en solución, procedente de la purificación. Para eliminarlo y evitar interferencia en los estudios con los aditivos, se filtraron exhaustivamente las muestras con un equipo de ultrafiltración (AMICON). Una vez eliminado el alginato se repitieron las pruebas de actividad en presencia de los diferentes aditivos y se observó un cambio notable en la actividad con ciertos aditivos.

En la inhibición de la Alg I por mercurio, se observaron efectos similares antes y después de la ultrafiltración, el bario y el manganeso que antes no habían inhibido la actividad de esta enzima, después de eliminar por completo el alginato, la inhibieron en su totalidad. Es probable que el alginato estuviera captando estos iones y por esto no permitía que interaccionaran con la enzima, por lo que una vez que el alginato se eliminó, estos iones pudieron unirse a la enzima e inhibir su actividad. El hierro que antes había inhibido su actividad, después de dializar la muestra no sólo no la inhibió, sino que incrementó su actividad aproximadamente 3 veces, por lo que el hierro es un promotor de la actividad para la Alg I. Esto nos indica que el hierro no es un inhibidor. Además el calcio, aluminio y zinc disminuyeron la actividad casi a la mitad (Figura 26).

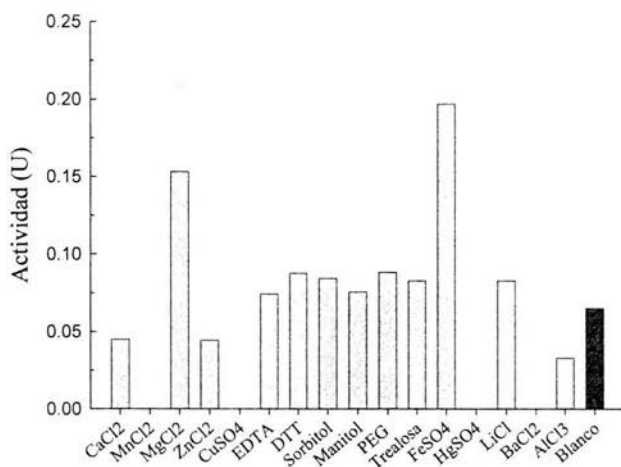


Figura 26. Efecto de los aditivos en la actividad de Alg I después de eliminar los residuos de alginato.

Por otro lado, Alg II mostró un incremento en su actividad de hasta 3 veces en presencia de magnesio y zinc, mientras que fue inhibida por completo con calcio, cobre, mercurio, bario y aluminio (Figura 27).

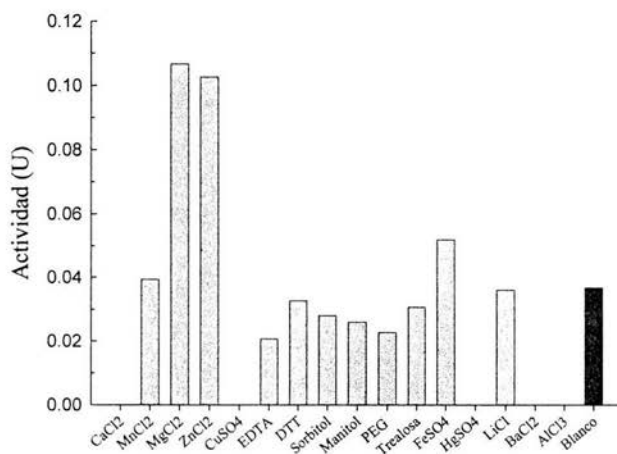


Figura 27. Efecto de diferentes aditivos en la actividad de Alg II después de dializar la muestra para eliminar el alginato.

La inhibición de la actividad de la Alg II por presencia de cobre a una concentración de 10 mM, resultó ser reversible, ya que al adicionarle a la muestra EDTA en una concentración de 40 mM se recuperó su actividad en un 80 % (Figura 28), por lo que se puede utilizar el cobre para despegar a las alginasas que se quedan unidas a las perlas de alginato. En el caso del bario no se pudo probar si la inhibición era irreversible, ya que se formaba una película viscosa en el medio de reacción, producto de la gelificación del alginato. En el caso del mercurio resultó ser un agente muy agresivo con las proteínas provocando su precipitación, por lo que la inhibición resultó irreversible.

