



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA
SAN JUAN BOSCO

Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud

**Bioprospección de enzimas fucoidanasas y su
aplicación para la producción de oligosacáridos a
partir de fucoidanos de algas pardas de Ambientes
Costeros de la Patagonia**

Tesis presentada para optar al título de Doctora en Bioquímica

Lic. Jessica Alejandra Gonzalez

Directora: Dra. Hebe Mónica Dionisi

Primera Co-directora: Dra. Nora Marta Andrea Ponce

Segunda Co-directora: Dra. María Paula Raffo

Agradecimientos

“Nadie se salva solo, nadie salva a nadie, todos nos salvamos en comunidad” (P. Freire)

Frase que en estos tiempos resuena en mi cabeza. Yo no me “salvé” sola, tuve la fortuna de encontrarme con personas increíbles, que me acompañaron y me ayudaron, y por eso estaré siempre agradecida. Durante el doctorado, fueron muchos los momentos de incertidumbre, situaciones que no podría haber afrontado sin la ayuda y el acompañamiento de muchas **muchas** personas.

En primer lugar, quiero agradecer a las instituciones que hicieron posible el desarrollo de esta tesis doctoral. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca otorgada. También agradecer a la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (Agencia I+D+i) por el financiamiento brindado. Es claro que este logro no es pura meritocracia, hubo un estado presente, garante y promotor de todos los derechos, incluyendo la educación pública y gratuita. Difícilmente un país logre desarrollarse productivamente sin una gran inversión en Ciencia y Tecnología, aunque hoy, es el nuevo clima de época.

Otra de las instituciones a la que quiero agradecer es a mi casa de estudios: la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, por que no solo es una entidad que otorga títulos, es parte de mi historia y me siento orgullosa de que así sea. Un especial agradecimiento a Gabriel Casal, por su predisposición y facilitar cuestiones administrativas.

También agradecer al Centro Nacional Patagónico, principalmente al Laboratorio de Microbiología Ambiental perteneciente al CESIMAR-CONICET, por permitirme desarrollar gran parte de mis tareas en sus instalaciones. También al CIHIDECAR (UBA-CONICET), por permitirme realizar los distintos ensayos químicos.

Nada de esto hubiera sido posible sin la confianza y dedicación constante de mi directora: Hebe. Gracias por tus invaluable sugerencias, porque no solo hacía a que el gráfico se vea más bonito, o que el texto se entienda mejor, cada comentario me permitió crecer a nivel personal y profesional. Los detalles siempre hacen la diferencia.

A Andrea, una de mis co-directoras y también, una de las personas que conocí en este camino. Agradezco tu calidad humana, y por estar atenta en cada paso. Por las numerosas reuniones por zoom y por estar a la par trabajando conmigo en la mesada durante mis estadías en Buenos Aires.

Tuve el privilegio de que también me co-dirija Paula. Gracias por las charlas y el acompañamiento, particularmente en lo personal. Recuerdo y valoro mucho las numerosas charlas pasillo, esa sensación de estar hablando de ciencia entre amigxs siempre lo sentí! Gracias por eso!!.

A Mariana Lozada, por los valiosos análisis bioinformáticos que fueron de mucha ayuda, principalmente al comienzo de esta tesis. También por tus sugerencias en el laboratorio.

A Matias Musumeci, porque me acompañaste en mis primeros meses en el laboratorio. Agradezco un montón tu colaboración desinteresada, aprendí muchísimo.

A mis ex compañeros de oficina: Fer y Pris. Gracias por tan lindos momentos. Por hacer todo más ameno. Por transmitirme sus experiencias.

Al equipo del CIHIDECAR, principalmente a Carlos Stortz, Yasmin Daglio y Diego Navarro. Por transmitirme sus conocimientos, experiencias y consejos. Siempre tuvieron buena predisposición cuando necesite algo y eso es muy valioso.

A Ezequiel Latour por brindarme y permitirme utilizar extractos obtenidos en su tesis doctoral.

A Fer de la Torre, por sus aportes. Porque en cada cruzada de pasillo me consultabas como venía todo, y siempre me contabas algo de trabajos que iban saliendo.

Al personal del CENPAT, porque las condiciones para trabajar siempre fueron excelentes! Desde la solución rápida frente a un problema con un equipo hasta la limpieza ó envío de correspondencia.

A los juradxs, por aceptar evaluar el manuscrito y por tomarse el tiempo para brindar sugerencias y lograr una mejor versión del mismo.

La vida, por suerte, no fue solo el doctorado. Me encontré con personas hermosas, con las que compartimos el amor por movernos en el aire. Mi tribu. Fueron y son un sostén importante en mi vida.

A quién se bancó gran parte de esta etapa, conviviendo con una noctambula pero aún así brindando tanto amor y siendo un gran cable a tierra, y a aire. Gracias Joni. Gracias por la paciencia sobre todo.

A mi familia: Irene, Georgi, Pao, Martín, María y Nahue, porque siempre estuvieron, porque creamos amor y lo sostenemos día a día a pesar de un fuerte golpe que nos tocó vivir. Mami, son mi mayor inspiración, promotora de que todo lo puedo lograr. Cuando te alegraste más que yo de haber finalizado esta etapa, entendí todo.

A mi viejo, porque aún recuerdo el llamado que te hice contando que me había salido la beca. La vida decidió que presencias el proceso desde otro plano, pero no quita que hayas estado presente en cada paso.

Y a todos y todas aquellas personas que de alguna manera colaboraron para que pueda culminar esta etapa.

Gracias, gracias y gracias.

En memoria de Alejandro Antonio Gonzalez,

Índice

Agradecimientos.....	2
Índice	6
Lista de tablas	13
Lista de figuras.....	16
Abreviaturas	20
Resumen	22
Abstract	24
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	26
1.1. Las algas	27
1.1.1. Las algas pardas.....	27
1.1.1.1. Importancia de las algas pardas en los ambientes costeros	29
1.1.1.2. Especies de algas pardas con valor ecológico y económico en los ambientes costeros Patagónicos.....	29
1.1.1.3. Potencial biotecnológico de las algas pardas.....	30
1.1.1.4. La pared celular de las algas pardas	30
1.1.1.4.1. Función y estructura de los fucoidanos.....	31
1.1.1.4.2. Peso molecular de los fucoidanos	34
1.1.1.4.3. Propiedades bioactivas de los fucoidanos	34
1.2. Microorganismos degradadores de los polisacáridos de las algas pardas.....	36
1.3. Clasificación de las enzimas activas sobre carbohidratos	37
1.3.1. Enzimas bacterianas que participan en la asimilación y degradación de fucoidanos	38
1.3.1.1. α -L-Fucosidasas	40
1.3.1.2. Sulfatasas.....	40
1.3.1.3. Desacetilasas	40
1.3.1.4. Fucoidanasas	40
1.3.1.4.1. Familia GH107	41
1.3.1.4.2. Metodologías para la determinación de la actividad fucoidanasa	46
1.4. Bioprospección microbiana	48
1.4.1. Métodos dependientes del cultivo	48
1.4.2. Métodos independientes del cultivo	49

1.4.2.1. Secuenciación al azar del metagenoma	50
1.4.2.2. Bibliotecas metagenómicas.....	50
1.5. Biblioteca metagenómica construida a partir de sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina.	51
1.5.1. Sitio de Estudio.....	51
1.5.1. Biblioteca metagenómica.....	53
1.5.1.1 Expresión heteróloga de enzimas de interés	54
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	57
Objetivo general	57
Objetivos específicos	57
2. MATERIALES Y MÉTODOS	58
2.1. Identificación y caracterización de secuencias putativas de enzimas fucoidanasas	59
2.1.1. Construcción de alineamientos múltiples y obtención de perfiles ocultos de Markov	59
2.1.2. Prospección de secuencias putativas de fucoidanasas.....	59
2.1.3. Análisis filogenéticos de las secuencias putativas identificadas.....	60
2.1.4. Identificación de secuencias cercanas en la base de datos no redundante (nr) de NCBI.....	60
2.1.5. Análisis estructurales de las secuencias putativas a fucoidanasas.....	61
2.1.5.1. Análisis de los residuos catalíticos.....	61
2.1.5.2. Análisis de la arquitectura multidominio	61
2.1.5.3. Detección de la presencia de péptido señal.....	61
2.1.5.4. Modelado de la estructura tridimensional.....	61
2.2. Análisis de los fragmentos metagenómicos que contienen las secuencias identificadas.....	63
2.2.1. Asignación taxonómica de los fragmentos metagenómicos.....	63
2.2.2. Predicción de secuencias codificantes y anotación funcional de los fragmentos metagenómicos.....	63
2.2.3. Análisis de contexto genómico y sintenia compartida.....	64
2.3. Microorganismos y vectores.....	64
2.3.1. Cepas bacterianas utilizadas y almacenamiento	64
2.3.2. Vectores	64

2.4. Medios de cultivo.....	66
2.5. Composición de soluciones.....	67
2.6. Manipulación de ácidos nucleicos	68
2.6.1. Aislamiento de ADN plasmídico	68
2.6.1.1. Extracción de plásmidos utilizando un kit comercial	68
2.6.1.2. Extracción de plásmidos utilizando el método de lisis alcalina.....	68
2.6.2. Cuantificación del ADN.....	69
2.6.3. Electroforesis en geles de agarosa.....	69
2.7. Transferencia de ADN plasmídico.....	70
2.7.1. Obtención de células competentes <i>E. coli</i> TOP10 y BL21 (DE3).....	70
2.7.2. Transformación de células competentes	70
2.7.2.1. <i>E. coli</i> TOP10	70
2.7.2.2. <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	71
2.7.2.3. Eficiencia de la transformación	71
2.8. Amplificación y clonado de las secuencias de interés	71
2.8.1. Eliminación del péptido señal	71
2.8.2. Diseño de cebadores	71
2.8.3. Amplificación de las secuencias de interés.....	72
2.8.4. Clonado de los productos de amplificación	74
2.8.4.1. Selección de clones positivos	75
2.8.5. Subclonado de las secuencias en el vector de expresión pET28-TEV.....	76
2.8.5.1. Digestión con endonucleasas de restricción	76
2.8.4.2. Purificación del material digerido	77
2.8.4.3. Ligado de fragmentos de ADN.....	77
2.9. Sobre-expresión heteróloga y purificación de las enzimas recombinantes.....	77
2.9.1. Predicciones de expresión soluble	77
2.9.2. Optimización de la expresión heteróloga	78
2.9.2.1. Composición del medio de cultivo	78
2.9.2.2. Adición de glucosa	78
2.9.2.3. Temperatura de crecimiento e inducción	78
2.9.2.4. Uso de chaperones moleculares: el complejo GroES-GroEL.....	78
2.9.3. Cosecha de células y lisis celular	79

2.9.4. Expresión heteróloga	79
2.9.5. Purificación, cuantificación y determinación de pureza de las enzimas obtenidas.....	80
2.9.5.1. Purificación mediante cromatografía de afinidad.....	80
2.9.5.1.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	80
2.9.5.1.2. Determinación de la concentración de proteínas.....	81
2.9.5.2. Diálisis.....	82
2.9.5.3. Concentrado de las proteínas purificadas.....	82
2.10. Extracción y caracterización de fucoidanos.....	82
2.10.1. Sitios de recolección de las algas pardas	82
2.10.2. Extracción de los fucoidanos de <i>U. pinnatifida</i> y de <i>M. pyrifera</i>	84
2.10.2.1. Caracterización de los extractos mediante técnicas analíticas	85
2.10.2.1.1. Determinación de azúcares totales.....	85
2.10.2.1.2. Determinación de ácidos urónicos.....	86
2.10.2.1.3. Determinación cuantitativa de proteínas totales	86
2.10.2.1.4. Determinación del contenido de ésteres sulfato.....	87
2.10.2.1.5. Determinación de los azúcares componentes	88
2.10.2.1.6. Hidrólisis ácida con ácido trifluoroacético (TFA).....	88
2.10.2.1.7. Preparación de los alditoles peracetilados	88
2.10.2.1.8. Determinación del peso molecular por cromatografía de permeación en gel	89
2.10.3. Fraccionamiento del sistema de polisacáridos	90
2.10.3.1. Precipitación con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)	90
2.10.3.2. Caracterización química de las fracciones obtenidas	91
2.10.3.2.1. Determinación del peso molecular por cromatografía de permeación en gel	91
2.10.3.3. Análisis de desulfatación	91
2.10.3.4. Análisis de metilación	92
2.10.3.5. Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	92
2.11. Determinación de actividad fucoidanasa y caracterización de los productos resultantes	93
2.11.1. Reacción enzimática a baja escala	93
2.11.2. Determinación de las condiciones óptimas para la catálisis	93

2.11.3. Visualización de los oligosacáridos resultantes de la actividad enzimática	94
2.11.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida de carbohidratos.....	94
2.11.5. Reacción enzimática a mayor escala: separación y análisis de oligosacáridos	95
3. FUCOIDANOS: EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y FRACCIONAMIENTO	97
3.1. INTRODUCCIÓN.....	98
3.2. RESULTADOS	99
3.2.1. Extracción y análisis químico de los fucoidanos de algas pardas	99
3.2.2. Fraccionamiento de los polisacáridos y análisis estructural	101
3.2.2.1. Análisis por metilación	106
3.2.2.2. Desulfatación y metilación de los polisacáridos desulfatados.....	109
3.2.2.3. Espectroscopía de RMN.....	110
3.3. DISCUSIÓN	111
4. IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS A ENZIMAS FUCOIDANASAS EN UN AMBIENTE SUBPOLAR	117
4.1. INTRODUCCIÓN.....	118
4.2. RESULTADOS	119
4.2.1. Familia GH107	120
4.2.1.1. Identificación de secuencias homólogas a miembros de la familia GH107	120
4.2.1.2. Identificación de péptido señal y de dominios en secuencias GH107 putativas	120
4.2.1.3. Posibles hospedadores de las secuencias identificadas.....	124
4.2.1.4. Análisis filogenéticos de las secuencias pertenecientes a la familia GH107 y las secuencias GH107 putativas identificadas	126
4.2.1.4.1. Relaciones filogenéticas entre miembros de la familia GH107....	126
4.2.1.4.2. Relaciones filogenéticas entre miembros de la familia GH107 y las secuencias identificadas	129
4.2.1.5. Análisis estructurales de las secuencias GH107 putativas	131
4.2.1.5.1. Conservación de los residuos catalíticos en alineamientos múltiples	131
4.2.1.5.2. Análisis de modelos de la estructura tridimensional	133
4.2.1.6. Contexto genómico de las secuencias putativas de fucoidanasas.....	140

4.2.1.7. Sintenia compartida	143
4.2.1.8. Predicción de la solubilidad en <i>E. coli</i>	144
4.2.1.9. Selección de secuencias para su expresión heteróloga	144
4.2.2. Familia GH168	145
4.2.2.1. Identificación de secuencias homólogas a miembros de la familia GH168	145
4.2.2.2. Identificación de dominios conservados y péptido señal en secuencias completas GH168 putativas	147
4.2.2.3. Posibles hospedadores de las secuencias identificadas.....	149
4.2.2.4. Análisis filogenéticos de las secuencias GH168 putativas.....	153
4.2.2.5. Análisis estructurales de las secuencias GH168 putativas	155
4.2.2.5.1. Conservación de los residuos catalíticos en alineamientos múltiples	155
4.2.2.5.2. Modelado de la estructura tridimensional.....	156
4.2.2.6. Determinación del contexto genómico de las secuencias GH168 putativas	159
4.2.2.7. Predicción de la solubilidad en <i>E. coli</i>	159
4.2.2.8. Selección de secuencias para su síntesis génica y expresión heteróloga	160
4.3. DISCUSIÓN	161
5. CLONADO, EXPRESIÓN HETERÓLOGA Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS FUCOIDANASAS	170
5.1. INTRODUCCIÓN.....	171
5.2. RESULTADOS	172
5.2.1. Amplificación de genes putativos de fucoidanasas y clonado de los mismos en el plásmido de expresión	172
5.2.1.1. Diseño de cebadores y amplificación de los genes de interés.....	172
5.2.1.2. Clonado de los genes amplificados	174
5.2.1.3. Variantes identificadas del gen 277285	176
5.2.2. Expresión heteróloga de las enzimas fucoidanasas putativas.....	177
5.2.2.1. Optimización de la expresión heteróloga	177
5.2.2.1.1. Medio de cultivo y co-expresión con chaperones moleculares... 177	
5.2.2.1.2. Temperatura.....	179

5.2.2.1.3. Protocolo de lisis celular.....	179
5.2.3. Condiciones optimizadas de expresión y de lisis celular	179
5.2.4. Purificación.....	181
5.3. DISCUSIÓN	184
6. CARACTERIZACIÓN DE LAS ENZIMAS EXPRESADAS Y PURIFICADAS	188
6.1. INTRODUCCIÓN.....	189
6.2. RESULTADOS	190
6.2.1. Determinación de la actividad fucoidanasa	190
6.2.1.1. Especificidad de sustrato.....	190
6.2.1.2. Determinación de las condiciones óptimas de catálisis.....	192
Tiempo.....	192
Temperatura.....	193
pH.....	194
Salinidad	195
6.2.2. Obtención de productos de bajo peso molecular.....	196
6.3. DISCUSIÓN	201
7. DISCUSIÓN GENERAL	208
8. CONCLUSIONES.....	218
9. BIBLIOGRAFÍA	221
10. ANEXO: Publicaciones.....	247

Lista de tablas

Tabla 1.1. Enzimas fucoidanasas pertenecientes a la familia GH107 reportadas hasta el momento.	43
Tabla 1.2. Diversidad de órdenes y géneros de especies de algas pardas presentes en Bahía Ushuaia, Tierra del Fuego.	53
Tabla 2.1. Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de genes putativos a fucoidanasas. Los sitios de reconocimiento por endonucleasas de restricción se indican en negrita. El triplete de nucleótidos subrayados en el cebador Reverse indica el codón stop.	72
Tabla 2.2. Protocolo de temperaturas utilizadas en la reacción de amplificación de las secuencias de interés.	74
Tabla 2.3. Volúmenes utilizados en la digestión con endonucleasas de restricción del vector de expresión y de clonado que contiene la secuencia de interés.	77
Tabla 3.1. Caracterización química de los fucoidanos extraídos de distintas especies de algas pardas. Los resultados están expresados en % (p/v) de compuesto por 100 g de peso seco.	100
Tabla 3.2. Composición de monosacáridos (moles/100 moles de azúcares)* de fucoidanos extraídos de distintas especies de algas pardas.	101
Tabla 3.3. Rendimiento y análisis de las fracciones obtenidas por precipitación con CTAB y redisolución con NaCl, provenientes de los extractos EFLO y ELAM de <i>M. pyrifera</i> . Los resultados están expresados en % (p/v) de compuesto por 100 g de peso seco.	103
Tabla 3.4. Azúcares componentes (% mol) obtenidos mediante análisis de cromatografía gaseosa de las fracciones de fucoidanos provenientes de extractos de flotadores (EFLO) y láminas (ELAM) de <i>M. pyrifera</i>	104
Tabla 3.5. Composición de azúcares de las fracciones F4FLO y F4LAM metiladas ^b	108
Tabla 4.1. Secuencias homólogas a fucoidanasas de la familia GH107 (CAZy) identificadas en el <i>set</i> de datos metagenómico OR07. En rojo se indican las secuencias parciales; en negro las secuencias completas.	120
Tabla 4.2. Asignaciones taxonómicas del gen y del scaffold al que pertenecen las secuencias putativas a fucoidanasas de la familia GH107 obtenidas a partir del servidor MEGAN.	125

Tabla 4.3. Resultados de la búsqueda de secuencias similares en la base de datos de proteínas no redundante del NCBI, mediante el algoritmo blastp. Para cada secuencia identificada, se indica la secuencia más cercana proveniente de un microorganismo cultivado.	126
Tabla 4.4. Templados de las secuencias homólogas a miembros de la familia GH107 obtenidos a partir del servidor SWISS-MODEL.....	134
Tabla 4.5. Determinaciones de solubilidad de las secuencias metagenómicas homólogas a miembros de la familia GH107. Se utilizaron tres servidores para la predicción de la solubilidad. La letra (S) indica solubilidad de la proteína.....	144
Tabla 4.6. Secuencias identificadas en la biblioteca metagenómica homólogas a miembros de la familia GH168 (CAZy). En rojo se indican las secuencias parciales y en negro las completas.....	146
Tabla 4.7. Comparación estructural del modelado tridimensional de las secuencias putativas a enzimas de la familia GH168 contra el modelo estructural de la enzima FunA utilizando el servidor Dali.	147
Tabla 4.8. Asignaciones taxonómicas de las secuencias homólogas a la familia GH168 y del <i>scaffold</i> al que pertenecen.	150
Tabla 4.9. Resultados de la comparación, mediante el algoritmo blastp, de las fucoidanasas putativas, contra la base de datos de proteínas no redundante del NCBI.	152
Tabla 4.10. Genes relacionados al metabolismo de fucoidanos identificados próximos a la secuencia putativa de fucoidanasas de la familia GH168.	159
Tabla 4.11. Predicción de solubilidad de las secuencias metagenómicas homólogas a fucoidanasas de la familia GH168. Se utilizaron tres servidores para las predicciones de solubilidad. La determinación de proteína soluble se indica con (S). Las secuencias indicadas en negrita presentan alta probabilidad de ser solubles a ser expresadas en <i>E. coli</i>	160
Tabla 5.1. Proteína obtenida en las etapas de expresión, purificación y diálisis.....	182
Tabla 6.1. Taxonomía correspondiente a las especies de algas pardas consideradas en este trabajo.....	190

Tabla 7.1. Características químicas de fucoidanos del extracto de lámina (ELAM) y de la fracción purificada de oligosacáridos (F1-P2) proveniente de la degradación enzimática de dicho extracto de *M. pyrifera*..... 215