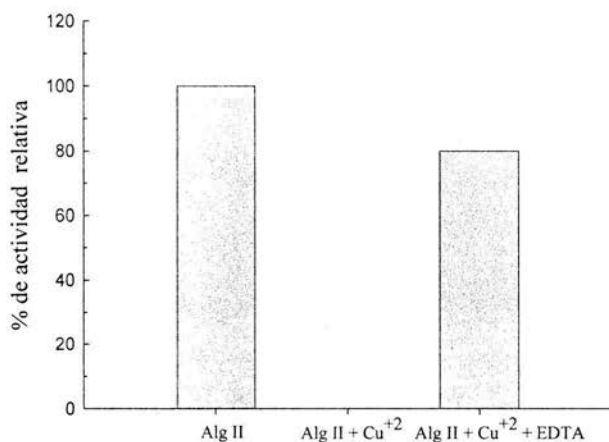


Figura 28. Recuperación de la actividad de Alg II al adicionar a la mezcla de reacción EDTA.

## 6.8. Comportamiento en solución y conducta de agregación (DLS)

Por medio de estudios de dispersión dinámica de luz (DLS), se observó el efecto de la temperatura en la agregación de ambas alginasas, mediante el seguimiento de los cambios en su masa molecular y polidispersidad. En las Figura 29 y 30 se observa que conforme aumenta la temperatura también aumenta la agregación de las alginasas y su polidispersidad, obteniendo los valores más bajos entre 5 y 15 °C.

Se puede observar que a 30 °C, que es donde se encuentra la mayor actividad de la Alg I, su masa molecular es de alrededor de 20,000 kDa, con una polidispersidad cercana a 30 nm (Figura 29). A 45 °C, temperatura en la que se realizaron las pruebas de actividad se presenta una masa molecular cercana a 25,000 kDa y una polidispersidad de 35 nm.

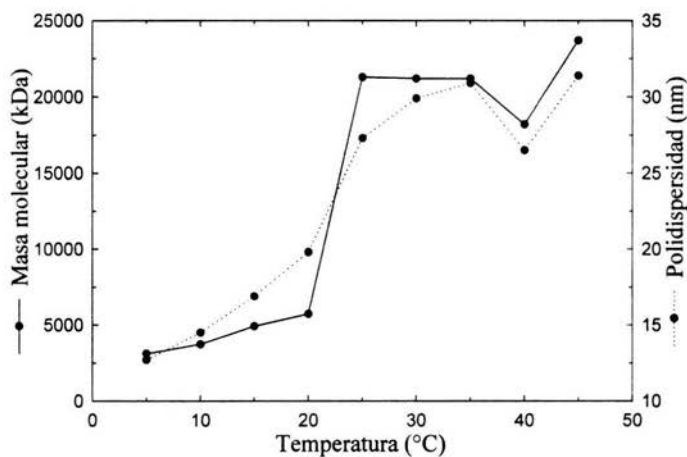


Figura 29. Efecto de la temperatura en el estado de agregación y polidispersidad de Alg I.

Alg II presenta un comportamiento similar, pero la polidispersidad es menor. Esto nos indica que las alginasas son activas aun cuando forman agregados muy grandes. Recientemente se han reportado algunos estudios donde se menciona que los fenómenos de oligomerización de las enzimas pueden constituir un mecanismo de regulación de la actividad.<sup>45-46</sup> Esto también puede deberse a que su sustrato es un polímero que llega a



formar una estructura muy larga y por lo tanto el sitio catalítico también debe ser muy grande, lo que se puede conseguir por la unión de varios monómeros de la enzima. Este comportamiento también se ha explicado por medio de la teoría del agrupamiento molecular en donde al oligomerizar las moléculas éstas proporcionan una mayor estabilidad al agregado, y también se regula la actividad, por medio de mecanismos de plegamiento y desplegamiento, ya que al abrirse la molécula deja expuesta los sitios catalíticos, para que se lleve a cabo la actividad.<sup>46-47</sup>

Con el fin de establecer las condiciones en que las enzimas se encontraban monodispersas se probó el efecto del polietilenglicol 4000 (PEG-4000), obteniéndose agregados con masa molecular mayores a los de la muestra sin aditivo, pero con una menor polidispersidad. En estudios donde se ha analizado el efecto de polioles sobre la estabilidad de las proteínas, se ha encontrado que estos tienen un efecto deshidratador, ya que eliminan el agua presente en el interior de la proteína, produciendo cambios en las propiedades dinámicas y termodinámicas de las proteínas en solución.<sup>48-49</sup>

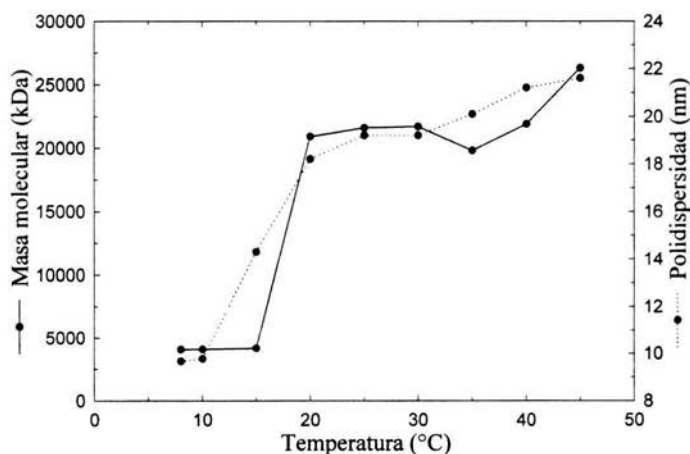


Figura 30. Efecto de la temperatura en el estado de agregación y polidispersidad de Alg II.

## 6.9. Estudios de dicroísmo circular (DC)

Se determinó la estructura secundaria de las dos alginasas purificadas utilizando técnicas de dicroísmo circular. En la Tabla 11 se puede observar que el contenido de estructura secundaria es semejante en ambas alginasas, predominando la hoja beta, sin embargo el espectro obtenido (Figura 23) muestra claramente que ambas proteínas tienen una conformación diferente. Los valores obtenidos en cada uno de los espectros son: mínimo a 222 nm y un máximo a 249 nm para Alg I, dos mínimos 205 y 221 nm y un máximo a 248 nm para Alg II. Sin embargo lo interesante de los espectros obtenidos es la señal que se presenta después de la longitud de 240 nm, ya que los espectros reportados a la fecha no la presentan por lo que los programas de desconvolución de los datos no la consideran para determinar el tipo de estructura. Dicha señal puede deberse a la presencia de puentes disulfuro o iones sulfato, como también puede ser debido a residuos aromáticos<sup>50</sup>, los cuales deberían estar en gran cantidad para mostrar dicha señal. Por lo cual la desconvolución de los datos se realizó de dos formas, una con los valores de longitud de onda que van de 200 a 228 nm, intervalo en el cual se presenta la señal negativa y otra, tomando en cuenta todos los valores, intervalo que comprende las longitudes de onda que van de 200 a 260 nm, en este caso los programas de desconvolución no consideran la señal presente en la longitud que va de 238 a 260 nm, sin embargo la estructura que predomina es la de hojas beta. Actualmente de cinco estructuras cristalinas de alginasas que han sido reportadas, en dos de ellas predomina la estructura de hélice alfa, y en las tres restantes predomina la estructura de hoja beta. En el caso de las alginasas en que predomina la estructura de hélices alfa (49.0 %), se ha reportado que tienen preferencia por hidrolizar los bloques poli( $\beta$ -D-manuronato) y aquellas alginasas en las que predomina la estructura de hojas beta (52.9 %), hidrolizan preferentemente los bloques poli( $\alpha$ -L-guluronato).<sup>51</sup>

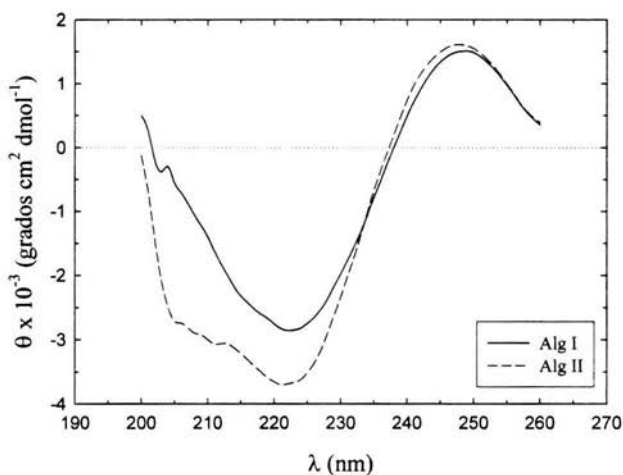


Figura 31. Espectros de dicroísmo circular en la región del ultravioleta lejano de las alginasas de *A. undosa*.