Lista de figuras

Figura 1.1. Filogenia de los órdenes de algas pardas basado en 12 marcadores moleculares.	28
Figura 1.2. Modelo de la pared celular de algas pardas del orden Fucales.	31
Figura 1.3. Modelos de la estructura química de fucoïdanos de dos especies de algas pardas.	33
Figura 1.4. Principales unidades monosacáridicas estructurales encontradas en los fucoïdanos.	34
Figura 1.5. Propiedades biológicas de los fucoïdanos.	35
Figura 1.6. Enzimas que despolimerizan fucoïdanos.	39
Figura 1.7. Estructura modular de la enzima FcnA de <i>M. fucanivorans</i> SWT5.	42
Figura 1.8. Mecanismo catalítico propuesto para la enzima FcnA de <i>Mariniflexile fucanivorans</i> SWT5.	45
Figura 1.9. Pasos implicados en el análisis de una muestra ambiental.	49
Figura 1.10. Ubicación del sitio de muestreo en la Bahía Ushuaia (círculo rojo) presente en la Isla Grande de Tierra del Fuego, Argentina.	52
Figura 1.11. Sistema de expresión heteróloga utilizando como huésped la cepa de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) conteniendo el vector de expresión pET recombinante.	55
Figura 1.12. Interacción entre residuos de histidina (azul) y los iones de níquel presentes en la resina ácido níquel-nitrilotriacético (Ni-NTA). Extraído de The QIAexpressionist, 2003.	56
Figura 2.1. Mapa del plásmido pCR™ 4-TOPO™.	65
Figura 2.2. Mapa circular del vector de expresión pET-TEV.	66
Figura 2.3. Mapa del plásmido pGro7.	66
Figura 2.4. Especies de algas pardas a las que pertenecen los fucoïdanos utilizados en este trabajo.	83
Figura 2.5. Esquema de la serie de pasos aplicados en la extracción de fucoïdanos a partir de la biomasa seca.	85
Figura 2.6. Esquema de la serie de pasos aplicados en el fraccionamiento de fucoïdanos a partir de los extractos de fucoïdanos obtenidos de láminas y cauloides de <i>M. pyrifera</i>	91

Figura 3.1. Perfiles obtenidos por cromatografía de permeación de geles (GPC) para la determinación del peso molecular del extracto (EFLO) y de fracciones obtenidas de fucoïdanos de flotadores (F1FLO, F2FLO, F3FLO y F4FLO) de <i>M. pyrifera</i>	105
Figura 3.2. Perfiles obtenidos por cromatografía de permeación de geles (GPC) para la determinación del peso molecular del extracto (ELAM) y de la fracción F4LAM obtenida de fucoïdanos de láminas de <i>M. pyrifera</i>	106
Figura 3.3. Espectro de RMN (HSQC) de la fracción de fucoïdanos F4LAM de <i>M. pyrifera</i>	111
Figura 3.4. Estructura del fucoïdano de <i>U. pinnatifida</i>	113
Figura 4.1. Dominios identificados en las secuencias completas homólogos a fucoïdanasas de la familia GH107.	122
Figura 4.2. Relaciones filogenéticas entre secuencias de enzimas fucoïdanasas pertenecientes a la familia GH107 (CAZy) y arquitectura modular de dichas secuencias..	128
Figura 4.3. Relaciones filogenéticas entre miembros de la familia GH107 y las secuencias identificadas por homología a partir de ellas.....	130
Figura 4.4. Sección del alineamiento entre enzimas caracterizadas de la familia GH107 y las fucoïdanasas putativas identificadas.	131
Figura 4.5. Conservación de los residuos que conforman el subsitio -1.....	133
Figura 4.6. Modelado tridimensional de la secuencia 113643.	136
Figura 4.7. Identificación de los residuos implicados en la catálisis en el modelo obtenido para la secuencia 113643 mediante Alphafold2.	137
Figura 4.8. Identificación de sitios de unión al Ca ²⁺	138
Figura 4.9. Modelado tridimensional de la secuencia 163424 (celeste) obtenido a partir de SWISS-MODEL.....	139
Figura 4.10. Modelado tridimensional de la secuencia 289547 (amarillo) obtenido a partir de SWISS-MODEL.....	140
Figura 4.11. Contexto genómico de los <i>scaffolds</i> a los que pertenecen las secuencias putativas de fucoïdanasas de la familia GH107.	142
Figura 4.12. Sintenia compartida entre los <i>scaffolds</i> a los que pertenecen las secuencias putativas de fucoïdanasas de la familia GH107 y una región del fragmento del genoma de <i>Planctomycetes bacterium</i> CA13.....	143

Figura 4.13. Dominios identificados en las secuencias homólogas a fucoidanasas de la familia GH168.	149
Figura 4.14. Árbol filogenético entre las secuencias pertenecientes a la familia GH168 y las identificadas a partir de ellas por homología.	154
Figura 4.15. Alineamiento del módulo catalítico entre las secuencias putativas de fucoidanasas de la familia GH168 y las secuencias de referencia.	156
Figura 4.16. Modelo estructural de la enzima FunA..	157
Figura 4.17. Modelado tridimensional mediante AlphaFold2 de las secuencias putativas a fucoidanasas de la familia GH168.....	158
Figura 5.1. Electroforesis en gel de las secuencias amplificadas putativas de enzimas fucoidanasas.	174
Figura 5.2. Mapa de restricción del vector de clonado pCR™ 4-TOPO™ con presencia del inserto.	175
Figura 5.3. Mapa de restricción de las cuatro construcciones generadas en el vector de expresión pET28-TEV.....	176
Figura 5.4. Electroforesis SDS-PAGE de la co-expresión de la construcción pET28-TEV-57307 y del vector pGro en diferentes medios de cultivo (LB y 4xYT).....	178
Figura 5.5. Expresión de las proteínas recombinantes analizada por SDS-PAGE.....	180
Figura 5.6. Purificación de las enzimas recombinantes mediante cromatografía por afinidad Ni-NTA.	182
Figura 5.7. Concentración de proteínas (µg) en distintas etapas del proceso de expresión y purificación de las cuatro enzimas fucoidanasas.	183
Figura 6.2. Determinación de la actividad fucoidanasa de la enzima #113643 frente a los 3 fucoidanos extraídos de la especie <i>M. pyrifera</i>	192
Figura 6.3. Determinación de la actividad fucoidanasa de la enzima #113643 con respecto al tiempo de reacción.....	193
Figura 6.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad fucoidanasa de la enzima #113643.....	194
Figura 6.5. Efecto del pH en la actividad fucoidanasa de la enzima #113643 frente a fucoidanos de flotadores de <i>M. pyrifera</i>	195
Figura 6.6. Efecto de la concentración de NaCl en la actividad fucoidanasa de la enzima #113643 frente a fucoidanos extraídos de flotadores de <i>M. pyrifera</i>	196

Figura 6.7. Perfil de cromatografía de exclusión por tamaño en columna de Bio-Gel P-6 de los productos de bajo peso molecular obtenidos tras hidrólisis de la enzima #113643 frente a fucoïdanos del extracto ELAM de <i>M. pyrifera</i>	197
Figura 6.8. Perfil de cromatografía de exclusión por tamaño en columna de Bio-Gel P-2 de la fracción obtenida a partir de la columna de Bio-Gel P-6.	198
Figura 6.9. Perfil obtenido por cromatografía de permeación de geles (GPC) para la determinación del peso molecular de las fracciones a) F1-P2 y b) F2-P2.....	199
Figura 6.10. Espectros de RMN HSQC de las fracciones (a) F1-P2 y (b) F2-P2.....	200
Figura 6.11. Espectro obtenido mediante espectrometría de masa ESI modo ión negativo de la fracción de oligosacáridos F1-P2, obtenida a partir de fucoïdanos de <i>M. pyrifera</i> degradados por la enzima #113643.	201
Figura 6.12. Especie <i>M. pyrifera</i>	202
Figura 7.1. Pasos implicados en la prospección de secuencias de enzimas fucoïdanasas, su expresión heteróloga y caracterización, como así también el aislamiento y purificación de fucoïdanos y oligofucoïdanos provenientes de <i>M. pyrifera</i>	210

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
aá	aminoácidos
ACN	acetonitrilo
ADN	Acido dexosirribonucleico
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
C-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida de carbohidratos
C-terminal	Extremo carboxilo terminal
CAZy	<i>Carbohydrate Active EnZYme</i>
Cm	Cloranfenicol
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DMSO	dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DTT	1,4-dithiothreitol
EC	Código enzimático
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
FCSP	Polisacáridos sulfados ricos en fucosa (<i>Fucose Containing Sulfated Polysaccharides</i>)
GH	Glicósido hidrolasa
GPC	Cromatografía de permeación en geles
h	hora (s)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i>
min	minutos

mM	milimolar
N-terminal	Extremo amino terminal
Ni-NTA	ácido níquel-nitrilotriacético
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMR	Resonancia magnética nuclear (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
Nt	Nucleótidos
p/v	Peso en volumen
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	<i>Protein data Bank</i>
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RMSD	Desviación de la media cuadrática (<i>Root Mean Square Deviation</i>)
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
SDS	Dodecil sulfato sódico (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
v/v	volumen en volumen

Resumen

Los fucoidanos son polisacáridos sulfatados ricos en fucosa constituyentes de la pared celular de las algas pardas. Si bien se ha demostrado que los fucoidanos presentan un amplio espectro de actividades biológicas, su naturaleza heterogénea resulta un obstáculo para su utilización para el desarrollo de agentes terapéuticos. Los fucoidanos nativos, al tener un alto peso molecular, presentan una baja permeabilidad a nivel intestinal y por lo tanto una baja biodisponibilidad. Por el contrario, los productos de bajo peso molecular obtenidos a partir del tratamiento de hidrólisis enzimática con enzimas fucoidanasas (sinónimo fucanasas), permite obtener oligosacáridos sulfatados de estructura más definida, con mayor solubilidad y con bioactividades similares al fucoidano sin digerir, o incluso mayores. El objetivo general de este trabajo fue prospectar enzimas fucoidanasas en una comunidad microbiana de sedimentos Subantárticos, que puedan ser utilizados para la producción fuco-oligosacáridos a partir de fucoidanos de algas pardas de ambientes costeros de la Patagonia. Secuencias homólogas a enzimas de las familias CAZy GH107 (endo- α -1,4-L-fucanasa, endo- α -1,3-L-fucanasa) y GH168 (endo- α -1,4-L-fucanasa) fueron identificadas en un metagenoma de sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia, mediante el uso de perfiles ocultos de Markov construidos a partir de alineamientos de la región correspondiente al módulo catalítico de las secuencias depositadas en estas familias. Se identificaron en el metagenoma 7 secuencias relacionadas con la familia GH107 y 22 secuencias con la familia GH168, de las cuales 5 y 18 secuencias se encontraban completas respectivamente. La asignación taxonómica de las secuencias identificadas y sus respectivos *scaffolds* sugirió que la mayoría de ellas provendrían de organismos pertenecientes al *phylum* Planctomycetota (80 % relacionadas a enzimas GH107 y 38 % a GH168). Basados en resultados de análisis *in silico*, fueron seleccionadas cuatro secuencias homólogas a miembros de la familia GH107 para su clonado y posterior expresión en *Escherichia coli*. Se obtuvo una alta producción de las enzimas en la fracción soluble mediante la expresión a baja temperatura. La actividad enzimática fue estudiada mediante la técnica de C-PAGE, utilizando como sustrato fucoidanos provenientes de ocho especies de algas pardas de la costa patagónica. De las secuencias expresadas, la enzima #113643 (potencialmente proveniente de un miembro del

phylum Plactomycetota), de 42 kDa, exhibió una alta actividad catalítica frente a fucoidanos de la especie de alga parda *Macrocystis pyrifera*. Los productos de degradación fueron observados a partir de los 30 s de incubación a 25 °C, en un amplio rango de temperaturas (5 – 45 °C), salinidades (9,5 – 861 mM NaCl) y pH (4,5 – 9). Los productos de bajo peso molecular resultantes de la catálisis estarían conformados principalmente por una mezcla de oligosacáridos de 3, 6 y 7 unidades de fucosa mono- y disulfatadas. Las características biocatalíticas de la enzima #116343 le otorgan un gran potencial para la obtención de fuco-oligosacáridos, los cuales serán evaluados para la determinación de sus propiedades bioactivas y potenciales aplicaciones biotecnológicas. Por otra parte, los resultados obtenidos en esta Tesis doctoral incrementan nuestro conocimiento sobre la diversidad de microorganismos con potencial para degradar fucoidanos presentes en comunidades microbianas de los sedimentos intermareales de un ambiente Subantártico, particularmente de organismos de difícil cultivo de los que poco se conoce sobre sus capacidades para asimilar fucoidanos.

Abstract

Fucoidans are fucose-rich sulfated polysaccharides that are constituents of the cell wall of brown algae. Although fucoidans have been shown to have a broad spectrum of biological activities, their heterogeneous nature is an obstacle to their use for the development of therapeutic agents. Native fucoidans, having a high molecular weight, have low intestinal permeability and therefore low bioavailability. On the contrary, the low molecular weight products obtained from the enzymatic hydrolysis treatment with fucoidanase enzymes (synonymous fucanases), allow obtaining sulfated oligosaccharides with a more defined structure, with greater solubility and with bioactivities similar to undigested fucoidan, or even higher. The general objective of this work was to prospect for fucoidanase enzymes in a microbial community of Subantarctic sediments, which can be used for the production of fuco-oligosaccharides from fucoidans of brown algae from coastal environments in Patagonia. Homologous sequences to enzymes of the CAZy GH107 (endo- α -1,4-L-fucanase, endo- α -1,3-L-fucanase) and GH168 (endo- α -1,4-L-fucanase) families were identified in a metagenome of intertidal sediments from Bahía Ushuaia, using hidden Markov profiles built from alignments of the region corresponding to the catalytic module of the sequences deposited in these families. Seven sequences related to the GH107 family and 22 sequences related to the GH168 family were identified in the metagenome. Of them, 5 and 18 sequences were complete respectively. The taxonomic assignment of the identified sequences and their respective scaffolds suggested that most of them would come from organisms belonging to the phylum Planctomycetota (80 % related to GH107 enzymes and 38 % to GH168). Based on in silico analysis results, four sequences homologous to members of the GH107 family were selected for cloning and subsequent expression in *Escherichia coli*. A high production of the enzymes in the soluble fraction was obtained by expression at low temperature. Enzymatic activity was studied using the C-PAGE technique, using fucoidans from eight species of brown algae from the Patagonian coast as substrate. Of the expressed sequences, the 42 kDa enzyme #113643 (potentially from a member of the phylum Planctomycetota) exhibited high catalytic activity against fucoidans from the brown alga species *Macrocystis pyrifera*. Degradation products were observed after 30 s of incubation at 25 °C, in a wide range of

temperatures (5 - 45 °C), salinities (9.5 - 861 mM NaCl) and pH (4.5 - 9). The low molecular weight products resulting from the catalysis would be made up mainly of a mixture of oligosaccharides of 3, 6 and 7 mono- and disulphated fucose units. The biocatalytic characteristics of the #116343 enzyme give it great potential for obtaining fuco-oligosaccharides, which will be evaluated to determine their bioactive properties and potential biotechnological applications. On the other hand, the results obtained in this doctoral thesis increase our knowledge about the diversity of microorganisms with the potential to degrade fucoidans present in microbial communities of intertidal sediments of a Subantarctic environment, particularly organisms that are difficult to culture and little is known about their abilities to assimilate fucoidans.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. Introducción

1.1. Las algas

El término algas se aplica a un numeroso y diverso conjunto de organismos fotosintéticos. Estos organismos comparten las características de ser talófitos, que a diferencia de las plantas vasculares carecen de raíces, hojas y tallos (Delwiche., 2007). Una característica en común en las algas es la presencia de clorofila a, si bien existen particularidades para cada división algal. Entre ellas, se destaca la presencia de otros pigmentos tales como clorofilas b, c ó d, ficobiliproteínas, entre otros, junto con la composición química de la pared celular y de los productos de reserva (Davis *et al.*, 2003). Dentro de las macroalgas, se encuentran tres grandes grupos: algas verdes (Chlorophyta), pardas (Ochrophyta, clase Phaeophyceae) y rojas (Rhodophyta).

1.1.1. Las algas pardas

El *phylum* Ochrophyta se encuentra dividido en 17 clases de acuerdo a la base de datos AlgaeBase (<http://www.algaebase.org>), el cuál incluye algas heterocontas, es decir, que presentan células con dos flagelos desiguales. Las algas pardas se encuentran incluidas dentro de la clase Phaeophyceae, la cual incluye organismos taxonómicamente diversos y ecológicamente importantes en los ambientes marinos (Charrier *et al.*, 2012), siendo muy abundantes en zonas costeras templado-frías (Rioux y Turgeon, 2015). Comprende aproximadamente 2.040 especies, agrupadas en 20 órdenes y 265 géneros (Bringloe *et al.*, 2020; Guiry y Guiry, 2017, Hakim y Patel, 2020, Figura 1.1.). Los órdenes Dictyotales, Ectocarpales, Fucales, Sphacelariales y Laminariales contienen el mayor número de especies (Figura 1.1.).

Las algas pardas presentan diversas variaciones morfológicas abarcando desde formas filamentosas microscópicas hasta organismos que pueden tener hasta 50 m de longitud (Wehr, 2015). Estos organismos se multiplican por reproducción asexual y sexual; tanto las zoosporas como las gametas presentan dos flagelos desiguales, característica que los incluye dentro del supergrupo Heterocontas (Reviere *et al.*, 2007).

Todos los miembros de la clase Phaeophyceae presentan clorofila a, c1 y c2, β -caroteno, diatoxantina y fucoxantina como pigmentos fotosintéticos (Wehr, 2015). El color marrón característico de estos organismos se debe a que el pigmento fucoxantina enmascara a los restantes pigmentos.

1. Introducción

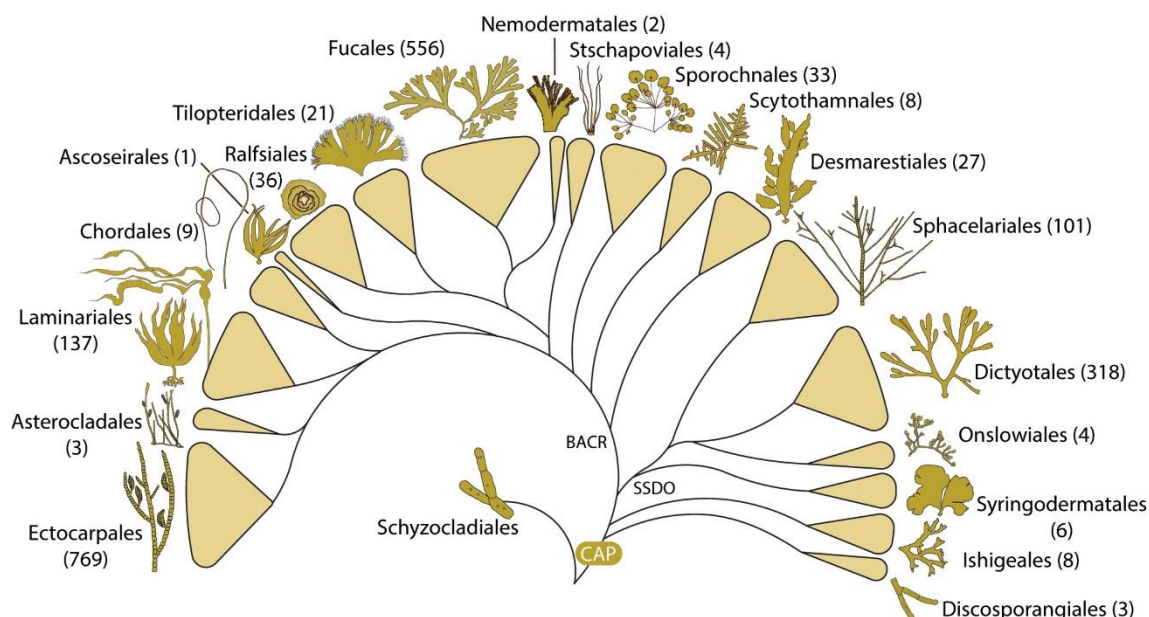


Figura 1.1. Filogenia de los órdenes de algas pardas basado en 12 marcadores moleculares. Entre paréntesis se indica el número de especies que contiene cada orden de acuerdo a la base de datos AlgaeBase (Guiry y Guiry, 2020). CAP: ancestro común de las algas pardas; SSDO: clado constituido por Sphacelariales, Syringodermatales, Dictyotales y Onslowiales; BACR: corona de algas pardas. Fuente: Bringloe *et al.*, 2020.

Dentro de la clase Phaeophyceae se incluyen especies con diferencias en longevidad. Las especies que presentan ciclos de vida restringidos a un período de tiempo de un año son llamadas especies anuales, mientras que aquellas que pueden encontrarse durante más de un año son llamadas perennes (Asensi, 2012). Las especies perennes pueden formar importantes poblaciones denominadas bosques (por ejemplo la especie *Macrocystis pyrifera*) o praderas (especies de los géneros *Lessonia* y *Durvillaea*) [Mendoza y Nizovoy, 2000].

La distribución geográfica de estos organismos resulta muy amplia, abarcando desde regiones tropicales a polares. Las mayoría de las algas pardas se encuentran presentes en el Atlántico noroeste, centro-oeste y suroeste, y en el Pacífico centro-este y suroeste (Hakim y Patel, 2020). Estas algas son más diversas y abundantes en los ambientes fríos, en donde se encuentran sus representantes de mayor tamaño (especies de los órdenes Laminariales y Desmarestiales). En Argentina, estudios de biodiversidad realizados por Luizzi y colaboradores (2011) a lo largo de la zona costera, indicaron una clara tendencia de disminución de la biodiversidad a medida que la latitud disminuye, siendo la mayor riqueza de especies observada en el Sur Patagónico (45 – 54 ° S).