Tabla 11. Datos experimentales para la contribución de estructuras secundarias a la curva de DC de las alginasas Alg I y Alg II considerando diferentes intervalos de longitudes de onda.

Muestra	$\lambda$ (nm)	Hélice $\alpha$	Hoja $\beta$	Otros
Alg I	200-238	0.04	0.48	0.48
Alg II	200-238	0.08	0.44	0.48
Alg I	200-260	0.05	0.47	0.48
Alg II	200-260	0.16	0.33	0.51

### 6.10. Cristalización de las alginasas purificadas.

Se colocaron pruebas de cristalización de las alginasas purificadas, con la técnica de gota suspendida y probando diferentes condiciones, como se menciona en el apartado 5.9.8, obteniéndose cristales de Alg I y II. Los cristales se obtuvieron utilizando el kit I y II para cristalización de HAMPTON. Las soluciones en las cuales se obtuvieron cristales de Alg I fueron la 3 del kit I, que contiene fosfato de amonio 0.4 M; la 21 del kit II que contiene fosfato de sodio/potasio 0.2 M, MES 0.1 M pH 6.5 y cloruro de sodio 2.0 M; la 22 del kit II que contiene MES 0.1 M pH 6.5 y PEG 20,000 al 12 %. La Alg II se obtuvo en la solución 42 del kit II que contiene sulfato de amonio 1.5 M, Tris 0.1 M pH 8.5 y glicerol al 12 %.

En la mayoría de las condiciones probadas, se observaron agregados cristalinos, los cuales no alcanzaban a formar cristales, esto debido a que la saturación se alcanzaba muy rápidamente y no era posible lograr un arreglo ordenado que permitiera la formación de cristales. Los cristales de Alg I, ya tienen las condiciones de tamaño apropiadas para ser difractados.



Figura 32. Cristal de Alg I, obtenido con fosfato de amonio 0.4 M

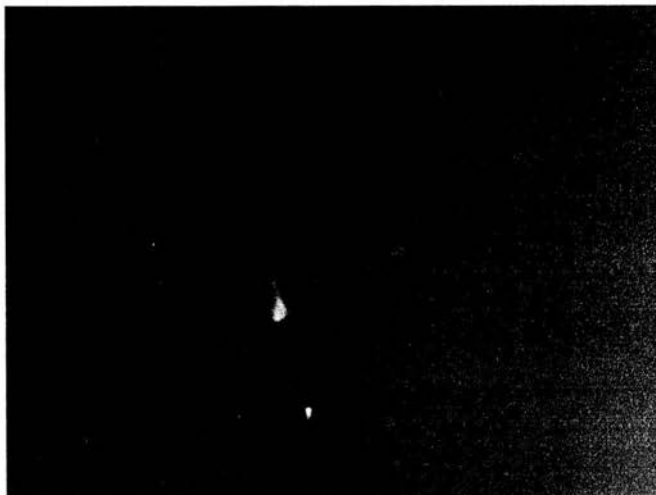


Figura 33. Cristal de Alg I, obtenido con NaCl 2.0 M, MES 0.1 M pH 6.5, fosfato de sodio y potasio 0.2 M.



Figura 34. Cristal de Alg I obtenido con PEG 20,000 al 12 %, MES 0.1 M pH 6.5.



Figura 35. Cristales de Alg II obtenidos con Sulfato de amonio 1.5 M, Tris 0.1 M pH 8.5 y glicerol al 12 %.

## 7. CONCLUSIONES

Con el estudio realizado se puede concluir que la *Astraea undosa* posee las alginasas necesarias para lograr la degradación del alginato presente en las algas café, que constituyen su principal fuente de alimentación.

Se diseñó una técnica que emplea las propiedades de polimerizar del alginato en presencia de cationes divalentes, para poder construir un soporte que sirviera como matriz de afinidad y así lograr la purificación de este tipo de enzimas que no se habían logrado debido a los fuertes fenómenos de agregación que sufren y que las llevan a la inactivación. Observamos que las perlas que contenían 100, 200 y 300 mM de  $\text{CaCl}_2$  fueron las más apropiados para la purificación de las alginasas.

Se aisló y se purificó a dos alginasas (Alg I y Alg II), las cuales fueron caracterizadas bioquímicamente, determinando peso molecular, punto isoeléctrico, especificidad y óptimos de pH y temperatura, encontrando las condiciones de estabilidad de las mismas.

Por técnicas de dispersión dinámica de luz observamos que estas enzimas tienden a agregarse fuertemente, quizás como un mecanismo de regulación de la actividad de las mismas, ya que en forma agregada son más activas, fenómeno que se ha reportado en enzimas que forman parte de sistemas multienzimáticos.

Por medio de técnicas de dicroísmo circular encontramos que estas enzimas tienen una estructura secundaria en la que predomina la hoja beta, además presentan un espectro atípico con una señal positiva en la longitud que va de 240 a 260 nm que pudiera indicarnos altos contenidos de puentes disulfuro y/o aminoácidos aromáticos.

Se encontraron las condiciones óptimas de cristalización para las alginasas Alg I y Alg II, algunos de ellos ya son apropiados para estudios de difracción de rayos X y así obtener su estructura tridimensional.

En general, el estudio de este tipo de enzimas, provenientes de invertebrados marinos es muy escaso, debido a las dificultades en su purificación y mantenimiento de su estabilidad. Aquí diseñamos un método sencillo rápido y económico para purificar este tipo de enzimas tan complicadas, logrando mantener su estabilidad para lograr caracterizarlas.

Esto nos permitirá conocer más acerca de este tipo de enzimas y poder establecer relaciones de estructura-función, sobre todo tratándose de organismos poco evolucionados, por lo que además se podrán realizar estudios de evolución de proteínas. Aportamos además las herramientas y condiciones necesarias para poder realizar estudios de difracción de rayos X que nos permitirán conocer su estructura tridimensional y así explicar como funcionan estos agregados macromoleculares en la hidrólisis del alginato.

## 8. PERSPECTIVAS

Con el trabajo realizado se caracterizaron dos alginasas presentes en *A. undosa*, sin embargo no se cuenta aún con todo su conocimiento, por lo que es preciso seguir estudiando dichas enzimas.

Para ello se debe partir del conocimiento que se tiene de ellas, por ejemplo, que una vez encontradas las condiciones en las que cristalizaron estas alginasas, se pueden modificar dichas condiciones para obtener mejores y cristales más grandes, para así realizar su estudio cristalográfico, con el que se permitirá conocer su estructura, así como el sitio catalítico y entender más de la forma de acción de estas alginasas. También se pueden seguir con otro tipo de estudio, tal es el caso de la calorimetría, en el que se puede conocer el comportamiento de dichas enzimas en presencia de su sustrato. Realizar estudios de estructura-función y de evolución de proteínas. Todo esto con el fin de proporcionar el mayor conocimiento de estas enzimas.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Aspinall, G. O. (1982) General Introduction. En: *The Polysaccharides*. **1**, Aspinall, G. O., Ed. Academic Press, 1-18.
2. Polne-Fuller, M. y Gibor, A. (1987) Microorganisms as digestors of seaweed cell walls. *Hydrobiologia*. **151-152**, 405-409.
3. Oerther, S. Payan, E. (1998) Hyaluronate-Alginate Gel as a Novel Biomaterial: Mechanical Properties and Formation Mechanism. *Biotechnology and Bioengineering*. **63**, (2), 206-215.
4. Alekseeva, S. Bakunina, I. (2003) Intracellular Alginolytic Encymes of the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas citrea* KMM 3297. *Biochemistry* (Moscow). Paper in Press. 1-22.
5. Svanem, B. Strand, W. (2001) The Catalytic Activities of the Bifunctional *Azotobacter vinelandii* Mannuronan C-5-Epimerase and Alginate Lyase AlgE7 Probably Originate from the Same Active Site in the Enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**, 31542-31550.
6. Wong, T. Y., Preston, L. A. y Schiller, N. L. (2000) Alginate lyase. Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles and applications. *Annual Review of Microbiology*. **54**, 289-340.
7. Yoon, H. Hashimoto, W. (2000) Overexpression in *Escherichia coli*, Purification, and Characterization of *Spingomonas* sp. A1 Alginate Lyases. *Protein Expresión and Purification*. **19**, 84-90.