1. Introducción

1.1.1.1. Importancia de las algas pardas en los ambientes costeros

Las algas pardas juegan un rol fundamental en el funcionamiento de los ecosistemas marino-costeros. En particular, diversas especies pertenecientes a los órdenes Laminariales, Tilopteridales, Fucales y Desmarestiales se han propuesto como ingenieros ecosistémicos (Bringloe *et al.*, 2020). Los ingenieros ecosistémicos son organismos cuya presencia altera su entorno y/o modifica el flujo de nutrientes, creando o modificando hábitats, influyendo de esta manera en las especies asociadas (Mullan Crain y Bertness, 2006). Un claro ejemplo lo constituyen los bosques de la especie *M. pyrifera*, dado que proveen refugio y sustrato a una gran variedad de organismos (Luizzi *et al.*, 2011).

Otro aspecto de importancia ecológica se encuentra relacionado con el rol que cumplen las macroalgas en el ciclo del carbono. Durante el proceso fotosintético las algas fijan el dióxido de carbono ambiental, pudiendo capturar altos niveles de CO₂ por unidad de área (Mongin *et al.*, 2016; Jagtap *et al.*, 2021). Parte de la biomasa generada, es transferida a los sedimentos, contribuyendo al almacenamiento del CO₂ fijado, o bien, puede ser degradada por bacterias heterotróficas (Hardison *et al.*, 2010). Estas características determinan a las algas pardas como organismos que contribuyen a la mitigación de los efectos del cambio climático global.

1.1.1.2. Especies de algas pardas con valor ecológico y económico en los ambientes costeros Patagónicos

Los ambientes subantárticos de la Patagonia contienen una alta diversidad de algas pardas, y algunas especies como *M. pyrifera* (Laminariales, Lessoniaceae) forman grandes bosques que alcanza altas biomásas (Vanella *et al.*, 2007; Luizzi *et al.*, 2011). La distribución de esta especie abarca las costas de Chubut, Santa Cruz, Tierra del Fuego, Islas Malvinas e Islas Georgias del Sur. Otra especie de alga parda de gran abundancia es *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Alariaceae), una especie nativa del noroeste de Asia (China, Japón y Corea del Sur), que fue detectada por primera vez en la ciudad de Puerto Madryn en el año 1992 (Casas *et al.*, 2004). Su desarrollo ha cambiado significativamente el ecosistema costero Patagónico, como por ejemplo, modificando la estructura de las comunidades de algas locales y de la fauna bentónica asociada (Irigoyen *et al.*, 2010). La especie *U. pinnatifida* se encuentra también en las costas de Mar del Plata, Bahía

1. Introducción

Camarones y en las bahías del norte del golfo San Jorge hasta la ría de Puerto Deseado (Dellatorre *et al.*, 2014). Esta especie es el recurso algal más abundante de la costa Patagónica, alcanzando más de 5 kg/m² (Balquinta *et al.*, 2022; Raffo *et al.*, 2022).

1.1.1.3. Potencial biotecnológico de las algas pardas

Las algas pardas son consideradas como una importante fuente de compuestos biológicamente activos con efectos benéficos para la salud humana (Lopez-Hortas *et al.*, 2021). Entre los compuestos bioactivos presentes en las algas pardas, los polisacáridos son de especial interés debido a sus propiedades físico-químicas (Synytsya *et al.*, 2015). La concentración de los compuestos bioactivos depende de múltiples factores, relacionados con las condiciones de crecimiento, temperatura del agua, contenido de sal, nutrientes y luz (Kadam *et al.*, 2013).

1.1.1.4. La pared celular de las algas pardas

Las paredes celulares de las algas pardas presentan un alto contenido de polisacáridos, los cuales pueden representar entre un 5 y 76 % del peso del alga seca (Hentati *et al.*, 2020; Sasaki y Yoshikuni, 2022). Si bien la estructura de la pared celular ha sido estudiada en pocas especies de algas pardas, el modelo actual describe su conformación por dos capas, donde una de ellas consiste en un esqueleto de microfibrillas de celulosa y hemicelulosa, siendo, ambos componentes responsables de la rigidez (Sasaki y Yoshikuni, 2022). Por otro lado, la capa restante está constituida por una matriz amorfa conformada por alginatos y fucoidanos. Los fucoidanos y los alginatos abarcan la porción principal de la pared celular, constituyendo hasta un 45 % del peso seco (Trang *et al.*, 2022). En la Figura 1.2. se representa un modelo hipotético de la estructura de la pared celular de un alga parda del orden Fucales (Deniaud-Bouet *et al.*, 2014; Mazéas *et al.*, 2023), donde se pueden observar los componentes anteriormente mencionados, como así también proteínas, iones yoduro y fenoles.

1. Introducción

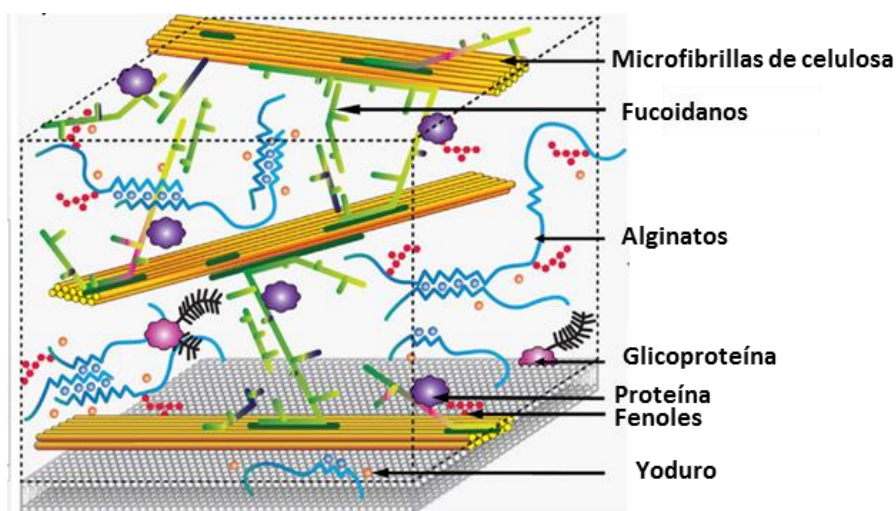


Figura 1.2. Modelo de la pared celular de algas pardas del orden Fucales. Los alginatos y los fucoidanos constituyen los principales polisacáridos. Fuente: Mazéas *et al.*, 2023.

1.1.1.4.1. Función y estructura de los fucoidanos

Si bien han sido pocos los estudios sobre la organización y rol de los fucoidanos en las algas pardas, los trabajos publicados al momento sugieren que los fucoidanos estarían implicados en evitar la deshidratación de las algas durante exposiciones prolongadas al aire, lo que podría explicar el mayor contenido de estos compuestos en especies presentes en la zona del intermareal (Black *et al.*, 1952; Holtkamp *et al.*, 2009).

Se han observado variaciones en el contenido de fucoidanos entre organismos de distintas especies como así también dentro de una misma especie a lo largo de su ciclo de vida. Estos compuestos pueden representar 0,1 a 20 % del peso seco en tejidos tisulares (Zvyagintseva *et al.*, 2003), mientras que en tejidos implicados en la reproducción puede encontrarse entre 1,4 y 69 % (Bruhn *et al.*, 2017). El porcentaje de 69 % fue registrado en esporofilos de la especie *U. pinnatifida* (Mak *et al.*, 2013) el cual corresponde a tejidos implicados en la formación de las zoosporas.

Con respecto a su estructura química, los fucoidanos son polisacáridos sulfatados ricos en fucosa (FCSPs por sus siglas en inglés *Fucose Containing Sulfated Polysaccharides*), la cual puede representar hasta un 90 % de los azúcares componentes (Zayed *et al.*, 2020). La presencia de grupos éster sulfato les otorga carga neta negativa responsable de sus características aniónicas. Los fucoidanos presentan una amplia diversidad estructural, que incluyen el peso molecular, la composición de

1. Introducción

monosacáridos, los tipos de unión y el grado de sulfatación y/o acetilación (Ale y Meyer, 2012).

Los fucoidanos son polisacáridos especie-específicos, esto significa que cada especie sintetiza un fucoidano ó una serie de fucoidanos con estructuras características (Ermakova *et al.*, 2015; Nagao *et al.*, 2018). Hasta el momento, no se ha determinado la estructura de los fucoidanos de la mayor parte de las especies de algas pardas. Además, aún no se ha estudiado en profundidad el proceso de biosíntesis de los fucoidanos, lo cual permitiría comprender porqué algunas especies sintetizan un único tipo de fucoidano, mientras que otras sintetizan un complejo de dichos polisacáridos que se diferencian en la composición de monosacáridos y de grupos sustituyentes (Skriptsova, 2015). Por otro lado, la composición química puede variar de acuerdo a la estación de cosecha de alga, la ubicación geográfica, el hábitat, las condiciones ambientales y el método de extracción de fucoidanos que se aplique (Sasaki y Toshikuni, 2022; Hentati *et al.*, 2020).

Dependiendo de la estructura de la cadena central, los fucoidanos pueden ser categorizados como α -(1→3)- ó α -(1→3)/(1→4)- (Usov *et al.*, 2022). Los fucoidanos con uniones α -(1→3)- presentan un esqueleto de residuos de α -L-fucosa unidos mediante enlaces α -(1→3)-O-glicosídicos (Trang *et al.*, 2022, Figura 1.3.A). Este patrón suele estar presente en fucoidanos de especies de los órdenes Laminariales, Chordales y Ectocarpales (Ale y Meyer, 2012; Shen *et al.*, 2020). Los fucoidanos α -(1→3)/(1→4)- presentan un esqueleto de uniones α -(1→3) y α -(1→4)- entre los residuos de fucosa (Bilan *et al.*, 2002, Figura 1.3.B), y suelen encontrarse en algas pardas del orden Fucales (Shen *et al.*, 2020), aunque también en algunas especies de dicho orden se han identificado enlaces α -(1→2)- (Hentati *et al.*, 2020). El grupo estructuralmente más diverso de fucoidanos son los galactofucanos sulfatados, los cuales presentan una compleja estructura con alto contenido de fucosa y galactosa con variaciones en los tipos de unión glicosídica (Trang *et al.*, 2022).

1. Introducción

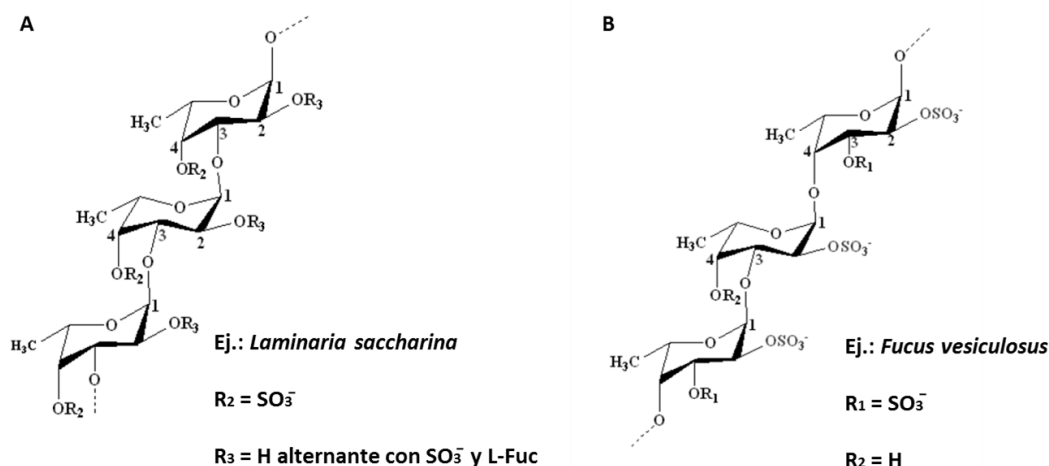


Figura 1.3. Modelos de la estructura química de fucoidanos de dos especies de algas pardas.

A) La cadena principal está constituida por residuos de L-Fucp con enlaces α -(1→3)- ramificados en C2. Los grupos sulfato se suelen encontrar en el C2 y/ó en C4. Este es un modelo representativo de especies de los órdenes Laminariales, Ectocarpales y Chordales. B) Unidades repetitivas de residuos de L-Fucp unidos mediante enlaces glicosídicos alternantes α -(1→4)- y α -(1→3)-. Los grupos sulfato se pueden encontrar en la posición C2, C3 y/ó en C4. Es un patrón característico de algunas especies pertenecientes al orden Fucales. En ambos casos pueden encontrarse otros azúcares minoritarios tales como manosa o galactosa y grupos acetilo. Fuente: Zayed *et al.*, 2020.

Los residuos de α -L-fucosa a menudo se encuentran sustituidos por grupos sulfato, grupos acetilo u otros monosacáridos (Figura 1.3. y Figura 1.4.). En las especies del orden Laminariales, los grupos éster sulfato suelen encontrarse en las posiciones C2 y/ó en C4 (raramente en 3) (Figura 1.3.A., Qiu *et al.*, 2022), mientras que en las Fucales los grupos sulfato suelen encontrarse en la posición C2, C3 y/ó en C4 (Figura 1.3.B., Zayed *et al.*, 2020; Qiu *et al.*, 2022). Para las sustituciones de los grupos acetilo no existen reportes de patrones característicos para los distintos órdenes (Li *et al.*, 2008, Zayed *et al.*, 2020).

Dentro de las metodologías empleadas en la determinación de la posición del grupo sulfato de los fucoidanos se incluyen la espectroscopía infrarroja, la desulfatación y el análisis de metilación (Li *et al.*, 2008). Por otro lado, la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectroscopía de masas (MS) también se pueden utilizar para analizar la presencia y posición de los grupos sulfato en los fucoidanos (Mabate *et al.*, 2020).

Con respecto a los monosacáridos, cuya composición puede llegar a ser menor al 10 %, suelen encontrarse: D-galactosa (Gal, en general unida en O-3 ó en O-6), D-manosa (Man, enlazada a través de O-2), ácido glucurónico (GlcA en O-3 ó O-4), L-

1. Introducción

ramnosa (Ram, sin determinar) y D-xilosa (Xil, en O-4) (Ponce *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2021; Ale y Meyer, 2012). La estructura de las principales unidades monosacáridicas se indican en la Figura 1.4.

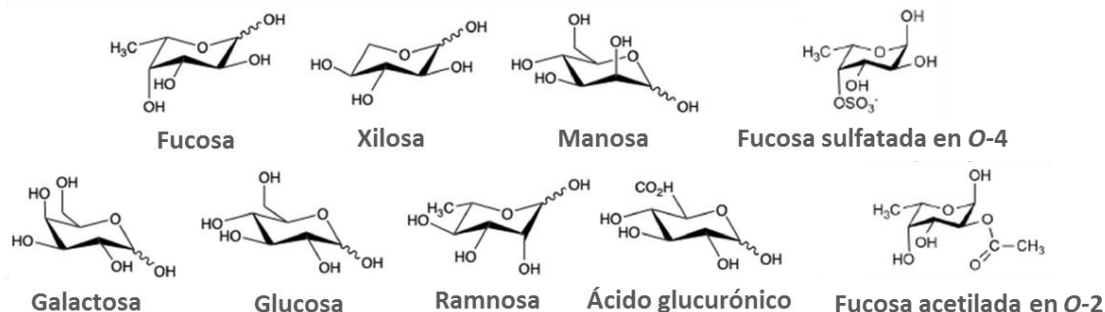


Figura 1.4. Principales unidades monosacáridicas estructurales encontradas en los fucoidanos. Estos compuestos pueden encontrarse como unidades terminales no reductoras, o bien, unidos a través de algún grupo hidroxilo libre. Fuente: Ponce *et al.*, 2020; Yao *et al.*, 2021.

1.1.1.4.2. Peso molecular de los fucoidanos

El peso molecular de los fucoidanos es altamente variable, pudiendo ser desde 7 kDa a aproximadamente 10.000 kDa, siendo el tamaño promedio de aproximadamente 20 kDa (Holtkamp *et al.*, 2009; Lim y Wan Aida, 2017; Wang *et al.*, 2019). La considerable variación en el tamaño de los fucoidanos ha llevado a la siguiente categorización: fucoidanos de bajo peso molecular (LMWF de sus siglas en inglés, *Low Molecular Weight Fucoidan*) cuando el tamaño es < 10 kDa, fucoidanos de peso molecular medio (MMWF) si tiene un tamaño entre 10 y 10.000 kDa y fucoidanos de alto peso molecular (HMWF) cuando tiene un tamaño > 10.000 kDa (Senthilkumar *et al.*, 2013).

1.1.1.4.3. Propiedades bioactivas de los fucoidanos

Los fucoidanos presentan una gran variedad de actividades biológicas, las cuales han sido evaluadas tanto *in vitro* como *in vivo*. Dentro de las propiedades biológicas se encuentran: actividad prebiótica, anti-viral, antibacteriana, anticoagulante, anti-tumoral, antioxidante, anti-inflamatoria e inmunomoduladora (Figura 1.5., Wang *et al.*, 2019). En este contexto, los fucoidanos presentan un gran potencial para su aplicación en distintas industrias, entre ellas, nutracéutica, cosmética y farmacéutica. Las actividades biológicas de los fucoidanos se encuentran asociadas a varios parámetros, por ejemplo, fucoidanos con bajo contenido de xilosa y alto contenido de galactosa presentaron mayor actividad anticoagulante (Yao *et al.*, 2021). Otras de las características que influyen en las propiedades bioactivas son el grado de sulfatación y acetilación, el peso molecular, la

1. Introducción

composición de monosacáridos y el tipo de enlace glicosídico (Soeda *et al.*, 2000; Ale *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2021). Numerosos trabajos indican que el principal factor lo constituye el contenido y ubicación de los grupos sulfatos (Zhu *et al.*, 2021). Debido a ello, fucoidanos con alto grado de sulfatación resultan de especial interés en aplicaciones biomédicas (Kusaykin *et al.*, 2016).

Las aplicaciones comerciales de los fucoidanos se encuentran restringidas por numerosos factores, entre ellos: la dificultad para obtener compuestos de alta pureza a partir de la biomasa de las algas pardas, su complejidad y diversidad estructural y el alto peso molecular que resulta en una baja absorción intestinal y baja solubilidad (Molinski *et al.*, 2009; Jagtap *et al.*, 2021.; Trang *et al.*, 2022; Zayed *et al.*, 2022; Yao *et al.*, 2023). Es por ello que el grado de polimerización constituye un factor clave en las actividades biológicas (Qiu *et al.*, 2022). En este contexto, los fuco-oligosacáridos sulfatados resultantes de la degradación controlada de los fucoidanos, presentan bajo peso molecular, son fácilmente absorbidos y solubles, con bioactividades similares al fucoidano nativo o incluso pudiendo llegar a ser mayores (Zhu *et al.*, 2021).

Es importante señalar que la mayoría de los estudios sobre bioactividad de los fucoidanos han sido realizados con extractos comerciales pobremente purificados y sin caracterizar, por lo que no existe una correlación definida entre la estructura y la actividad biológica que presentan (Kiselevskiy *et al.*, 2022).



Figura 1.5. Propiedades biológicas de los fucoidanos.

1. Introducción

Los fuco-oligosacáridos pueden obtenerse a partir de los fucoidanos mediante métodos químicos, físicos o enzimáticos. En la hidrólisis química y física, los polisacáridos son tratados de forma inespecífica, donde en el primer caso el tratamiento es llevado a cabo con ácidos y sometidos a altas temperaturas durante varias horas (Lee y Lee, 2016; Zhu *et al.*, 2021), mientras que en el segundo caso se genera la ruptura del polisacárido mediante ultrasonido ó microondas (Qiu *et al.*, 2022). Durante estos procesos, la integridad del fucoidano se ve afectada, conduciendo a la pérdida de los grupos sulfato y posiblemente de sus propiedades bioactivas (Zhu *et al.*, 2021). Otra desventaja de estos métodos es que durante el proceso se suelen generar productos secundarios que resultan tóxicos para la salud humana limitando su posterior aplicación (Jagtap *et al.*, 2021). Por el contrario, durante la hidrólisis enzimática, los polisacáridos son degradados por enzimas específicas que catalizan la ruptura de los enlaces glicosídicos generando fuco-oligosacáridos con estructura más definida (Xu, Kan *et al.*, 2018; Xu, Su *et al.*, 2018), brindando una mayor consistencia en la estructura química entre las distintas reacciones. Por lo tanto, la hidrólisis enzimática se considera una mejor estrategia para producir oligosacáridos bioactivos (Descamps *et al.*, 2006). Estas enzimas pueden provenir de microorganismos presentes en distintos hábitats marinos, en particular de aquellos ambientes que contienen una alta biomasa de algas pardas.

1.2. Microorganismos degradadores de los polisacáridos de las algas pardas

Los polisacáridos de las macroalgas constituyen una fuente de carbono y energía importante para los microorganismos de ambientes costeros. Estos microorganismos cumplen un rol fundamental en los ecosistemas como impulsores de los ciclos biogeoquímicos y como componentes claves en la descomposición de materia orgánica (Allison, 2005).

El proceso de asimilación generalmente comienza con la degradación enzimática de compuestos de alto peso molecular fuera de las células microbianas. Las enzimas extracelulares son por lo tanto las principales impulsoras en este proceso (Arnosti, 2014). Esto se debe a que mientras las moléculas pequeñas pueden ser directamente transportadas al interior de las células microbianas, las de gran tamaño como los polisacáridos deben primero ser degradadas en el exterior de la célula antes de poder

1. Introducción

ser transportadas para su procesamiento e incorporación al metabolismo central de la célula (Arnosti, 2014; Michel *et al.*, 2006).

Debido a que las enzimas despolimerizantes actúan fuera de la célula, los productos de hidrólisis pueden ser aprovechados por microorganismos que no necesariamente secretan sus propias enzimas (Traving *et al.*, 2022). En general, la actividad microbiana de enzimas extracelulares presenta mayores tasas de producción en ambientes bentónicos en comparación con los pelágicos (Allison, 2005). Estas diferencias pueden interpretarse como resultado de una estrategia costo-beneficio, en donde el retorno de la inversión en la producción de enzimas extracelulares es mayor en sedimentos debido a su organización en biofilms (Arnosti, 2014).

1.3. Clasificación de las enzimas activas sobre carbohidratos

La clasificación de enzimas que presentan como sustrato a los carbohidratos, basada en homología de secuencias, se encuentra recopilada en la base de datos CAZy (Enzimas Activas sobre Carbohidratos, www.cazy.org). La base de datos incluye un listado de módulos o dominios catalíticos de enzimas que degradan, modifican o crean enlaces glicosídicos (Lombard *et al.*, 2014; Drula *et al.*, 2022). Por lo tanto, este servidor incluye a un amplio espectro de enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, a menudo denominadas en inglés *CAZymes* (por *Carbohydrate-Active enZymes*), como así también módulos de unión a carbohidratos. Dentro de los módulos que catalizan la ruptura, biosíntesis o modificación de carbohidratos se encuentran las siguientes clases:

- Glicósido hidrolasas (GH): catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos.
- Glicosiltransferasas (GTs): catalizan la formación de enlaces glicosídicos.
- Polisacárido Liasas (PL): catalizan la escisión no hidrolítica de enlaces glicosídicos.
- Carbohidrato Esterasas (CES): producen hidrólisis de ésteres de hidratos de carbono.
- Actividades Auxiliares (AAS): enzimas redox que actúan en conjunto con otras *CAZymes*.

Las enzimas GH representan la clase más numerosa, compuesta por un total de 184 familias, las cuales catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico entre dos azúcares ó

1. Introducción

entre un azúcar y otra parte de la molécula no carbohidrato (Lombard *et al.*, 2010). Algunas GH son enzimas multifuncionales debido a la presencia de uno o más módulos, que pueden pertenecer a distintas familias. La clasificación de estas enzimas continúa evolucionando, ya que existen numerosas secuencias de GH que aún no han sido clasificadas en familias, y se crean familias nuevas a partir de enzimas caracterizadas. Por otra parte, existe una baja proporción de enzimas dentro de cada familia que ha sido caracterizada enzimáticamente, siendo mucho menor la proporción de enzimas con estructura tridimensional determinada experimentalmente.

1.3.1. Enzimas bacterianas que participan en la asimilación y degradación de fucoidanos

Actualmente, las vías de degradación de las moléculas de fucoidano se conocen sólo parcialmente dado que dichos estudios se ven afectados por la gran diversidad estructural de dichos polisacáridos y la dificultad para determinar sus estructuras (Vuillemin *et al.*, 2020). Hasta la fecha, solo se han expresado y caracterizado bioquímicamente unas pocas enzimas implicadas en la despolimerización, desulfatación y desacetilación de los fucoidanos (Nagao *et al.*, 2017; Silchenko, Rasin *et al.*, 2018). Dada la complejidad estructural presente en estos polisacáridos, múltiples enzimas estarían involucradas en su degradación (Figura 1.6).

1. Introducción

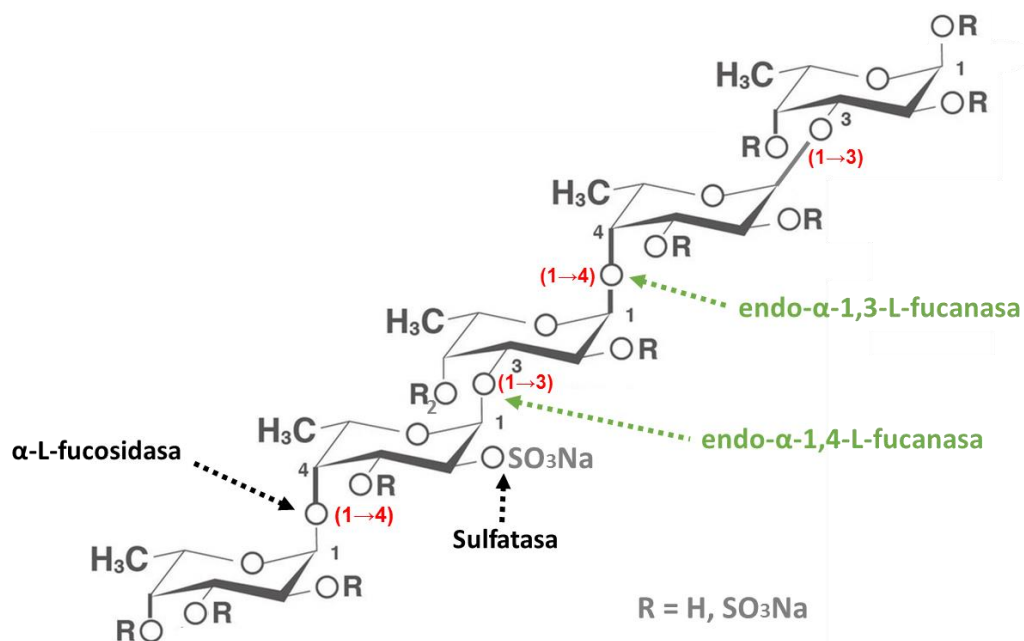


Figura 1.6. Enzimas que despolimerizan fucoidanos. Las enzimas fucoidanasas escinden enlaces internos α -(1 \rightarrow 3)- ó α -(1 \rightarrow 4)- de las moléculas de fucoidano, mientras que las α -L-fucosidasas actúan sobre los enlaces de los extremos terminales no reductores. Las enzimas sulfatasas catalizan la escisión de grupos éster sulfato. Fuente: adaptado de Hsu y Hwang, 2019.

La estructura ramificada que presentan los fucoidanos protege estéricamente los enlaces glicosídicos de la hidrólisis enzimática, y es por ello que enzimas como α -L-fucosidasas, sulfatasas y acetilasas deberían actuar previo a la actividad de las enzimas fucoidanasas dado su actividad en los enlaces internos de las moléculas de fucoidano (Berteau *et al.*, 2002). Por lo tanto, las rutas metabólicas utilizadas para la asimilación de los fucoidanos probablemente involucren un número sustancial de enzimas distribuidas dentro de una comunidad microbiana o bien, en bacterias individuales pero altamente especializadas (Sichert *et al.*, 2020). Otro obstáculo a este tipo de estudios puede deberse a la existencia de un efecto sinérgico entre las distintas enzimas que despolimerizan los fucoidanos, dificultando aún más el estudio bioquímico individual de las enzimas. Las enzimas que actúan en conjunto frente a un sustrato suelen estar reguladas por unidades operadoras. Estas unidades son características de miembros del *phylum* Bacteroidota, y son llamadas loci de utilización de polisacáridos (PULs, por sus siglas en inglés), cuya característica son el sistema de transportadores SusC/SusD en tándem (Schultz-Johansen *et al.*, 2018; Sichert, 2019).

1. Introducción

1.3.1.1. α -L-Fucosidasas

Las enzimas α -L-fucosidasas (códigos enzimáticos: 3.2.1.51., 3.2.1.63., 3.2.1.111. y 3.2.1.127.) actúan sobre las moléculas de fucoidano ó fucósidos, exhibiendo una exohidrólisis (Figura 1.6.), removiendo la fucosa de extremos no reductores (Wright *et al.*, 2013; Silchenko *et al.*, 2022) generando monosacáridos de fucosa. Se encuentran mayormente incluídas dentro de las familias GH29 y GH95 en la base de datos CAZy. Los miembros de la familia GH29 presentan actividad α -(1 \rightarrow 2)-, α -(1 \rightarrow 3)-, α -(1 \rightarrow 4)- y α -(1 \rightarrow 6)- en varios glicoconjugados, mientras que las enzimas fucosidasas de la familia GH95 son específicas de enlaces α -(1 \rightarrow 2)- en oligosacáridos (Silchenko *et al.*, 2022).

1.3.1.2. Sulfatasas

Las enzimas sulfatasas (EC 3.1.6.*. y EC 3.10.1.*.) catalizan la hidrólisis de los grupos éster sulfato (Figura 1.6.) presentes en polisacáridos sulfatados (Kusaykin *et al.*, 2008; Silchenko, Rasin *et al.*, 2018; Silchenko *et al.*, 2018). Estas enzimas se agrupan en 4 familias (S1-S4) de acuerdo a la homología de secuencia, la estructura cristalográfica y los mecanismos de acción en la base de datos SulfAtlas (Helbert *et al.*, 2017; Stam *et al.*, 2023).

1.3.1.3. Desacetilasas

Las enzimas desacetilasas (EC 3.5.1.*.) pertenecen a la clase Carbohidrato Esterasas (CE) en el sistema de clasificación CAZy e hidrolizan los grupos acetilo presentes en las moléculas de fucoidanos liberando ácido acético (Sakai *et al.*, 2006).

1.3.1.4. Fucoidasas

Las enzimas fucoidasas (ó fucoidano hidrolasas ó fucanasas) catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos α -(1 \rightarrow 3)- ó α -(1 \rightarrow 4)- internos de las moléculas de fucoidanos (modo de acción endo-), generando productos con distinto grado de polimerización (Wang *et al.*, 2022). Estas enzimas son producidas por bacterias y actúan de forma extracelular (Tran *et al.*, 2022). Basado en la similitud de secuencias a nivel de aminoácidos, estructura o especificidad del enlace glicosídico que reconocen, las enzimas fucoidasas se encuentran clasificadas dentro de la base de datos CAZy (hasta el momento) en tres familias GH: GH107, GH168 y GH174 (Lombard *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2020; Drula *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2023).

1. Introducción

Por otra parte, existen enzimas fucoidanasas que aún no han sido clasificadas dentro de ninguna familia CAZy, tal es el caso de la enzima endo-fucoidano liasa FdIA de *Flavobacterium* sp. SA-0082 (Wang *et al.*, 2022), la cuál cataliza la hidrólisis de un fucoglucuronomanano sulfatado de *Kjellmaniella crassifolia* (Kj-fucoidano).

De acuerdo con la nomenclatura del comité de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las enzimas fucoidanasas pertenecen a una de las clases más importantes llamada hidrolasas, las cuales mediante un mecanismo hidrolítico escinden diferentes tipos de uniones químicas. El código enzimático para estas enzimas es EC 3.2.1.*., donde el primer número hace referencia a su actividad hidrolasa, el segundo a enzimas glicosidasas y el tercero a que hidrolizan enlaces O- y S-glicosídicos. La familia GH107 incluye enzimas endo- α -1,4-L-fucanasas (EC 3.2.1.212) y endo- α -1,3-L-fucanasas (EC 3.2.1.211), mientras que la familia GH168 y GH174 incluyen enzimas endo- α -1,3-L-fucanasas (EC 3.2.1.211). La familia GH174 es de muy reciente constitución y a la fecha de presentación de esta tesis doctoral, dicha familia incluye 94 miembros de los cuales cuatro se tratan de enzimas caracterizadas (Liu *et al.*, 2023).

1.3.1.4.1. Familia GH107

Esta familia incluye enzimas fucoidanasas que reconocen enlaces α -(1 \rightarrow 4)- y enzimas que reconocen enlaces α -(1 \rightarrow 3)- en las moléculas de fucoidanos. A la fecha de la presentación de esta tesis, se han incorporado 36 secuencias de enzimas pertenecientes a la familia GH107 de la base de datos CAZy, las cuales se indican en la Tabla 1.1. Las secuencias incluídas dentro de la familia GH107 pertenecen a organismos de solo dos *phyla*, entre ellos el *phylum* Pseudomonadota (clase Gammaproteobacteria) y el *phylum* Bacteroidota (clases Flavobacteriia y Cytophagia). Doce de las enzimas han sido caracterizadas (en negrita en la Tabla 1.1.) donde nueve de ellas fueron identificadas en organismos cultivados de las clases Flavobacteriia o Gammaproteobacteria (Colin *et al.*, 2006; Silchenko *et al.*, 2017; Silchenko *et al.*, 2018; Vickers *et al.*, 2018; Tran *et al.*, 2022; Trang *et al.*, 2022; Vuillemin *et al.*, 2020; Zueva *et al.*, 2020), mientras que las tres restantes fueron identificadas en una bacteria no cultivada posiblemente de la clase Gammaproteobacteria (Schultz-Johansen *et al.*, 2018).

1. Introducción

Análisis bioinformáticos realizados por Colin y colaboradores (Colin *et al.*, 2006) determinaron que el dominio ubicado cerca del extremo amino-terminal (N-terminal), de aproximadamente 400 residuos, es responsable de la actividad fucoidanasa (GH107 en Figura 1.7.). El dominio catalítico, conservado entre los distintos miembros de la familia GH107 (Vickers *et al.*, 2018) adopta una estructura (β/α) barril (Colin *et al.*, 2006; Vickers *et al.*, 2018). Los mismos autores determinaron una arquitectura multidominio en la enzima FcnA perteneciente al organismo *M. fucanivorans* SWT5, con 3 módulos sucesivos *Ig-like-fold* adyacentes al módulo catalítico (Ig-R1/3, Figura 1.7.), seguido de un dominio de cadenas β ($\alpha\beta$ -strand) y de un módulo secretor carboxilo-terminal (C-terminal) llamado PSS, el cual resulta característico de proteínas pertenecientes a organismos del *phylum* Bacteroidota aunque aún con función desconocida. Se ha propuesto que los módulos estructurales *Ig-R* podrían estar implicados en el reconocimiento del sustrato, como así también en la actividad enzimática (Colin *et al.*, 2006; Schultz-Johansen *et al.*, 2018).



Figura 1.7. Estructura modular de la enzima FcnA de *M. fucanivorans* SWT5. S: péptido señal, GH107: módulo catalítico, Ig R1/R2/R3: módulos *Inmunoglobulin-like* (IPR013728), $\alpha\beta$ -st: dominio de cadenas β y PSS: dominio secretor C-terminal (IPR026444). Adaptado de Zueva *et al.*, 2020.

Otros dominios identificados en otras enzimas fucoidanasas fueron *ConA* (Convalina A-like), *Pept* y módulos con función secretora en la región C-terminal (Vickers *et al.*, 2018; Schultz-Johansen *et al.*, 2018; Vuillemin *et al.*, 2020). Las diferencias encontradas en la arquitectura modular podrían estar relacionadas con la especificidad de sustrato de las distintas enzimas fucoidanasas. Sin embargo, son necesarios estudios más detallados para determinar su implicancia en la actividad catalítica.

1. Introducción

Tabla 1.1. Enzimas fucoidanasas pertenecientes a la familia GH107 reportadas hasta el momento.

Nombre de la proteína	GenBank ⁽¹⁾	Longitud (aa)	Organismo	Linaje
FcnA	CAI47003	1007	<i>Mariniflexile fucanivorans</i> SWT5	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
Fda1 (fucanase)	AAO00508	814	<i>Alteromonas</i> sp. SN-1009	Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Alteromonadaceae
Fda2 (fucanase)	AAO00509	881	<i>Alteromonas</i> sp. SN-1009	Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Alteromonadaceae
SVI_0379	BAJ00350	574	<i>Shewanella violaceae</i> DSS12	Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Shewanellaceae
AXE80_07420 FWf3	ANW96115	967	<i>Wenyngzhuangia fucanilityca</i> CZ1127	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
AXE80_07425 FWf4	ANW96116	106	<i>Wenyngzhuangia fucanilityca</i> CZ1127	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
AXE80_07310 FWf2	ANW96098	883	<i>Wenyngzhuangia fucanilityca</i> CZ1127	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
AXE80_07305 FWf1	ANW96097	800	<i>Wenyngzhuangia fucanilityca</i> CZ1127	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
HOI32_15585	QXP78609	650	<i>Winogradskyella</i> sp. HaHa_3_26	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
Fp277	AYC81239	797	uncultured bacterium	-
Fp279	AYC81240	813	uncultured bacterium	-
Fp273	AYC81238	964	uncultured bacterium	-
P19DFcnA	AYF59292	403	<i>Psychromonas</i> sp. SW19D	Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Psychromonadaceae
P5AFcnA	AYF59291	403	<i>Psychromonas</i> sp. SW5A	Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Psychromonadaceae
D1818_06655	AXT50525	998	<i>Aquimarina</i> sp. BL5	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
D1818_06650	AXT50524	1322	<i>Aquimarina</i> sp. BL5	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
Fleli_2704	AFM05060	406	<i>Bernardetia litoralis</i> DSM 6794	Bacteroidota; Cytophagia; Cytophagales; Bernardetiaceae
FNC79_00785	QDO92576	403	<i>Formosa sedimentorum</i> PS13	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
HOI28_09980 (fragment)	QXP65547	667	<i>Polaribacter</i> sp. AHE13PA	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
HOI28_09940	QXP65540	661	<i>Polaribacter</i> sp. AHE13PA	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae

1. Introducción

Nombre de la proteína	GenBank ⁽¹⁾	Longitud (aa)	Organismo	Linaje
H0I28_09905	QXP65533	1104	<i>Polaribacter</i> sp. AHE13PA	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
H0I27_14435	QXP63037	666	<i>Polaribacter</i> sp. HaHaR_3_91	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
H0I27_14390	QXP63030	661	<i>Polaribacter</i> sp. HaHaR_3_91	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
H0I27_14350	QXP63024	1104	<i>Polaribacter</i> sp. HaHaR_3_91	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
SAMN05216503_2399	SDS23234	667	<i>Polaribacter</i> sp. KT25b	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
SAMN05216503_2391	SDS22959	663	<i>Polaribacter</i> sp. KT25b	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
H0I29_02875	QXP71054	1104	<i>Polaribacter</i> sp. R2A056_3_33	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
H0I29_02900	QXP71059	661	<i>Polaribacter</i> sp. R2A056_3_33	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
H0I29_02945 (fragment)	QXP71066	667	<i>Polaribacter</i> sp. R2A056_3_33	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
FFA2	WP_057784219	918	<i>Formosa algae</i> KM3553	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
Fhf1	WP_066217780	1118	<i>Formosa haliotis</i>	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
Fhf2	WP_066217784	910	<i>Formosa haliotis</i>	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
OL739608	UZH25096	1014	<i>Flavobacterium algicola</i> OUC	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
Mef2	WP_055392200	1067	<i>Muricauda eckloniae</i>	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae
NYR89_09320	WGE89193	686	<i>Actinobacillus arthritidis</i> CCUG24862	Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Pasteurellales; Pasteurellaceae
fucoidanase	BDG62585	625	<i>Flavobacterium</i> sp. SW	Bacteroidota; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae

(1) Número de acceso a la base de datos GenBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). En negrita se indican las enzimas fucoidanasas que han sido caracterizadas hasta el momento.

1. Introducción

Estructura y mecanismo de acción

Hasta el momento, se ha reportado la estructura tridimensional de dos enzimas fucoidanasas de la familia GH107 (Vickers *et al.*, 2018), las cuales fueron obtenidas a partir de técnicas cristalográficas (Rayos X) y depositadas en la base de datos PDB (*Protein Data Bank*). Una de ellas corresponde a la enzima P5AFcnA (PDB: 6M8N, 1,55 Å) de *Psychromonas* sp. SW5A, mientras que la segunda incluye dos formas truncadas de la enzima FcnA, llamadas MfFcnA4 (Gln29-Ser734, PDB: 6DLH, 2,20 Å) y MfFcnA9 (Gln29-Asp623, PDB: 6DNS, 2,24 Å), y una forma mutante llamada MfFcnA4 H294Q (PDB: 6DMS, 2,85 Å) del organismo *M. fucanivorans* SW5T. En análisis basados en la similitud estructural con una enzima α -L-fucosidasa (GH29), se determinó que las enzimas fucoidanasas presentarían un modo de acción de hidrólisis basado en retención (Vickers *et al.*, 2018). En este mecanismo de retención, la cadena lateral de un residuo de histidina (H294 en FcnA) actuaría como ácido/base, mientras que la cadena lateral de un residuo de aspartato (D226 en FcnA) actúa como nucleófilo (Figura 1.8.).

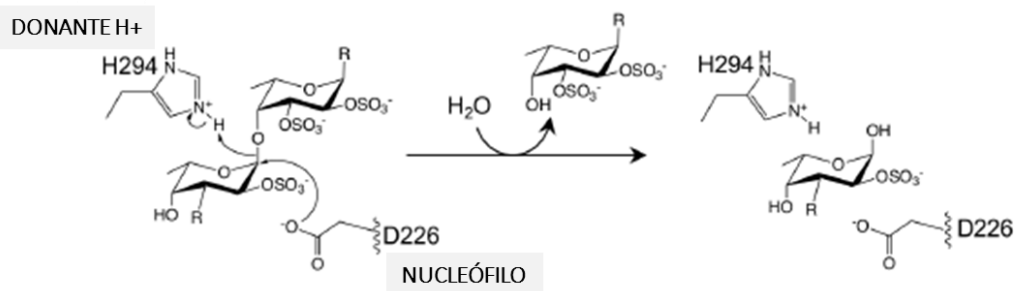


Figura 1.8. Mecanismo catalítico propuesto para la enzima FcnA de *Mariniflexile fucanivorans* SWT5. En la hidrólisis enzimática, el aminoácido histidina (H294) actúa como donante de protones y el aspartato (D226) como nucleófilo. Adaptado de Vickers *et al.*, 2018.

Además de los residuos catalíticos, se han descrito los aminoácidos que constituyen el subsitio -1, los cuales están implicados en el reconocimiento del sustrato. Estos aminoácidos son tirosina en la posición 142, asparagina en la posición 144, asparagina en la posición 266 y triptófano en la posición 364 de la enzima Fhf1 proveniente de *Formosa haliotis* (Vuillemin *et al.*, 2020). Todos los aminoácidos del subsitio -1 se encuentran conservados entre miembros de la familia GH107, a excepción del aminoácido de la posición 144 (Tran *et al.*, 2022). Las variaciones encontradas se han asociado al tipo de enlace (1→3 ó 1→4) que reconocería la enzima (Vuillemin *et al.*,

1. Introducción

2020). Sin embargo, dado el escaso número de secuencias y de enzimas caracterizadas en la familia GH107, la contribución del residuo ubicado en esta posición u otros aspectos estructurales de las mismas sobre la especificidad de la enzima aún debe ser investigada en detalle (Tran *et al.*, 2022).