8. Hashimoto, W. Miyake, O. (2000) Molecular Identification of Oligoalginate Lyase of *Sphingomonas sp.* Strain A1 as One of the Enzymes Required for Complete Depolymerization of Alginate. *Journal of Bacteriology*. **182**, 4572-4577.
9. Ertesvåg, H. Schjerven, H. (1999) Mannuronan C-5-Epimerases and Their Application for *in Vitro* and *in Vivo* Design of New Alginates Useful in Biotechnology. *Metabolic Engineering*. **1**, 262-269.
10. Yoon, H. J., Mikami, B. (1999) Crystal Structure of Alginate Lyase A1-III from *Sphingomonas* species A1. At 1.78 Å Resolution. *Journal of Macromolecular Biology*. **290**, 505-514.
11. Peciña, A. Pascual, A. Paneque, A. (1999) Cloning and Expresión of the *algL* Gene, Ecoding the *Azotobacter chroococcum* Alginate Lyase: Purification and Characterization of the Enzyme. *Journal of Bacteriology*. **181**, 1409-1414.
12. Nakagawa, A. Ozaki, K. (1998) An effective method for isolating alginate lyase-producing *Bacillus sp.* ATB-1015 strain and purification and characterization of the lyase. *Journal of Applied Microbiology*. **84**, 238-335.
13. Ertesvåg, H. Erlien, F. (1998) Biochemical Properties and Substrate Specificities of a Recombinantly Produced *Azotobacter vinelandii* Alginate Lyase. *Journal of Bacteriology*. **180**, 3779-3784.
14. Hashimoto, W. Okamoto, M. (1998) *Sphingomonas sp.* A1 Lyase Active on both Poly-β-D-Mannuronate and Heteropolymeric Regions in Alginate. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. **86**, 236-238.
15. Sawabe, T. Ohtsuka, M. (1997) Novel alginate lyases from marine bacterium *Alteromonas sp.* Strain H-4. *Carbohydrate Research*. **304**, 69-76.

16. Haug, A. Larsen, B. (1974) Uronic acid sequence in Alginate from different sources. *Carbohydrate Research*. **32**, 217-225.
17. Guadalupe Espín. Biología de *Azotobacter vinelandii*. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
18. Knutsen. (1993) A laboratory course in alginate chemistry. The Norwegian Institute of Technology.
19. Larsen, Knutsen and Robech. (1993) Course in applied algology, course 6 Alginates. Instituto de Algología Aplicada. Las Palmas. España.
20. Foster, G. G., Hodgson, A. N. (1999) Polysaccharolytic activity of digestive enzymes of the macroalgal herbivore, *Turbo sarmaticus* (Mollusca, Vetigastropoda: Turbinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*. **122**, 47-52.
21. Aguilar-Rosas, R. G. (1990) Análisis cualitativo de la dieta macroalgal del caracol *Astraea undosa* Wood 1928, en la Bahía de Todos los Santos, Baja California, México. *Ciencias Marinas*, **16** (4). 111-120.
22. Madurez gonádica y ciclo reproductor del Caracol Panocha (*Astraea undosa* Wood, 1928; Gastropoda: Turbinidae) en Bahía Tortugas; B. C. S. Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología.
23. Mody, K. y Chauhan, V. D. (1993) Alginase from a marine bacterium. *Botanica Marina*. **36**, 477-480.
24. Matsubara, Y., Kawada, R., Iwassak, K. Y Maramatsu, T. (1998) Extracellular poly (alpha-L-guluronato)lyase from *Corynebacterium* sp: purification, characteristics, and conformational properties. *Journal of Protein Chemistry*. **17**, 29-36.