1.2.1.3.2. Familia GH168

Esta familia incluiría enzimas fucoidanasas que reconocen y catalizan la ruptura de enlaces α -(1→3)- en las moléculas de fucoidanos. Sólo se ha caracterizado una enzima en esta familia, llamada FunA e identificada en la bacteria *Wenyongzhungia fucanilytica* CZ1127 (Shen *et al.*, 2020), perteneciente al *phylum* Bacteroidota. A la fecha de presentación de esta tesis, la base datos CAZy incluía 53 secuencias en dicha familia, identificadas en miembros de los *phyla* Bacteroidota, Planctomycetota, Actinomycetota, Lentisphaerota y Pseudomonadota.

Al igual que las enzimas de la familia GH107, los miembros de la familia GH168 presentarían un modo de acción de hidrólisis basado en retención (Shen *et al.*, 2020), donde los residuos aspartato (D206) y ácido glutámico (E264) de FunA serían residuos críticos para la actividad catalítica, aunque aún no se ha determinado cual de ellos actuaría como nucleófilo y cuál como ácido/base (Shen *et al.*, 2020).

1.2.1.4.2. Metodologías para la determinación de la actividad fucoidanasa

Existen muy pocos estudios sobre la caracterización bioquímica de las enzimas fucoidanasas. Esto se debe a varias razones: la falta de un método cuantitativo para la determinación de la actividad catalítica como así también la ausencia de un sustrato estándar, utilizándose sustratos poco caracterizados o parcialmente purificados (Imbs *et al.*, 2018). Sin embargo, se han desarrollado métodos para la detección de la actividad.

a) Electroforesis en gel de poliacrilamida de carbohidratos (C-PAGE): Los métodos electroforéticos han sido ampliamente utilizados para el estudio de la estructura de glicosaminoglicanos (GAGs), como así también en el estudio de actividad de enzimas glicósido hidrolasas y liasas (Volpi *et al.*, 2006, Bodet *et al.*, 2016). Este método es el más utilizado para determinar actividad fucoidanasa a pesar de ser costoso y requerir mucho tiempo (Kusaykin *et al.*, 2016). Esta técnica permite visualizar los

1. Introducción

oligosacáridos sulfatados resultantes de la catálisis enzimática, los cuales se resuelven en un gel de poliacrilamida de acuerdo a su peso molecular y carga (Cao, 2019). Otra desventaja es que no existe un patrón estándar de oligosacáridos sulfatados que esté comercialmente disponible, resultando necesario combinar la técnica con otros métodos, como por ejemplo, métodos cromatográficos o espectrométricos.

b) Ensayo en placas con agarosa: Este ensayo ha sido aplicado a colonias de bacterias creciendo en medio de cultivo sólido conteniendo fucoidanos (Silchenko *et al.*, 2015). Luego de un determinado período de incubación, la actividad fucoidanasa es revelada por el agregado del detergente catiónico CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio). Este método está basado en la capacidad del CTAB en formar sales insolubles de coloración blanquecina en presencia de fucoidanos sulfatados de alto peso molecular (Kusaykin *et al.*, 2014). Los fucoidanos degradados enzimáticamente tienen una baja densidad de carga y no precipitan en presencia del detergente, observándose regiones con halos transparentes (Silchenko *et al.*, 2015).

c) Precipitación con albúmina sérica bovina (BSA): La determinación de la actividad fucoidanasa se aplica en cultivos de microorganismos creciendo en un medio líquido que contiene fucoidanos (Colin *et al.*, 2006). El cultivo es incubado durante un determinado tiempo y luego se añade una solución ácida de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés). Complejos insolubles se forman entre la BSA y los fucoidanos de alto peso molecular, pero no entre BSA y los oligosacáridos (Kusaykin *et al.*, 2016). Por lo tanto, la actividad fucoidanasa de los microorganismos es determinada por la capacidad de reducir la turbidez luego del agregado de BSA.

d) Métodos colorimétricos. La medición es determinada mediante espectrofotometría luego de la incubación con un determinado reactivo. Estos métodos están basados en la determinación de grupos reductores presentes en los oligosacáridos resultantes de la actividad hidrolítica (Kusaykin *et al.*, 2006). Para el caso de las enzimas GH168 se utiliza un ácido hidrácido, el cual en medio alcalino reacciona con carbohidratos reductores para dar lugar a compuestos aniónicos de color amarillo (Lever, 1972). Para enzimas de la familia GH107 se han utilizado reacciones con ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959) o el método de Nelson (Nelson, 1944). Sin embargo, los métodos colorimétricos no resultan útiles cuando las enzimas hidrolizan un pequeño

1. Introducción

número de enlaces internos, donde un alto peso molecular de los productos generados puede inhibir el desarrollo del color. Debido a la baja sensibilidad, dichos ensayos no han sido completamente exitosos (Colin *et al.*, 2006).

1.4. Bioprospección microbiana

La bioprospección hace referencia a la búsqueda de compuestos químicos novedosos, genes, proteínas, microorganismos u otros productos que presentan potenciales aplicaciones industriales (De Pascale *et al.*, 2012). La bioprospección se compone de varias etapas que incluyen (a) recolección de muestras, (b) aislamiento de microorganismos o compuestos de interés, (c) detección de actividad y desarrollo de productos, y (d) finalmente comercialización (Hosseini *et al.*, 2022). Las estrategias utilizadas se encuentran basadas en métodos dependientes e independientes del cultivo, las cuales resultan complementarias a la hora de prospectar y caracterizar una amplia diversidad de productos novedosos basado en fuentes biológicas.

1.4.1. Métodos dependientes del cultivo

Este enfoque se encuentra basado en el cultivo de microorganismos que pueden ser identificados por presentar una actividad de interés, como por ejemplo una actividad antimicrobial o catalítica (Vester *et al.*, 2015). A través de estas técnicas se pueden evaluar las características morfo-fenotípicas de los microorganismos, las cuales pueden complementarse con estudios del ADN (Rodrigues *et al.*, 2018). A partir de estas técnicas se pueden obtener cultivos puros que pueden ser posteriormente caracterizados mediante diversos estudios, entre ellos, estudios fisiológicos, metabólicos y genómicos (Heylen *et al.*, 2012).

Las limitaciones de este enfoque incluyen el poco conocimiento de los requerimientos nutricionales como así también de las condiciones de crecimiento necesarias para el crecimiento del microorganismo. Sin embargo, la información obtenida a partir de estudios de organismos cultivados resultan muy útiles para estudiar las capacidades metabólicas de las cepas en forma aislada (Orphan *et al.*, 2000).

1. Introducción

1.4.2. Métodos independientes del cultivo

Los microorganismos, como miembros de comunidades, pueden ser interdependientes metabólicamente o bien utilizar recursos específicos, característica que limita su cultivo en condiciones de laboratorio. Particularmente, en el caso de los microorganismos marinos, se estima que la gran mayoría de los mismos resultan al momento imposibles de cultivar mediante los métodos tradicionales (Handelsman *et al.*, 2002; Akondi y Lakshmi, 2013; Hosseini *et al.*, 2022). Las estrategias independientes del cultivo permiten estudiar las poblaciones microbianas presentes en una comunidad, proporcionando información sobre la estructura y/o el potencial metabólico de la comunidad (Lozada y Dionisi, 2015). En particular, la metagenómica o el estudio de los genomas de los microorganismos de la comunidad, representa una de las herramientas con mayor potencial para la bioprospección microbiana (Kodzius y Gojobori, 2015), ofreciendo la oportunidad de estudiar más ampliamente el potencial biotecnológico de las comunidades microbianas.

El análisis metagenómico comienza con la extracción y purificación del ADN proveniente de una muestra ambiental o de un enriquecimiento generado a partir de la misma (Figura 1.8.). El material genético extraído es llamado “ADN metagenómico” (Gilbert y Dupont, 2011). Este ADN puede utilizarse para la construcción de una biblioteca metagenómica (Streit y Daniel, 2017), o bien puede secuenciarse al azar a través de tecnologías de secuenciación a gran escala (Shokralla *et al.*, 2012, Figura 1.9.).

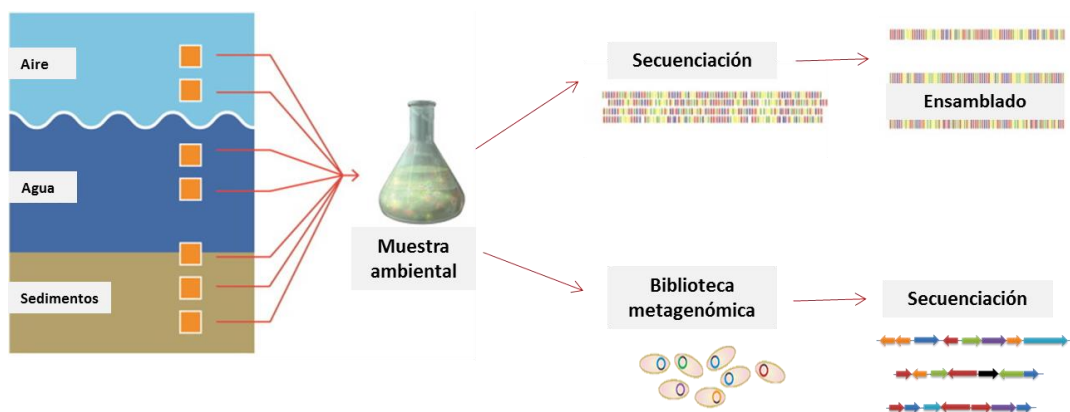


Figura 1.9. Pasos implicados en el análisis de una muestra ambiental. El ADN metagenómico puede ser secuenciado o bien, puede utilizarse para la construcción de una biblioteca metagenómica. Extraído y adaptado de Kodzius y Gojobori, 2015.

1. Introducción

1.4.2.1. Secuenciación al azar del metagenoma

Esta estrategia metagenómica consiste en la secuenciación directa del ADN extraído a partir de una muestra ambiental mediante plataformas de secuenciación en gran escala. A partir de dicha secuenciación, se obtienen lecturas que posteriormente se ensamblan, a los efectos de obtener fragmentos de ADN más largos llamados cóntigos (*contigs*) (Guazzaroni *et al.*, 2009; Gilbert y Dupont, 2011). Los cóntigos se ensamblan nuevamente en fragmentos de mayor longitud, para formar secuencias consenso denominadas supercóntigos (*scaffolds*). El ensamblado resulta una etapa clave en el análisis, dado que la calidad del mismo influye en análisis posteriores tales como la anotación funcional y la asignación taxonómica (Frank *et al.*, 2016). Sin embargo, debido a la alta riqueza de especies microbianas presentes en muchos hábitats marinos y a las variaciones en la abundancia relativa de las mismas dentro de la comunidad, el ensamblado resulta dificultoso. Como consecuencia, los *sets* de datos metagenómicos a menudo consisten en una colección de fragmentos cortos, que son difíciles de asignar taxonómica y funcionalmente (Howe *et al.*, 2014; Oulas *et al.*, 2015). Este proceso continúa siendo un paso limitante para el estudio de ambientes con alta diversidad, como por ejemplo suelos o sedimentos. Una metodología que está siendo utilizada para resolver en parte este problema es el ensamblado de genomas a partir de metagenomas, lo cual permite caracterizar con mayor detalle algunos miembros de la comunidad microbiana.

1.4.2.2. Bibliotecas metagenómicas

La construcción de bibliotecas metagenómicas se realiza clonando fragmentos de ADN metagenómico utilizando vectores y hospedadores adecuados (Singh, 2010). La principal ventaja de esta estrategia es que las bibliotecas constituyen un reservorio del potencial genético de la comunidad microbiana, fácilmente accesibles para posteriores análisis moleculares y funcionales. La búsqueda de los clones de interés constituye, sin embargo, un proceso muy laborioso y en general enfocado en una o unas pocas secuencias ó actividades de interés (Lozada y Dionisi, 2015). Los métodos utilizados incluyen la visualización por medio de color, espectrofotometría o visualmente en medios líquidos y/ó sólidos (Sjolin *et al.*, 2007). Alternativamente, los clones que contiene los genes de interés pueden detectarse por medio de la amplificación de

1. Introducción

fragmentos de los mismos utilizando cebadores de amplia especificidad. Otra estrategia es la secuenciación completa de los fragmentos metagenómicos clonados y su posterior ensamblado, de forma de permitir un análisis basado en secuencias similar al realizado al utilizar la secuenciación al azar de ADN metagenómico. El proceso de ensamblado es más sencillo, obteniéndose *scaffolds* más largos, si bien las secuencias incluidas en el *set* de datos constituyen el potencial genético contenido en la biblioteca metagenómica, y no en el ADN ambiental.

1.5. Biblioteca metagenómica construida a partir de sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina.

Previamente al comienzo de esta Tesis, en el Laboratorio de Microbiología Ambiental (LMA), se construyó una biblioteca metagenómica proveniente de sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia (Loviso, 2015; Guibert, 2016).

1.5.1. Sitio de Estudio

Bahía Ushuaia se ubica en la costa sur de la Isla Grande de Tierra del Fuego (S 54° 48', O 68 ° 17', Figura 1.10.), dentro del Canal de Beagle, el cual conecta los Océanos Pacífico y Atlántico en el extremo sur de Sudamérica. El clima es húmedo y templado-frío, con una temperatura promedio de 2,4 °C entre junio y agosto, y de 9,6 °C entre diciembre y febrero (Dionisi y Lozada, 2011).

1. Introducción

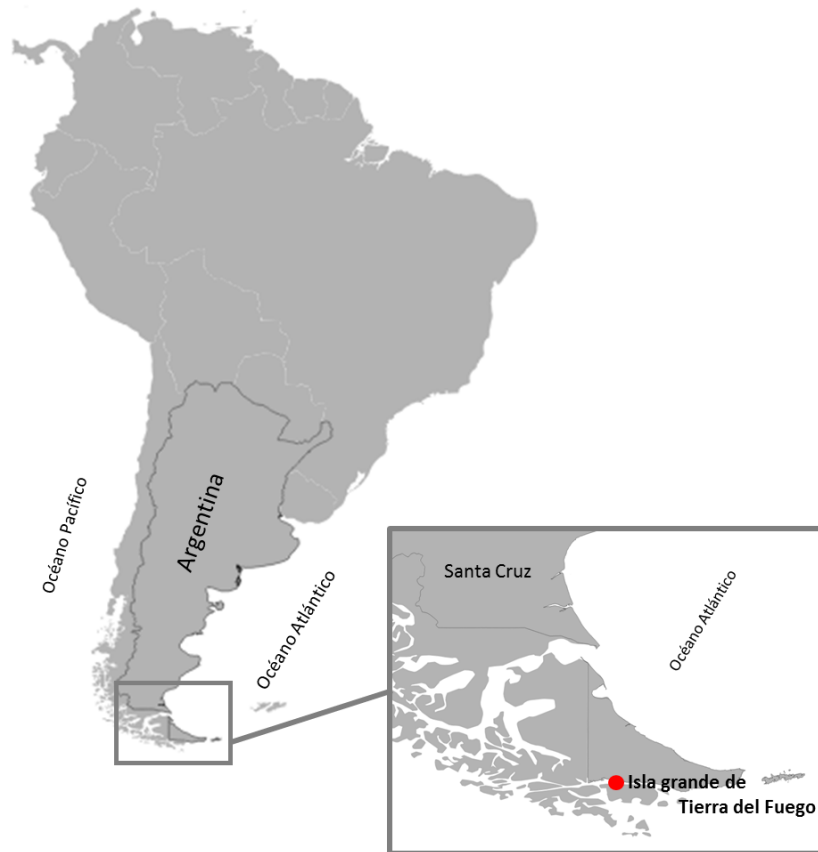


Figura 1.10. Ubicación del sitio de muestreo en la Bahía Ushuaia (círculo rojo) presente en la Isla Grande de Tierra del Fuego, Argentina.

Bahía Ushuaia se encuentra expuesta a variadas fuentes de estrés como bajas temperaturas, radiación ultravioleta (UV), desecación y concentraciones moderadas de variados contaminantes de origen antropogénico (Marcos *et al.*, 2009; Marcos *et al.*, 2012; Dionisi *et al.*, 2011). Todas estas características ambientales resultan en una presión de selección particular para las poblaciones microbianas, las cuales deben adaptarse a las fluctuaciones presentes en dicho ambiente. Particularmente en el ambiente intermareal, los sedimentos se encuentran expuestos a cambios de temperatura, salinidad y nutrientes, y pueden sufrir períodos de desecación en los ciclos de mareas. Debido a ello, las comunidades microbianas de los sedimentos de la zona intermareal resultan de particular interés, ya que albergan una gran diversidad de microorganismos que juegan un rol esencial en el ecosistema costero y que pueden presentar numerosas aplicaciones biotecnológicas (Musat *et al.*, 2006).

Este ambiente se considera una zona de alta diversidad de macroalgas. Particularmente las algas pardas se encuentran representadas por ocho órdenes que

1. Introducción

incluyen 26 géneros, indicados en la Tabla 1.2. (Luizzi *et al.*, 2011; Boraso *et al.*, 2013; Macaya *et al.*, 2020).

Tabla 1.2. Diversidad de órdenes y géneros de especies de algas pardas presentes en Bahía Ushuaia, Tierra del Fuego.

Orden	Género
Sphacelariales	<i>Cladostephus</i> , <i>Sphacelaria</i> , <i>Stypocaulon</i>
Scytotamnales	<i>Astronema</i> , <i>Stereocladon</i> ,
Laminariales	<i>Macrocystis</i> , <i>Lessonia</i>
Desmarestiales	<i>Desmarestia</i>
	<i>Adenocystis</i> , <i>Ectocarpus</i> , <i>Pylaiella</i> , <i>Germinocarpus</i> , <i>Petalonia</i> , <i>Caepidium</i> ,
Ectocarpales	<i>Cladothele</i> , <i>Chordaria</i> , <i>Colpomenia</i> , <i>Corycus</i> , <i>Dictyosiphon</i> , <i>Gononema</i> , <i>Leathesia</i> , <i>Punctaria</i> , <i>Scytosiphon</i> , <i>Utriculidium</i>
Ishigeales	<i>Petroderma</i>
Ralfsiales	<i>Ralfsia</i>

1.5.1. Biblioteca metagenómica

La muestra OR07 utilizada para la construcción de esta biblioteca metagenómica fue seleccionada debido a la gran diversidad de esta comunidad microbiana adaptada a condiciones extremas (Marcos *et al.*, 2009; Marcos *et al.*, 2012). Esta biblioteca, que cuenta con aproximadamente 40.000 clones, fue construida utilizando un fósido como vector, lo que permite clonar insertos de aproximadamente 40 Kb (Loviso *et al.*, 2015; Guibert *et al.*, 2016). A fin de aprovechar de una forma más integral la información genética contenida en la biblioteca metagenómica luego del análisis de 10 clones identificados por métodos funcionales y moleculares tradicionales (Loviso *et al.*, 2015; Guibert *et al.*, 2016; Musumeci *et al.*, 2019), la biblioteca metagenómica completa fue secuenciada al azar utilizando la plataforma Illumina HiSeq2000. A los efectos de facilitar el posterior ensamblado, los fósidos purificados a partir de los clones de la biblioteca metagenómica fueron divididos en dos (indicados como S1 y S2), y secuenciados y ensamblados de forma independiente. En total, el set de datos metagenómicos cuenta con 105.998 *scaffolds* y 682.972 secuencias codificantes (CDS), la mayoría de ellas completas (Calderoli *et al.*, 2018). A partir de la anotación funcional de dichas secuencias

1. Introducción

fue posible comenzar a estudiar en detalle el potencial metabólico de dicha comunidad microbiana (Calderoli *et al.*, 2018) y prospectar enzimas de interés biotecnológico (Dionisi *et al.*, 2023), las cuales pueden posteriormente ser expresadas de forma heteróloga y purificadas.

1.5.1.1 Expresión heteróloga de enzimas de interés

La información contenida en los *sets* de datos metagenómicos puede utilizarse para la búsqueda de genes de interés, los cuales pueden ser clonados en un vector de expresión para su posterior expresión heteróloga.

El huésped elegido para la expresión tiene un rol muy importante dado que las características del producto así como las estrategias de expresión y de purificación, van a depender de las capacidades del organismo productor (Gomes *et al.*, 2016). *Escherichia coli* es el sistema de expresión más utilizado para la producción de proteínas recombinantes (Grupta *et al.*, 2015). Una de las razones principales es que es una de las especies más estudiadas con respecto a su fisiología, bioquímica y genética (Gopal y Kumar, 2013). Entre las ventajas que brinda este microorganismo se encuentran: la facilidad para su cultivo, su rápida velocidad de replicación, el no poseer requerimientos costosos asociados a medios de cultivo o equipamiento, y la facilidad para su manipulación genética. A nivel de síntesis de proteínas, existen numerosos trabajos de expresión de enzimas recombinantes en este organismo, obteniéndose proteínas en gran proporción y calidad (Grupta *et al.*, 2015).

Una de las cepas de *E. coli* comúnmente utilizada es BL21 (DE3), la cual presenta deficiencia en las proteasas *lon* y *OmpT*, evitando la degradación de proteínas durante la etapa de purificación (Novagen, 2006). Es una bacteria lisógena (DE3) en la que se ha insertado un gen que codifica para la enzima ARN polimerasa T7 (ARNp) dentro de su genoma. Esta característica permite alcanzar altos niveles de expresión de la proteína recombinante, cuando es inducida en presencia de lactosa ó IPTG (Figura 1.11.). Los vectores de expresión de la serie pET, contienen el promotor T7 el cual se induce bajo la influencia de la enzima ARNp. Dado que la ARNp es altamente selectiva y activa, cuando se induce, casi todos los recursos de la célula se dirigen hacia la producción de la

1. Introducción

proteína recombinante, y el producto deseado puede comprender más del 50 % de la proteína total (Novagen, 2006).