25. Yonemoto, Y., Murata, K., Kimura, A., Yamaguchi, H. y Okayama, K. (1991) Bacterial alginate lyase: characterization of alginate lyase-producing bacterial and purification of the enzyme. *Journal of Perment. Bioengineering*. **72**, 152-157.
26. Wood, T. M. y Bhat, K. M. (1988) Methods for measuring cellulase activities. En: *Methods in enzymology*. **160**, Wood, W. A. y Kellogg, S. T., Eds., Academic Press. 87-112.
27. Smith, P. K., Krohn, R. L., (1985). Measure of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. **150**, 76-85.
28. Grant, G. Morris, E. Rees, D. (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg model. *FEBS Letters*. **32**, 195-198.
29. Gotoh, T. Matsushima, K. Kikuchi, K. (2004) Adsorption of Cu and Mn on covalently cross-linked alginate gel beans. *Chemosphere*. **55**, 57-65.
30. Zimmermann, A. Manz, B. Feilen, B. (2003) Fabrication of homogeneously cross-linked, functional alginate microcapsules validated by NMR-, CLSM- and AFM-imaging. *Biomaterials*. **24**, 2083-2096.
31. Hinojosa, M. Reyes, M. (2001) La rugosidad en la superficie topométrica. *Ingenierías*. **4**, 27-33.
32. Hartmann, U. (1997) An Elementary Introduction to Atomic Force Microscopy and Related Methods. Institute of Experimental Physics, University of Saarbrücken D-66041 Saarbrücken, Germany. 1-57.
33. Edwardson, J. Henderson, R. (2004) Atomic force microscopy and drug discovery. *Research focus. DDT*. **9**, 64-71.

34. Dufrene, Y. (2003) Recent progress in the application of atomic force microscopy imaging and force spectroscopy to microbiology. *Current Opinion in Microbiology*. **6**, 317–323.
35. Roesch, R. Cox, S. Compton, S. (2004)  $\kappa$ -Carrageenan and  $\beta$ -lactoglobulin interactions visualized by atomic force microscopy. *Food Hydrocolloids*. **18**, 429–439.
36. Neuhoﬀ, V., Stamm, R. y Eibl, H. (1985) Clear background and highly sensitive protein staining with coomassie blue dyes in polyacrylamide gels: A systmatic analysis. *Electrophoresis*. **6**, 427-448.
37. Kelly, S. Price, N. (1997) The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1338**, 161-185.
38. Jena, S. Bohidar, H. (1993) Determination of absolute polydispersity and molecular weight distribution for high molecular weight polymers from dynamic light scattering. *Journal of Chemical Physics*. **99**, 673-681.
39. Bishop, J. Martin, j. (1991) A light scattering method for qualitatively monitoring aggregation rates in macromolecular systems. *Journal of Crystal Growth*. **110**, 164-170.
40. Georgalis, Y. Shueler, J. (1995) Protein crystallization screening through scattering techniques. *Advances in Colloid and Interface Science*. **58**, 57-86.
41. Sidhartha, J. Himadri, B. (1993) Determination of absolute polydispersity and molecular weight distribution of high molecular weight polymers from dynamic light scattering. *Journal of Chemical Physics*. **99**, 673-681.
42. Mc Pherson, A. (1999) Crystallization of biological macromolecules. *Cold Spring Harbor Laboratory*. 327-337.

43. Ducruix, A. y Giegé, R. (1992) Methods of crystallization. En: *Crystallization of nucleic acid and proteins*. Ducruix, A. y Giegé, R. Eds. Oxford University Press, USA. 73-98.
44. Simpson, N. Grant, S. (2003) NMR properties of alginate microbeads. *Biomaterials*. **24**, 4941-4948.
45. Milton, A. P. (2000) Implications of macromolecular crowding for protein assembly. *Current Opinion in Structural Biology*. **10**, 34-39.
46. Hall, D., Milton, A. P. (2003) Macromolecular crowding: quantitative and semiquantitative successes, quantitative changes. *Bichimica et Biophysica Acta*. **1649**, 127-139.
47. Kuchavov, S., Slot, H., Strodes, A. (2009) Development of quantitative theory of polycondensation. *Progress in Polymer Science*. **29**, 563-633.
48. Hakulinen, N., Paavilainen, S. (2000) The crystal structure of  $\beta$ -glucosidase from *Bacillus curculans* sp. Alkalophilus: Ability to Form long polymeric assemblies. *Journal of Structural Biology*. **129**. 69-79.
49. Lee, L. L. Y Lee, J. C. (1987) Termal stability of proteins in the presence of poly(ethylene glycols). *Biochemistry*. **26**, 7813-7819.
50. Izumikawa, N., Shirak, K., (2004) Biophysical Analysis of Heat-Induced Structural Maturation of Glutamate Dehydrogenase from a Hyperthermophilic Achacon. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **97**, 305-309.
51. <http://www.rcsb.org/pdb/cgi/resultBrowser.cgi>; Agosto del 2004.