La proteína de interés puede expresarse en forma soluble o bajo la formación de agregados citoplasmáticos insolubles denominados cuerpos de inclusión. Las proteínas que conforman los cuerpos de inclusión generalmente se encuentran inactivas, parcialmente plegadas y suelen mostrar artefactos moleculares como por ejemplo, puentes disulfuro no nativos (Betton, 2004).

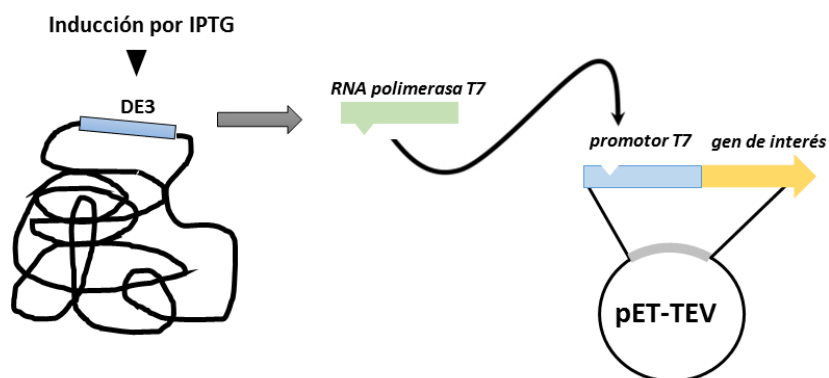


Figura 1.11. Sistema de expresión heteróloga utilizando como huésped la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el vector de expresión pET recombinante.

Diversas estrategias pueden ser utilizadas para incrementar la expresión y la solubilidad de la proteína heteróloga, entre ellas: crecimiento de cultivos a bajas temperaturas, cambios en el cultivo de la cepa recombinante, cambios en el vector de expresión y co-expresión con chaperones moleculares (Francis y Page, 2010; Gopal y Kumar, 2013; Celie *et al.*, 2016). Obtener una alta proporción de enzima heteróloga soluble es un requisito previo para posteriores estudios estructurales, funcionales y bioquímicos.

Luego de la expresión, el siguiente paso consiste en purificar la proteína recombinante. La técnica más utilizada para purificar proteínas es la cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC, *Immobilized Metal Affinity Chromatography*). Este método está basado en la interacción de ciertos residuos de aminoácidos con iones metálicos inmovilizados en una matriz (Walls y Loughran, 2011). Los grupos donantes de electrones de algunos aminoácidos (histidina, cisteína, triptófano y arginina) forman complejos con los iones de transición (Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} o Ni^{2+}), que generalmente están inmovilizados en soportes poliméricos con grupos quelantes como el ácido nitriloacético

1. Introducción

(NTA). El sistema de purificación níquel-ácido nitriloacético (Ni-NTA) está diseñado para la purificación de proteínas recombinantes marcadas con etiquetas de histidinas, debido a la alta afinidad y selectividad por los residuos de histidina (Figura 1.12., The QIAexpressionist, 2003). Las proteínas que se unen a la resina se eluyen utilizando *buffers* con alta concentración de imidazol. El imidazol es un intermediario en la biosíntesis de la histidina, que durante el proceso de elución compite con los residuos de histidina por la afinidad con los iones de níquel (The QIAexpressionist, 2003).

Luego de la separación cromatográfica se analizan las fracciones eluídas para determinar cuáles de ellas contienen la proteína de interés, y además el grado de pureza. Una de las formas de analizar las muestras es mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

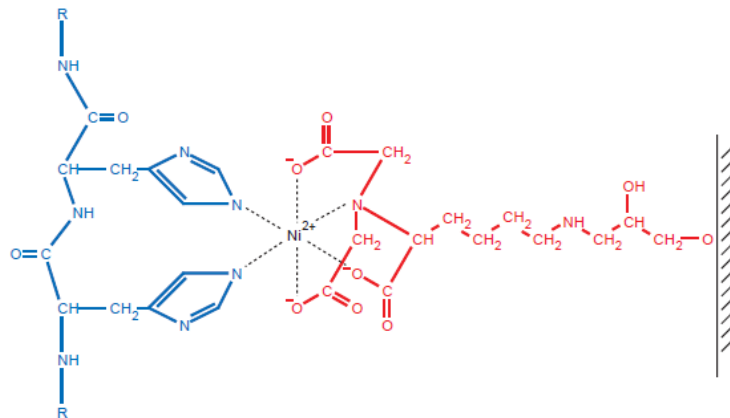


Figura 1.12. Interacción entre residuos de histidina (azul) y los iones de níquel presentes en la resina ácido níquel-nitrilotriacético (Ni-NTA). Extraído de The QIAexpressionist, 2003.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

Obtención de oligosacáridos con potencial actividad biológica utilizando biocatálisis, a partir de polisacáridos de algas pardas de la costa Patagónica.

Objetivos específicos

- I. Extraer, purificar y caracterizar fucoïdanos provenientes de distintas especies de algas pardas de la costa Patagónica.
- II. Identificar secuencias homólogas a enzimas fucoïdanasas a partir de un *set* de datos metagenómicos de sedimentos costeros de Bahía Ushuaia, y caracterizarlas *in silico*.
- III. Analizar los fragmentos metagenómicos que contienen las secuencias identificadas, a los efectos de determinar los posibles organismos hospedadores, como así también la presencia y organización de *loci* de utilización de fucoïdanos.
- IV. Seleccionar secuencias de interés para su posterior expresión y caracterización, y expresarlas en sistemas heterólogos.
- V. Purificar las enzimas expresadas y estudiar sus propiedades catalíticas, incluyendo las condiciones óptimas para la catálisis y la especificidad de sustrato.
- VI. Analizar la estructura de los fuco-oligosacáridos resultantes de la reacción enzimática.

En la presente Tesis Doctoral se formuló la siguiente hipótesis de trabajo:

Nuestra hipótesis de trabajo establece que al existir una gran diversidad y abundancia de algas pardas en el ambiente costero de Bahía Ushuaia, habrá una alta abundancia de bacterias con capacidad para degradar o asimilar fucoïdanos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2. Materiales y Métodos

2.1. Identificación y caracterización de secuencias putativas de enzimas fucoidanasas

2.1.1. Construcción de alineamientos múltiples y obtención de perfiles ocultos de Markov

Las enzimas fucoidanasas se encuentran agrupadas en tres familias glicósido hidrolasa (GH) en la base de datos CAZy (Lombard *et al.*, 2014, Drula *et al.*, 2022, <http://www.cazy.org/>), siendo ellas las familias GH107, GH168 y GH174. Dado que la familia GH174 es de muy reciente creación, no fue incluida en los análisis de esta tesis.

A partir de las secuencias deducidas de aminoácidos asignadas a las familias GH107 y GH168, se construyó un alineamiento múltiple para cada familia utilizando el programa Clustal X v2.1 (Larkin *et al.*, 2007) dentro del servidor Jalview (ELIXIR-UK, Hinxton, Cambridgeshire, UK, Waterhouse *et al.*, 2009). Los parámetros utilizados fueron los pre-establecidos para dicho programa. Del alineamiento obtenido, se extrajo la región correspondiente al módulo catalítico de las enzimas fucoidanasas, el cual ha sido definido anteriormente por Colin y colaboradores (2006) para enzimas de la familia GH107 y por Shen y colaboradores (2020) para miembros de la familia GH168. Los alineamientos extraídos fueron utilizados para generar perfiles ocultos de Markov (HMM, *Hidden Markov Models*) utilizando la herramienta *hmmbuild* del programa HMMER 3.1. (Mistry *et al.*, 2013). Los HMMs se basan en un modelo probabilístico que otorga mayor sensibilidad en la búsqueda, y por lo tanto permiten la identificación de secuencias homólogas distantes (Qian y Goldstein, 2003). Los HMMs fueron revisados al incorporarse nuevas secuencias en la base de datos CAZy hasta mayo de 2022.

2.1.2. Prospección de secuencias putativas de fucoidanasas

Los HMMs construídos se utilizaron para la identificación de secuencias homólogas en un *set* de datos generado anteriormente en el Laboratorio de Microbiología Ambiental. El *set* de datos metagenómico fue generado por medio de la secuenciación al azar de los fósidos de una biblioteca metagenómica de sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia (OR07, Loviso *et al.*, 2015; Guibert *et al.*, 2006), conteniendo 682.972 secuencias codificantes (CDS, *Coding Sequence*). La búsqueda fue realizada mediante la herramienta *hmmsearch* del programa HMMER 3.1. (Mistry *et al.*, 2013). De las secuencias identificadas, se evaluaron los valores de significancia

2. Materiales y Métodos

estadística (*E-value*) y el puntaje total (*score*). Se consideraron aquellas secuencias con valores de significancia estadística $\leq 10^{-5}$. Estos resultados fueron comparados con los obtenidos a partir del análisis de búsqueda de secuencias homólogas a las familias de interés utilizando los servidores dbCAN2 (*DataBase for automated Carbohydrate-active enzyme ANnotation*, Zhang *et al.*, 2018) y CUPP (*Conserved Unique Peptide Patterns*, Barrett *et al.*, 2020).

Se utilizó el programa seqmagick (<http://fhcrc.github.io/seqmagick/>) para extraer las secuencias putativas de fucoidanasas identificadas en los metagenomas. Para visualizar y extraer información de interés en los extensos archivos de secuencias en formato fasta se utilizó el programa glogg (<http://glogg.bonnefon.org/>), por ejemplo para extraer las secuencias de nucleótidos de los fragmentos metagenómicos conteniendo las secuencias de interés.

2.1.3. Análisis filogenéticos de las secuencias putativas identificadas

Las secuencias de las enzimas utilizadas como referencia (aquellas asignadas a las familias GH107 y GH168 en la base de datos CAZy) y aquellas identificadas en los metagenomas fueron alineadas siguiendo el método de construcción de alineamiento múltiple descrito en la sección 2.1.1. Del mismo se extrajo la región correspondiente al módulo catalítico de las enzimas fucoidanasas en cada familia, y el mismo fue utilizado para realizar una inferencia filogenética basado en el método de máxima verosimilitud en MEGA v7 (Kumar *et al.*, 2016), previa determinación del mejor modelo y evaluando la robustez del árbol obtenido en base a 100 réplicas.

2.1.4. Identificación de secuencias cercanas en la base de datos no redundante (nr) de NCBI

La determinación de similitud a secuencias conocidas fue realizada mediante el uso de la base de datos no redundante (nr) del NCBI mediante la herramienta BLASTp (McGinnis y Madden, 2004). Se utilizaron los valores pre-establecidos para los distintos parámetros de búsqueda.

2. Materiales y Métodos

2.1.5. Análisis estructurales de las secuencias putativas a fucoidanasas

2.1.5.1. Análisis de los residuos catalíticos

Se visualizó la presencia o ausencia de los residuos implicados en la catálisis de las enzimas fucoidanasas que han sido propuestos para ambas familias. El análisis fue realizado mediante la visualización del alineamiento múltiple en el programa JalView (ELIXIR-UK, Hinxton, Cambridgeshire, UK).

2.1.5.2. Análisis de la arquitectura multidominio

Se realizaron búsquedas de dominios generales en las secuencias identificadas a partir de la herramienta InterProScan (Mitchell *et al.*, 2019) y búsquedas específicas de dominios de familias CAZy utilizando el servidor CUPP (Barrett *et al.*, 2020) y dbCAN2 (Zhang *et al.*, 2018).

2.1.5.3. Detección de la presencia de péptido señal

La detección de un posible péptido señal en las secuencias putativas de fucoidanasas identificadas fue realizada utilizando el servidor SignalP 5.0 (Armenteros *et al.*, 2019), y corroborada con los resultados obtenidos a partir del análisis de las secuencias utilizando el servidor InterProScan (Mitchell *et al.*, 2019).

2.1.5.4. Modelado de la estructura tridimensional

El modelado de la estructura tridimensional de los módulos catalíticos de las secuencias fue realizado utilizando dos servidores. El primero de ellos llamado SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.*, 2008), permite realizar modelados basados en homología de las estructuras proteicas. Los modelos obtenidos de la estructura tridimensional fueron evaluados de acuerdo a los parámetros GMQE (*Global Model Quality Estimation*) y Z-QMEAN (*Quality Model Energy ANalysis*) (Benkert *et al.*, 2010). El primero refleja la precisión del modelo frente a un templado disponible en PDB, donde los valores cercanos a 1 indican una mayor fiabilidad del resultado. El parámetro Z-QMEAN hace referencia a la comparación del modelo construido contra una estructura experimental de tamaño similar, en donde, un valor cercano a cero indica un buen ajuste, mientras que puntuaciones < -4 indican modelos de mala calidad. Para secuencias homólogas a la familia GH107 se utilizó como templado las estructuras determinadas experimentalmente en dicha familia depositados en la base de datos PDB (*Protein Data*

2. Materiales y Métodos

Bank, Goodsell *et al.*, 2019). Las estructuras disponibles y utilizadas incluyen 2 variantes de la enzima FcnA perteneciente al organismo *M. fucanivorans* SWT5: 6DLH (desde Gln29-Ser734, llamada MfFcnA4) y 6DNS (desde Gln29-Asp623, llamada MfFcnA9), y la estructura 6M8N (llamada P5AFcnA) perteneciente al organismo *Psychromonas* sp. SW5A.

El segundo servidor utilizado fue AlphaFold2 el cuál predice las estructuras tridimensionales a partir del algoritmo *deep learning* (Jumper *et al.*, 2021). Los parámetros de calidad de los modelos generados incluyen el gráfico PAE (*predicted aligned error*), que identifica el error absoluto (Å) de la posición relativa entre residuos, donde el color azul intenso indica bajos errores en el modelado. Además, se utilizó el gráfico pLDDT, que también estima la confianza del modelo en cada residuo. Los valores de pLDDT > 90 representan una alta precisión del modelo, mientras que valores entre 70 y 90 representan una alta calidad a nivel del esqueleto de la proteína y buen modelo en general. Dicho servidor fue utilizado para la predicción de la estructura tridimensional de las secuencias homólogas a enzimas fucoidanasas de ambas familias, siendo él único método aplicado para secuencias homólogas a enzimas de la familia GH168 donde no existen aún estructuras cristalográficas publicadas.

Los modelos generados por ambas herramientas fueron visualizados en el programa UCSF Chimera 1.10.2. (Pettersen *et al.*, 2004). Posteriormente ambos modelos fueron comparados con los templados utilizados ó, en el caso de las secuencias homólogas a enzimas de la familia GH168 con el modelado tridimensional de la enzima FunA (AlphaFold2, No. acceso A0A1B1Y779), a fin de determinar regiones con distinto nivel de concordancia. Para la comparación de estructuras tridimensionales se utilizaron dos estrategias. La primera fue realizada en UCSF Chimera 1.10.2. seleccionando ambos modelos mediante el comando *matchmaker #2 to #1 show true* y los residuos fueron coloreados de acuerdo a los valores de RMSD (desviación de la media cuadrática) obtenidos. La segunda estrategia consistió en la comparación estructural mediante la herramienta *parwise structure comparison* del servidor DALI (Holm, 2022). Los resultados se evaluaron de acuerdo a los parámetros dali Z, RMSD y Lali.

2. Materiales y Métodos

2.2. Análisis de los fragmentos metagenómicos que contienen las secuencias identificadas

2.2.1. Asignación taxonómica de los fragmentos metagenómicos

A fin de identificar a qué grupos taxonómicos pertenecerían los organismos que podrían ser hospedadores de los fragmentos metagenómicos identificados, se utilizó el programa Megan v.6.23.2. (*MEtaGenome ANalyzer*, Huson *et al.*, 2007). Para la asignación taxonómica, en primer lugar se realizan búsquedas utilizando el algoritmo BLASTp (Altschul *et al.*, 1990) de las secuencias más cercanas a aquellas a analizar en la base de datos nr de NCBI (descargada en julio de 2021). Utilizando la información de las 100 secuencias más cercanas, el programa evalúa cada secuencia y le asigna una identificación (ID) de taxón utilizando el algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*). El análisis fue realizado tanto para las fucoidanasas putativas identificadas como así también para todas las secuencias codificantes predichas en los *scaffolds* que contienen a dichas secuencias. En ambos casos, la asignación fue realizada a partir de las secuencias de aminoácidos. La asignación taxonómica de los fragmentos metagenómicos fue indicado con porcentajes de las distintas asignaciones de las secuencias codificantes. Este último análisis fue realizado sólo en *scaffolds* con tamaños > 3 Kb. Los resultados obtenidos fueron reportados a nivel de *phylum*.

2.2.2. Predicción de secuencias codificantes y anotación funcional de los fragmentos metagenómicos

La anotación funcional de los fragmentos metagenómicos se realizó utilizando dos herramientas automáticas, el servidor RAST (*Rapid Annotation using Subsystems Technology*, Keegan *et al.*, 2015) y el servidor BASys (*Bacterial Annotation System*, Van Domselaar *et al.*, 2005). Dado que durante el proceso de anotación automática pueden ocurrir errores y muchas secuencias no presentan función asignada, ambas anotaciones fueron comparadas y corroboradas mediante una curación manual utilizando las herramientas BLASTp y Pfam (El-Gebali *et al.*, 2018). Se tuvo en cuenta además la predicción de secuencias codificantes realizada utilizando la herramienta MetaGeneMark (Zhu *et al.*, 2010).

2. Materiales y Métodos

2.2.3. Análisis de contexto genómico y sintenia compartida

Se realizó un análisis del contexto genómico de las secuencias putativas de fucoidanasas, con el fin de evaluar la presencia de otros genes potencialmente asociados a la despolimerización de fucoidanos ó al transporte y asimilación de los productos resultantes, tales como enzimas sulfatasas, desacetilasas, α -L-fucosidasas, transportadores, entre otros. El análisis fue realizado a partir de la información obtenida en la anotación funcional, la cual se encuentra detallada en la sección 2.2.2. El análisis de sintenia compartida de los fragmentos metagenómicos identificados, y de fragmentos de genomas de microorganismos cercanos, fue realizado utilizando el programa TREBOL (<http://bioinf.udec.cl/software/trebol.html>).

2.3. Microorganismos y vectores

2.3.1. Cepas bacterianas utilizadas y almacenamiento

Se emplearon dos cepas de *E. coli* para el clonado de los genes:

TOP10 (Invitrogen): El genotipo de la cepa es *F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ* . Fue empleada para generar células competentes utilizadas en la etapa de transformación de ligaciones del gen amplificado inserto en el vector de clonado.

BL21 (DE3): El genotipo es *B F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ (DE3 [*lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5*]) [*malB⁺*]_{K-12}(λ ^S)*. Se utilizó para la expresión heteróloga de las secuencias de interés.

Las cepas bacterianas se cultivaron a 37 °C en placas con medio LB sólido (con antibiótico de ser necesario). Para la conservación de las cepas y las construcciones que contienen, las mismas fueron crecidas en medio LB líquido a 37 °C y almacenadas a -80 °C con el agregado de glicerol a una concentración final de 20 % (v/v) [Sambrook y Rusell, 2001].

2.3.2. Vectores

pCRTM 4-TOPOTM (Invitrogen): vector de clonado. Empleado en el protocolo TOPO TA cloning (descrito más adelante). Contiene el origen de replicación bacterial pUC,

2. Materiales y Métodos

promotor Lac, región de clonado TOPO-TA (*lacZ ccdB*) y dos genes que le confieren resistencia a los antibióticos Kanamicina y Ampicilina (Figura 2.1.).

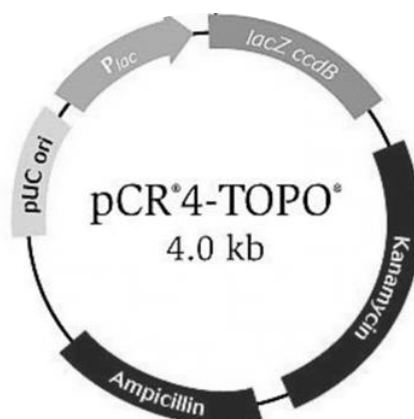


Figura 2.1. Mapa del plásmido pCR[™] 4-TOPO[™]. El vector contiene dos genes de resistencia a antibiótico (Kanamicina y Ampicilina), un origen de replicación pUC ori, un promotor (P_{lac}) y un sitio de clonado (*lacZ ccdB*). Extraído de Invitrogen, User Guide 2014.

pET28-TEV: vector de expresión. Derivado del vector pET-28a(+) [Novagen] a partir del cual se le incorporó un sitio de reconocimiento de la proteasa TEV en la región N-terminal (brindado por Dr. Rodolfo M. Rasia, IBR, Rosario, Arg.). Contiene un sitio de múltiple clonado (SMC, *site multiple cloning*), una secuencia de sitio de reconocimiento de la proteasa del virus del mosaico del tabaco (TEV) y dos series de seis histidinas (His-Tag), una en el N-terminal y otra en el C-terminal de la región de clonado del gen. Las etiquetas de histidina intervienen en el proceso de purificación de la enzima recombinante expresada. Además, presenta dos orígenes de replicación (F1 ori y ori), un promotor $Lacl$ y un marcador de selección que le confiere resistencia al antibiótico Kanamicina (Kan R, Figura 2.2.).

2. Materiales y Métodos

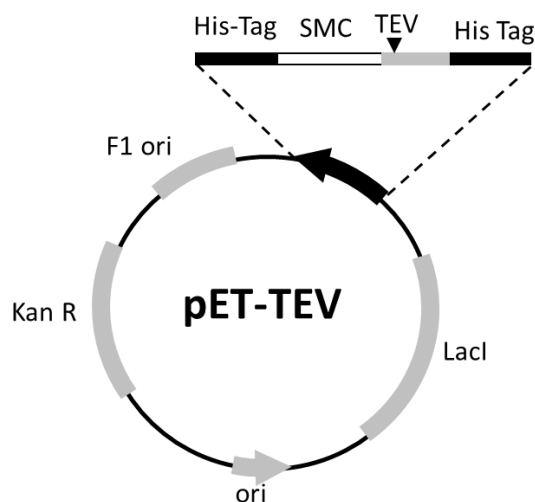


Figura 2.2. Mapa circular del vector de expresión pET-TEV. Contiene un sitio de múltiple clonado (SMC), dos His-Tag, un sitio de reconocimiento de la proteasa TEV, un promotor inducido por lactosa (LacI), dos orígenes de replicación (ori y F1 ori) y un gen de resistencia a Kanamicina (Kan R).

pGro7 (Takara Bio Inc.): presenta genes que codifican para el complejo de chaperonas GroEL-GroES. Contiene un origen de replicación llamado pACYC ori, un gen de resistencia al cloranfenicol (Cm^r) y dos promotores de inducción por L-Arabinosa (Figura 2.3.).

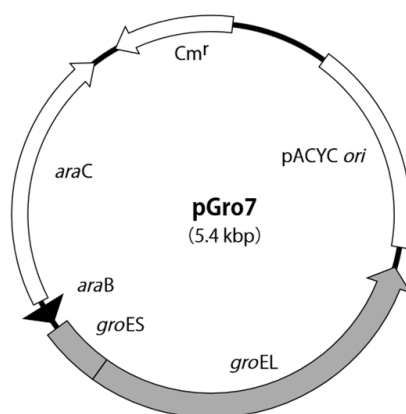


Figura 2.3. Mapa del plásmido pGro7. Los genes groES y groEL codifican para un complejo de chaperonas y están bajo el control de un promotor inducido por L-Arabinosa (araB). Extraído de Takara, Chaperone Plasmid Set, Product Manual v201701Da.

2.4. Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados por autoclave (121 °C, 15 min) y almacenados a temperatura ambiente. Para medios sólidos, la concentración de agar fue de 15 g/L. Los antibióticos (Kanamicina 50 µg/mL, Cloranfenicol 10 µg/mL)

2. Materiales y Métodos

previamente esterilizados por filtración (0,22 μm), fueron agregados al medio de cultivo autoclavado bajo condiciones de esterilidad, a temperatura moderada.

Luria Bertani (LB, Sambrook y Russell, 2001): Para un litro de medio LB, se disolvieron 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Se ajustó el pH a 7 con NaOH.

S.O.B. (Sambrook y Russell, 2001): 2 % (p/v) triptona, 0,5 % (p/v) extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 y 10 mM MgSO_4 .

S.O.C. (Sambrook y Rusell, 2001): contiene la misma composición que el medio SOB pero con el agregado de glucosa a una concentración final de 20 mM.

4xYT (Burgess-Brown, 2017): Para un litro de medio se disolvieron 32 g de triptona, 20 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura. El pH fue ajustado a 7 con el agregado de NaOH.

2.5. Composición de soluciones

Solución de lisis I (Sambrook y Rusell, 2001): 50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl (pH 8) y 10 mM EDTA (pH 8). La solución fue preparada en agua destilada y se esterilizó por autoclave, almacenándose luego a 4 °C.

Solución de lisis II (Sambrook y Rusell, 2001): Se preparó en el momento de ser utilizada, a una concentración de 0,2 N de NaOH y 1 % (p/v) de SDS en agua destilada estéril.

Solución de lisis III (Sambrook y Rusell, 2001): 60 mL de acetato de potasio 5 M se mezclaron con 11,5 mL de ácido acético glacial, llevando a un volumen final de 100 mL con agua destilada. La solución se almacenó a 4 °C.

STE: 10 mM Tris-HCl (pH 8), 0,1 M NaCl y 1 mM EDTA (pH 8). La solución preparada en agua destilada se esterilizó por autoclave y se almacenó a 4 °C.

TNE 10X: 100 mM Tris, 10 mM EDTA y 2 M NaCl. El pH fue ajustado a 7,4 con HCl concentrado.

2X Dye Solution: 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Hoechst 33258 y 1 X TNE.

2. Materiales y Métodos

EDTA 0,5 M (pH 8): Se agregaron 187,1 g de Na₂EDTA•2H₂O a 800 mL de agua destilada. Se mezcló mediante agitación magnética y se ajustó el pH con NaOH. Se llevó a un volumen final de 1 L con agua destilada. La solución fue esterilizada por autoclave y almacenada a 4 °C.

Reactivo de Bradford (Bradford, 1976): 0,01 % (p/v) Coomassie Blue G-250, 4,7 % (p/v) etanol y 8,5 % (p/v) H₃PO₄ 85 % (p/v). Se preparó en agua destilada y fue almacenado en botella color caramelo a temperatura ambiente.

Tris-HCl 1 M (pH 7,5): 12,1 g de 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (Tris) se disolvieron en un volumen final de 100 mL ajustando el pH con HCl concentrado.

TAE 50X: 2 M Tris-base, 1 M ácido acético glacial y 100 mM EDTA.

2.6. Manipulación de ácidos nucleicos

2.6.1. Aislamiento de ADN plasmídico

2.6.1.1. Extracción de plásmidos utilizando un kit comercial

Para la extracción de ADN plasmídico se utilizó el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN Inc., Valencia, California, Estados Unidos). Previo a la extracción, se inoculó una colonia aislada de *E. coli* TOP10 conteniendo el plásmido de interés, en 10 mL de medio LB con el antibiótico apropiado, que luego fue incubado a 37 °C durante 16 h con agitación vigorosa (200 rpm). Luego de la incubación, el cultivo se centrifugó a 6.000 xg por 3 min a temperatura ambiente. El precipitado obtenido fue utilizado para la extracción del plásmido, siguiendo las instrucciones del fabricante del kit.

2.6.1.2. Extracción de plásmidos utilizando el método de lisis alcalina

Previo a la extracción de ADN plasmídico utilizando el método descrito por Sambrook y Rusell (Sambrook y Rusell, 2001), se inoculó una colonia aislada de *E. coli* TOP10, conteniendo el plásmido de interés, en 5 mL de medio LB con el antibiótico apropiado, y se incubó a 37 °C durante 16 h en agitación vigorosa (200 rpm). Luego de la incubación, el cultivo se centrifugó a 6.000 xg a temperatura ambiente. El precipitado obtenido se resuspendió en 100 µL de solución de lisis alcalina I a 4 °C y se mezcló vigorosamente con un agitador. Posteriormente, se adicionaron 200 µL de solución de lisis II, se mezcló por inversión diez veces y se incubó en hielo por 1 min. A continuación,

2. Materiales y Métodos

se agregaron 150 μ L de solución de lisis III a 4 °C, se mezcló por inversión diez veces y se incubó en hielo durante 3 min. El lisado celular fue centrifugado a 11.600 xg durante 10 min y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo. Se adicionó un volumen igual de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó por 10 min a temperatura ambiente para precipitar el ADN. Luego, se centrifugó a 11.600 xg por 10 min, y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol 70 % (v/v). Una vez evaporado el etanol, el ADN fue disuelto en 20 μ L de agua ultra-pura (GIBCO) y almacenado a -20 °C.

2.6.2. Cuantificación del ADN

El ADN plasmídico fue cuantificado por fluorimetría utilizando un fluorómetro QuantiFluor™-ST Handheld (Promega Corporation, Madison WI, Estados Unidos) en el canal de detección de fluorescencia A (Canal UV 365 nm_{ex} y 440-470 nm_{em}), y el colorante Hoechst 33258 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, Estados Unidos). La calibración del fluorómetro se realizó utilizando como estándar el ADN del Fago Lambda (Promega) realizándose diluciones con concentraciones finales conocidas a las que se les añadieron 100 μ L de cada una de las soluciones de trabajo, TNE 1X y 2X Dye Solution. Para las mediciones de las muestras incógnitas se aplicó la dilución correspondiente junto con los mismos volúmenes de las soluciones de trabajo. Se utilizaron tubos de 0,5 mL en todas las mediciones, con el adaptador del equipo para el uso de tubos de este tamaño.

2.6.3. Electroforesis en geles de agarosa

A fin de separar las moléculas de ADN, se prepararon geles de agarosa cuya concentración varió entre 0,7 y 2 % (p/v), según el tamaño de los fragmentos a analizar. Los geles fueron preparados en solución *buffer* TAE 1X con el agregado del colorante EcoGel a una concentración final 1X (20.000X, INBIO Highway). Las corridas electroforéticas se realizaron en el *buffer* TAE 1X, a un voltaje constante de 70 V. Las muestras de ADN se sembraron utilizando una solución de siembra 6x (0,25 % (p/v) azul de bromofenol y 30 % (v/v) glicerol), añadido en una proporción 5:1 de muestra/solución de siembra. De acuerdo al tamaño del fragmento a visualizar, se utilizaron distintos marcadores de peso molecular, entre ellos: 1 kb ladder de INBIO HIGHWAY, los marcadores 100 pb PLUS y 50 pb de PB-L y el marcador Lambda DNA/HindIII de Promega.

2. Materiales y Métodos

El ADN fue visualizado utilizando un documentador de geles con luz UV (255 nm, Bio-Vision, Francia).

2.7. Transferencia de ADN plasmídico

La transferencia de ADN plasmídico a cepas de *E. coli* se realizó por transformación. Se utilizó el método de cloruro de calcio descrito por Sambrook y Russell (Sambrook y Russell, 2001) para la obtención de células competentes, tal como se indica a continuación.

2.7.1. Obtención de células competentes *E. coli* TOP10 y BL21 (DE3)

Partiendo de un cultivo en LB sólido de *E. coli* TOP10 ó BL21 (DE3), se colocaron 4 colonias en 62,5 mL de caldo S.O.B., que fueron cultivadas a 20 °C hasta una densidad óptica (DO) de 0,4 a 600 nm. Luego de incubar 10 min en hielo, se recolectaron las células por centrifugación a 5.000 xg durante 10 min a 4 °C. Se resuspendió el precipitado de células en 20 mL de *buffer* de transformación frío (10 mM PIPES pH 6,7, 15 mM CaCl₂ y 250 mM KCl), se incubó en hielo por 10 min y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. El precipitado fue resuspendido en 5 mL de *buffer* de transformación frío, y se adicionaron 350 µL del crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO). El volumen obtenido fue fraccionado en alícuotas de 200 µL, las cuales fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

2.7.2. Transformación de células competentes

Se transformaron células competentes de *E. coli* TOP10 ó BL21 (DE3) según el protocolo de transformación por choque térmico de New England Biolabs (NEB <https://international.neb.com/protocols/>), descrito a continuación.

2.7.2.1. *E. coli* TOP10

La transformación se realizó mediante el agregado del volumen total de la reacción de ligación en 200 µL de células competentes. Simultáneamente, se realizó un control positivo, al cual se añadió una concentración conocida de un plásmido similar, y un control negativo que consistió en un volumen igual de agua estéril. Luego del agregado del ADN, se mezcló suavemente y se incubó 60 min en hielo. La reacción fue sometida a un shock térmico a 42 °C por 90 s, y se llevó inmediatamente a hielo por 1 min. Finalmente, se agregaron 800 µL de medio SOC, y se incubó durante 90 min a 37 °C

2. Materiales y Métodos

con agitación suave (50 rpm). Las células transformadas fueron sembradas en medio SOB con Kanamicina, incubando 16 h a 37 °C.

2.7.2.2. *E. coli* BL21 (DE3)

La transformación se realizó mediante el agregado de 1 ng de plásmido pET28-TEV que contiene el gen de interés en 200 µL de células competentes BL21 (DE3). Se aplicó el mismo protocolo de transformación de las células competentes *E. coli* TOP10.

2.7.2.3. Eficiencia de la transformación

El cálculo de la eficiencia de transformación fue realizado a partir del número de colonias obtenidas en distintas diluciones de sembrado en relación con los µg de ADN añadidos. El análisis de los clones obtenidos a partir de la ligación se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.8.4.1.

2.8. Amplificación y clonado de las secuencias de interés

2.8.1. Eliminación del péptido señal

Se removió la región de la secuencia nucleotídica correspondiente al péptido señal de las secuencias seleccionadas para su expresión heteróloga (identificación detallada en la sección 2.1.4.4.). Las secuencias obtenidas fueron utilizadas para el diseño de los cebadores.

2.8.2. Diseño de cebadores

Para el diseño de los cebadores se utilizó el programa Serial Cloner versión 2.6.1. Los oligonucleótidos diseñados para las distintas secuencias seleccionadas se encuentran detallados en la Tabla 2.1. Los mismos contienen sitios de reconocimiento de corte para las enzimas de restricción EcoRI (5'-GAATTC-3'), XhoI (5'-CTCGAG-3') y NdeI (5'-CATATG-3') indicados en negrita. Además, se añadieron los nucleótidos necesarios para un corte eficiente de las enzimas en ambos extremos (información obtenida a partir de la herramienta *Cleavage Close to the End of DNA Fragments* de la plataforma New England BioLabs inc.). Dichas enzimas de restricción corresponden al tipo II, las cuales reconocen secuencias específicas palindrómicas. La herramienta RestrictionMapper (<http://www.restrictionmapper.org/>) fue utilizada para constatar que las enzimas de restricción seleccionadas no digirieran en ningún otro sitio en el

2. Materiales y Métodos

fragmento a amplificar. Se realizaron análisis para predecir la probabilidad de formación de estructuras secundarias y dímeros de cebadores, utilizando el servidor OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer/>). Además, se consideró la presencia de una o dos bases G ó C en el extremo 3' a los efectos de favorecer la unión del cebador al templado dado los triples enlaces que éstas presentan.

La síntesis de oligonucleótidos diseñados para la amplificación de las secuencias seleccionadas fue realizada en *Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT)*, y una vez obtenidos, se disolvieron en un volumen equivalente para obtener una concentración final de 100 μ M.

Tabla 2.1. Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de genes putativos a fucoidanasas. Los sitios de reconocimiento por endonucleasas de restricción se indican en negrita. El triplete de nucleótidos subrayados en el cebador Reverse indica el codón stop.

Nombre	Secuencia del cebador (5'→ 3')	Longitud (nt)	Enzima de restricción
163424_F	TGACT GAATT CCAGTTCTTGTGGTATGAAAATCAAAC	37	EcoRI
163424_R	AGTCG CTCGAG <u>TTATTT</u> AGAAATAATTATTTTTGAGTAATGC	43	XhoI
113643_F	CGATAC ATATG GGAAGAGCCTCGCGTCTGG	29	NdeI
113643_R	CACTA CTCGAG CTACTGTTTTCTACTTTTCTTGACGG	37	XhoI
57307_F	CGATAC ATATG CAGGAATCGCCGACTGAAAAG	32	NdeI
57307_R	CACTA CTCGAG CTATTTCCACGAATCACTTC	32	XhoI
277285_F	CAGTG CATATG CAAGACACTGAGGTTGAGTTACC	34	NdeI
277285_R	TCATAT CTCGAG <u>TCAAT</u> GTTTGCCGGGTGAAGC	33	XhoI

2.8.3. Amplificación de las secuencias de interés

Los genes correspondientes a las secuencias seleccionadas fueron amplificados mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a partir del ADN purificado de los clones de la biblioteca metagenómica, utilizando una mezcla comercial de alta fidelidad (*FastStart High Fidelity PCR System*, dNTPack, Roche). Cada reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ L de mezcla de reacción conteniendo: 0,4 μ M de los cebadores correspondientes, 2,5 μ L de *FastStart High Fidelity*, solución amortiguadora 10x con $MgCl_2$, 200 μ M de dNTPs (PCR Grade Nucleotide Mix) y 2,5 U de ADN polimerasa (*FastStart High Fidelity Enzyme Blend*). El ADN molde consistió en una mezcla compuesta por múltiples fósidos que contienen

2. Materiales y Métodos

insertados fragmentos genómicos de aproximadamente 40 kb, de la biblioteca metagenómica de sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia. El número de mezclas evaluadas fue de tres, que en conjunto corresponderían a la mitad de los clones de la biblioteca. Esto es debido a que el *set* de datos metagenómicos fue obtenido a partir de la secuenciación y ensamblado independiente de las dos mitades de los clones de la biblioteca metagenómica, y se conoce si la secuencia proviene de S1 ó S2. En cada reacción de amplificación se utilizó 4 mg/ μ L de ADN.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Waltham, MA, Estados Unidos). Los programas de PCR se ajustaron a las temperaturas de “melting” de los distintos cebadores para los genes seleccionados y se encuentran indicadas en la Tabla 2.2. En cada amplificación se incluyó un control negativo conteniendo agua destilada autoclavada en lugar del templado. La presencia de los fragmentos de amplificación se verificó mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa. Luego de constatar la presencia del fragmento amplificado en las condiciones de reacción optimizadas en una mezcla de clones en particular, se realizaron reacciones de amplificación preparativas con volúmenes finales de 50 μ L, las cuales fueron sembradas en un gel de agarosa 1 % (p/v). La banda correspondiente al fragmento amplificado fue purificada mediante el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante.

2. Materiales y Métodos

Tabla 2.2. Protocolo de temperaturas utilizadas en la reacción de amplificación de las secuencias de interés.

Etapa	Gen 163424	Gen 57307	
Desnaturalización inicial	94 ° C por 2 minutos		
Desnaturalización	94 ° C por 30 segundos		
Hibridación de cebadores	62 ° C por 45 seg	60 ° C por 45 seg	x 15 ciclos
Extensión	72 C por 2 min	72 ° C por 90 seg	
Desnaturalización	94 ° C por 30 seg	94 ° C por 30 seg	x 15 ciclos
Hibridación de cebadores	68 ° C por 30 seg	65 ° C por 30 seg	
Extensión	72 ° C por 2 min	72 ° C por 90 seg	
Extensión final	72 ° C por 5 minutos		

Etapa	Gen 113643	Gen 277285	
Desnaturalización inicial	94 ° C por 2 minutos		
Desnaturalización	94 ° C por 30 segundos		
Hibridación de cebadores	63 ° C por 30 seg	61 ° C por 30 seg	x 30 ciclos
Extensión	72 ° C por 90 seg	72 ° C por 60 seg	
Extensión final	72 ° C por 5 min		

2.8.4. Clonado de los productos de amplificación

Previo al clonado, se añadieron nucleótidos de adenina a los extremos de los fragmentos amplificados y purificados. Este paso fue realizado dado que los productos de amplificación fueron purificados y congelados a -20 °C previo a su clonado, y podrían haber perdido los nucleótidos de adenina que adiciona la enzima Taq polimerasa en los extremos 3' del fragmento. Para ello, se realizó una incubación de 30 min a 72 °C, en presencia de solución amortiguadora de reacción 0,3X PCR *Buffer*, 2 μM dATP, 0,5 mM MgCl₂ y 5 U/mL ADN polimerasa T-Plus (Inbio-Highway, Tandil, Argentina). Este paso fue realizado para permitir la ligación posterior con los residuos de timina presentes en los extremos del plásmido de clonado.

El clonado se realizó utilizando el vector pCR™ 4-TOPO™ del kit TOPO-TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante con modificaciones menores. La mezcla de la reacción de clonado se realizó en un volumen final de 3 μL y consistió en 0,5 μL del vector, 0,5 μL de solución salina, 1,5 μL de la solución del producto amplificado y 0,5 μL de agua ultra pura

2. Materiales y Métodos

Inbio Highway. La relación gen/vector utilizada fue 3:1 respectivamente. Los componentes de la reacción fueron mezclados suavemente e incubados a temperatura ambiente durante 15 min. La construcción resultante fue utilizada para transformar células de *E. coli* TOP10 competentes químicamente mediante el método de transformación por choque térmico. Para ello se utilizaron 100 μ L de células TOP10, a las cuales se le agregaron 2 μ L de la reacción de clonado. Luego de mezclar suavemente, se incubaron por 30 min en hielo, seguido de un shock de calor a 42 °C durante 90 s, transfiriéndose inmediatamente a hielo por 1 min. Finalmente, se agregaron 800 μ L de medio SOC, y se incubó durante 90 min a 37 °C en agitación suave (50 rpm). Las células transformadas fueron sembradas utilizando una espátula de Drigalski sobre medio SOB agar con kanamicina (50 μ g/mL), e incubadas 16 h a 37 °C. Como control positivo de la transformación, se realizó el agregado de un plásmido similar a una concentración conocida. En los controles negativos, se reemplazó la mezcla de ligación por el agua provista por el fabricante del kit.

2.8.4.1. Selección de clones positivos

Para verificar la presencia de la secuencia de interés en las colonias obtenidas, se aplicaron 2 metodologías. La primera de ellas consistió en la realización de una PCR de las colonias obtenidas en la transformación (“PCR colony”). Las colonias seleccionadas se resuspendieron en 15 μ L del *buffer* 100 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA y 0,1 % (p/v) Triton X-100. Los tubos se incubaron a 95 °C durante 5 min, y luego se recuperó el sobrenadante mediante centrifugación por 10 min a 11.600 xg. Se utilizaron 2 μ L del sobrenadante como templado para la reacción de PCR. Los productos resultantes de la amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa a 1 % (p/v) comparándose con el tamaño esperado.

La segunda metodología aplicada consistió primeramente realizar una extracción de plásmido mediante el método de lisis alcalina (descrito en la sección 2.6.1.2), para luego realizar una digestión con una endonucleasa de restricción que reconozca y escinda una sola vez el vector que contiene el inserto, a los fines de obtener un plásmido linealizado. Al igual que en el caso anterior, los resultados se visualizaron en electroforesis en gel de agarosa, y evaluándose con respecto al tamaño esperado.

2. Materiales y Métodos

Los clones que presentaron el fragmento de interés fueron conservados a -80 °C. Para cada gen, se eligieron dos clones al azar a partir de los cuales se realizaron extracciones de plásmido mediante kit comercial (descrito en sección 2.6.1.1.). Los plásmidos purificados fueron enviados a secuenciar al servicio de Secuenciación Sanger de Macrogen Korea (Seoul, Corea). Para la secuenciación se utilizaron los cebadores universales M13F(-20) y M13R-pUC(-40) del vector pCRTM 4-TOPOTM. Los resultados obtenidos de la secuenciación fueron analizados utilizando el programa BioEdit 7.0.9. Se evaluó la direccionalidad del inserto, la presencia de los sitios de restricción y la secuencia de nucleótidos.

2.8.5. Subclonado de las secuencias en el vector de expresión pET28-TEV

2.8.5.1. Digestión con endonucleasas de restricción

El inserto fue escindido utilizando las enzimas de restricción (Promega) cuyos sitios fueron incorporados en los cebadores (Tabla 2.1.). Las mismas enzimas de restricción fueron utilizadas para la digestión del vector pET28-TEV. El método aplicado consistió en una digestión secuencial, en donde en primer lugar se añadieron todos los componentes detallados en la Tabla 2.3. y sólo una de las enzimas, la cual se incubó durante 1 h a 37 °C. Posteriormente se agregó la segunda endonucleasa de restricción dejándose actuar durante el mismo tiempo y temperatura que la primera. Finalmente, se añadieron 0,5 µL de cada enzima de restricción y se dejó actuar por 2 h más a 37 °C. Las concentraciones y volúmenes utilizados se indican en la Tabla 2.3., siendo el volumen final de la reacción de 50 µL. En la reacción de digestión del vector de expresión se empleó la enzima fosfatasa alcalina de camarón (TSAP, Promega Corp., Madison, EE. UU.), a los efectos de remover los grupos fosfatos terminales y así evitar el re-ligado del vector.

2. Materiales y Métodos

Tabla 2.3. Volúmenes utilizados en la digestión con endonucleasas de restricción del vector de expresión y de clonado que contiene la secuencia de interés.

	pET28-TEV	pCRTM 4-TOPOTM con inserto
ADN	2 -3 µg	3 µg
Buffer específico para las enzimas	5 µL	5 µL
Enzima I	1,5 µL (15 U)	1,5 µL (15 U)
Enzima II	1,5 µL (15 U)	1,5 µL (15 U)
Albúmina sérica bovina (BSA)	0,5 µL	0,5 µL
Fosfatasa alcalina (TSAP)	1,5 µL (1,5 U)	-

2.8.4.2. Purificación del material digerido

El producto resultante de las digestiones con endonucleasas de restricción fue sembrado en un gel de agarosa al 0,7 % (p/v) con el agregado del colorante SYBR Green (concentración final 1X). El ADN fue visualizado utilizando un transiluminador de luz azul (470 nm, Labnet ENDUROTM), que daña en menor grado el ADN que longitudes de onda más bajas. Luego de su visualización, se cortó con un bisturí las porciones del gel conteniendo las bandas de interés, las cuales fueron purificadas utilizando el kit comercial HiYield PlusTMGel/PCR DNA Minikit (Real Biotech), siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.8.4.3. Ligado de fragmentos de ADN

El gen de interés y el vector pET28-TEV (ambos purificados) fueron ligados utilizando la enzima T4 ADN Ligasa (Promega) en un volumen final de 20 µL. La relación gen/vector utilizada fue 3:1, donde primeramente fueron incubados junto con 0,5 µL de ligasa y 2 µL del *buffer* comercial de la enzima (30 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT y 1mM ATP) durante 1 h en hielo. Posteriormente la reacción se incubó por 16 h a 4 °C.

2.9. Sobre-expresión heteróloga y purificación de las enzimas recombinantes

2.9.1. Predicciones de expresión soluble

Las predicciones de solubilidad ante la expresión en *E. coli* se realizaron a partir de las secuencias de aminoácidos de las enzimas identificadas (eliminando el péptido señal) haciendo uso de tres servidores: Soluprot, CamSol y SOLpro. El primero de ellos

2. Materiales y Métodos

utiliza la base de datos TargetTrack como *set* de búsqueda, la cual está basada en *machine learning* (Hon *et al.*, 2021, <https://loschmidt.chemi.muni.cz/soluprot/>). En la herramienta CamSOL se utilizó el algoritmo CamSOL intrínseco, donde se predice la solubilidad de la proteína y la propensión a la formación de agregados proteicos (Sormanni *et al.*, 2017, <http://www-vendruscolo.ch.cam.ac.uk/camsolmethod.html>). Por último, SOLpro predice la propensión de una proteína a ser soluble tras la sobreexpresión en *E. coli* utilizando un clasificador SVM (máquinas de vector soporte, del inglés *support-vector machines*), de dos etapas basada en múltiples representaciones de la estructura primaria (Magnan *et al.*, 2009, <http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>).

2.9.2. Optimización de la expresión heteróloga

2.9.2.1. Composición del medio de cultivo

Se comparó la velocidad de crecimiento y DO de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con las construcciones pET28-TEV-163424 y pET28-TEV-57307, como así también los niveles de expresión de las proteínas de interés en las mismas utilizando los medios de cultivo LB y 4xYT (sección 2.4.).

2.9.2.2. Adición de glucosa

La expresión basal del operón Lac fue inhibida mediante el agregado de 1 % (p/v) de glucosa al medio de cultivo.

2.9.2.3. Temperatura de crecimiento e inducción

Se evaluó el crecimiento y los niveles de expresión de las proteínas de interés a diferentes temperaturas: 12, 21, 30 y 37 °C.

2.9.2.4. Uso de chaperones moleculares: el complejo GroES-GroEL

El plásmido pGro contiene genes que codifican para el complejo de chaperonas GroES-GroEL. Este plásmido fue co-transformado en *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo las construcciones, dado que ambos plásmidos son compatibles. La inducción de los genes groES-groEL se realizó con el agregado de L-Arabinosa a una concentración final de 4 mg/mL.

2. Materiales y Métodos

2.9.3. Cosecha de células y lisis celular

Las células bacterianas fueron cosechadas por centrifugación a 4.600 xg por 10 min a 4°C, resuspendidas en *buffer* compuesto por 10 mL de 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, y centrifugadas nuevamente utilizando las mismas condiciones. Se añadieron 3 mL de *buffer* de lisis y la suspensión de células fue alícuotada en dos tubos de 2 mL. Dichas células fueron sometidas a ruptura por homogenización en Fastprep-24™ (MP Biomedicals, California, USA) utilizando 1/3 (v/v) de esferas de vidrio (“beads”) de 0,12 mm de diámetro. Se aplicaron 2 ciclos de 4 m/s durante 10 s, con una etapa de enfriamiento en hielo por 5 min entre ciclos. Luego, se removió el material insoluble por centrifugación a 11.600 xg por 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes fueron sembrados en un gel de SDS-PAGE en un volumen equivalente a 25 µg de proteína total.

A fin de optimizar la etapa de lisis celular, se evaluaron distintas composiciones del *buffer* de lisis con respecto a concentraciones de Tris-HCl (20 y 100 mM) y NaCl (150 y 500 mM), como así también la ausencia/agregado de glicerol, imidazol e inhibidor de proteasas (PMSF).

2.9.4. Expresión heteróloga

Una vez determinadas las condiciones óptimas, en una primera instancia se realizaron experimentos de expresión a pequeña escala, con el fin de comprobar el nivel de expresión de las enzimas en la fracción soluble, para luego aplicarlo a un mayor volumen. Para ello, se inocularon 10 mL de medio de cultivo (LB ó 4xYT) con kanamicina con una colonia de BL21 (DE3)/pET28-TEV-163424 y pET-TEV-57307. El cultivo se incubó por 112 h con agitación a 200 rpm, a 12 °C. Posteriormente, se realizó un repique de este cultivo en 50 mL de medio de cultivo, añadiendo un volumen tal que la DO inicial sea de 0,1. La densidad óptica se obtuvo a partir de mediciones en espectrofotómetro UV-Visible (Genesys 50, Thermo Fisher) a una longitud de onda de 600 nm (DO_{600nm}). El mismo se cultivó en las mismas condiciones hasta una DO de 0,8, momento en el cual se agregó IPTG a una concentración final de 0,2 mM. Luego de 19 h de inducción, se cosecharon las células siguiendo lo descrito en la sección 2.9.3., se lisaron, y se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (sección 2.9.5.1.2.),

2. Materiales y Métodos

evaluándose la cantidad de enzima heróloga soluble mediante geles de SDS-PAGE (sección 2.9.5.1.1.).

Para la producción de las enzimas de interés en mayor cantidad, se emplearon matraces de 1 L con 200 mL de medio 4xYT. Las condiciones de crecimiento e inducción fueron iguales a aquellas las empleadas para el test de expresión. El volumen del *buffer* de lisis aplicado fue de 6 mL.

2.9.5. Purificación, cuantificación y determinación de pureza de las enzimas obtenidas

2.9.5.1. Purificación mediante cromatografía de afinidad

La purificación de las proteínas recombinantes se realizó por cromatografía de afinidad de unión a metales utilizando una resina conformada por ácido dinitriloacético agarosa (Ni-NTA, Invitrogen). En primer lugar, se procedió a equilibrar la resina con el *buffer* A conteniendo 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol y 5 mM de Imidazol, y posteriormente se añadió el sobrenadante obtenido luego de la lisis celular (sección 2.9.3.). Se incubó la resina con el sobrenadante durante 60 min en un baño de agua-hielo con agitación suave (50 rpm). Luego, se extrajo el sobrenadante por centrifugación conformando la muestra "*Flow-through*" que contiene las proteínas que no se unieron a la resina. Posteriormente, se realizaron 2 lavados de la resina con el *buffer* B: 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol y 10 mM Imidazol, obteniéndose el sobrenadante por centrifugación. En la etapa de lavado se eliminan proteínas no retenidas en la resina, como así también, se remueven uniones débiles e inespecíficas. Finalmente, la proteína de interés fue eluída utilizando el *buffer* C: 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol y 300 mM imidazol. El procedimiento de elución fue aplicado 4 veces almacenándose cada elución por separado. Todas las fracciones obtenidas fueron almacenadas a 4°C hasta su posterior uso. La cuantificación de las distintas muestras fue realizada mediante el método de Bradford, mientras que la pureza de las fracciones resultantes fue evaluada mediante electroforesis en geles de SDS-PAGE.

2.9.5.1.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación de proteínas fue efectuada en electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970) empleado el sistema

2. Materiales y Métodos

Enduro vertical Gel System (Labnet). Se utilizaron geles verticales de 10 cm de altura y 10 cm de ancho con un espesor de 1 mm. Para el gel de separación (8 cm de altura), se utilizó una concentración de poliacrilamida de 10 % (p/v), en 390 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 % (p/v) SDS, 0,1 % (p/v) persulfato de amonio (PSA) y 0,05 % (v/v) TEMED. El gel de concentración (2 cm de altura) contenía 3 % (p/v) de poliacrilamida en 126 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 % (p/v) SDS, 0,1 % (p/v) PSA y 0,05 % (v/v) TEMED. La relación de acrilamida/bis-acrilamida utilizada fue de 29:1. Las corridas electroforéticas fueron realizadas a temperatura ambiente con una intensidad de corriente entre 20 y 30 mA. Previo a la siembra, las muestras fueron tratadas en un baño a 95 °C durante 2 min, en una solución de desnaturalización conteniendo 50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2 % (p/v) SDS, 10 % (v/v) glicerol, 0,1 % (p/v) azul de bromofenol y 100 mM de DTT. El *buffer* de electrodo utilizado consistió en 25 mM Tris-base, 192 mM Glicina y 0,1 % (p/v) de SDS. Luego de la electroforesis, las proteínas fueron fijadas sumergiendo los geles en una solución de 30 % (v/v) etanol y 10 % (v/v) de ácido acético durante 10 min y teñidas utilizando una solución de 1 % (p/v) Azul de Coomassie R250 en etanol : ácido acético : agua (50 : 10 : 40). La solución decolorante consistió en 30 % (v/v) etanol y 7 % (v/v) de ácido acético y se aplicó con agitación suave durante al menos 6 h. El peso molecular de las bandas de interés se estimó con el marcador SDS-Standards Broad Range (BIO-RAD) 6,5 - 200 kDa.

2.9.5.1.2. Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se llevó a cabo según el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976), basado en el cambio de absorción de 465 a 595 nm que experimenta una solución de Coomassie Brilliant Blue G-250 al unirse a las proteínas presentes en la muestra. Se mezclaron 50 µL de muestra en 2,5 mL del reactivo de Bradford (sección 2.5.), se incubó 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se midió la absorción de la mezcla a 595 nm en espectrofotómetro (Genesys 50, UV-VIS, Thermo Fisher). Como patrón se utilizó la proteína BSA en un rango de concentraciones de 20 a 870 µg. Se obtuvo una ecuación de la recta para cada experimento, preparando las distintas concentraciones de BSA a partir de una solución madre de 870 µg/mL cuya concentración fue determinada espectrofotométricamente utilizando un valor de $A_{280\text{nm}}$ (0,1 %, 1 cm) de 0,667.

2. Materiales y Métodos

2.9.5.2. Diálisis

Las alícuotas de eluciones con mayor concentración de proteínas fueron agrupadas y dializadas contra un *buffer* de diálisis (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl y 10 % (v/v) de glicerol), cuyo valor de pH (entre 7,5 y 8) dependió del punto isoeléctrico (pI) de la enzima. Se consideró que el pH del *buffer* y el pI no resulten iguales, dado que en condiciones de igualdad la carga de la proteína resulta neutra y se genera un ambiente externo con gran fuerza iónica que llevaría a la precipitación de la proteína. La diálisis se realizó con membranas con tamaño de poro 12 - 14 kDa (Spectra/Por®2 Dialysis Membrane) y se incubó por 18 h con agitación a 5 °C. El volumen de *buffer* utilizado se aplicó en un factor volumétrico de 300 x con respecto al volumen de la muestra a dializar.

2.9.5.3. Concentrado de las proteínas purificadas

Luego de la diálisis, las muestras fueron concentradas por centrifugación utilizando columnas de ultrafiltración (Vivaspin 500, GE Healthcare) de 3 kDa MWCO (*Molecular weight cut-off*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron cuantificadas por el método de Bradford y posteriormente almacenadas en alícuotas a -20 °C con el agregado de glicerol a una concentración final de 5 % (v/v).

2.10. Extracción y caracterización de fucoïdanos

2.10.1. Sitios de recolección de las algas pardas

Se recolectaron ejemplares de dos especies de algas pardas presentes en distintos puntos costeros de la provincia de Chubut para la extracción de fucoïdanos. Fueron recolectados esporofilos de *U. pinnatifida* provenientes de arribazón en Cerro Avanzado, Puerto Madryn, Chubut (S 42 ° 49,77', O 64 ° 53,02', punto 3 en Figura 2.4.). Ejemplares de la especie *M. pyrifera* se recolectaron por corte desde la superficie del mar y proviene de poblaciones presentes en Bahía Camarones (S 44 ° 46,57, O 65 ° 34,47, punto 4 en Figura 2.4.A.), ubicado al norte del Golfo San Jorge. Ambas especies fueron recolectadas durante la estación de verano.

2. Materiales y Métodos

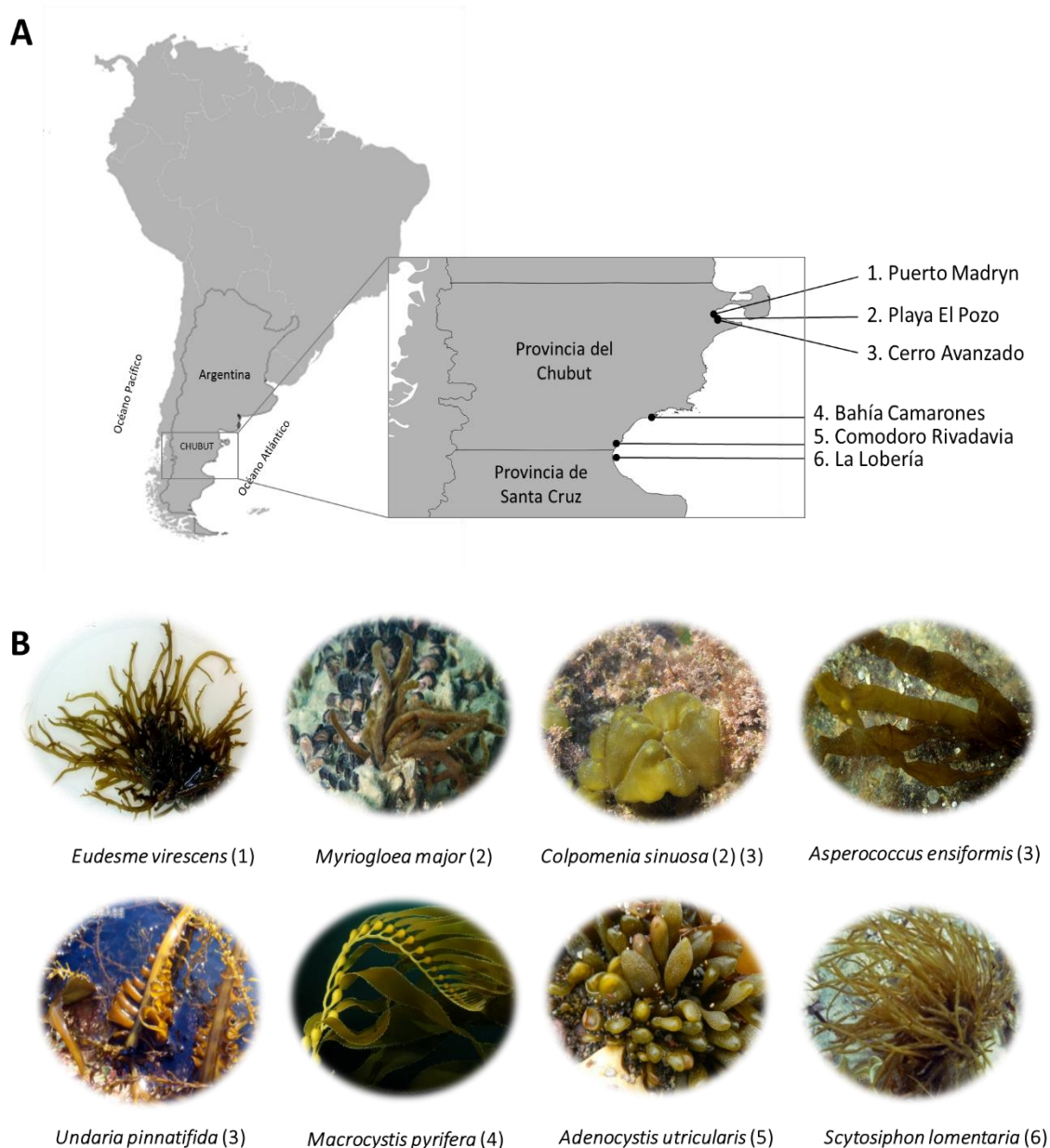


Figura 2.4. Especies de algas pardas a las que pertenecen los fucoidanos utilizados en este trabajo. A) Ubicación geográfica de los sitios en los que fueron recolectadas muestras de algas pardas para la extracción de fucoidanos. B) Fotografías de las distintas especies. (Imágenes extraídas de AlgaeBase, <https://www.algaebase.org>)

Seis extractos de fucoidanos pertenecientes a distintas especies de algas pardas fueron facilitados por investigadores (Dra. Ponce e Ing. Latour). Los fucoidanos extraídos por la Dra. Ponce provienen de las especies *Adenocystis utricularis* y *Scytosiphon lomentaria*, la primera fue recolectada en Playa Bonita ubicada en la ciudad de Comodoro Rivadavia (S 45 ° 59 ' , O 67 ° 35' , punto 5 en Figura 2.4.A.) y la restante en La Lobería (S 46 ° 08' , O 67 ° 40' , punto 6 en Figura 2.4.A.), en la provincia de Santa Cruz (Ponce *et al.*, 2003 y 2019). Los polisacáridos brindados por Ezequiel Latour provienen

2. Materiales y Métodos

de las especies *Colpomenia sinuosa* extraída de playa El Pozo (S 42°49'12", O 64°53'09", punto 2 en Figura 2.4.A.) y de Cerro Avanzado (S 42°50'02", O 64°52'03", punto 3 en Figura 2.4.A.), *Eudesme virescens* proveniente de Puerto Madryn (S 42°46'38", O 64°59'56", punto 1 en Figura 2.4.A.), *Myriogloea major* de playa El Pozo y *Asperococcus ensiformis* de Cerro Avanzado.

2.10.2. Extracción de los fucoidanos de *U. pinnatifida* y de *M. pyrifera*

Luego de su recolección, las muestras fueron lavadas con agua de mar y secadas hasta obtener peso constante a temperatura ambiente. La biomasa seca obtenida de *U. pinnatifida* fue molida por acción mecánica mediante el uso de una procesadora doméstica y posteriormente fue tamizada con una malla número 20. En el caso de *M. pyrifera*, se separaron cuidadosamente las láminas, el cauloide y los flotadores, y cada una de dichas partes fue molida en un molinillo de paletas con tamiz de malla 20. Se pesaron 100 g de esporofilos de *U. pinnatifida* secos y molidos, y 60 g de flotadores, cauloide y láminas de *M. pyrifera* también secos y molidos, para ser sometidos al procedimiento extractivo de los fucoidanos. Dicho procedimiento se resume en la Figura 2.5. En primer lugar, con el fin de remover pigmentos, se aplicó una extracción con metanol/cloroformo/agua en la proporción 4:2:1 con agitación durante 24 h a temperatura ambiente. El extracto resultante se filtró utilizando microfibras de vidrio (MUNKTELL M6-D: 2,7 µm y 47 mm de diámetro) obteniéndose un residuo que fue secado a temperatura ambiente por 24 h. Posteriormente, sobre todos los residuos se aplicaron dos extracciones secuenciales, en primer lugar con etanol 80 % (v/v) a temperatura ambiente durante 24 h, y luego a 70 °C durante 7 h. Los extractos fueron recuperados por centrifugación (SIGMA 4K15C, rotor 12166) a 11.960 xg, a 10 °C por 15 min, y los residuos obtenidos se dejaron secar bajo campana de extracción. La siguiente etapa de procedimiento extractivo consistió en el tratamiento con 0,01 M HCl (pH 2) durante 6 h a temperatura ambiente. El sobrenadante fue recuperado por centrifugación y tras neutralización con bicarbonato de sodio, fue concentrado en evaporador rotatorio (Buchi RE 111) con temperatura de baño de agua menor a 45 °C. El volumen concentrado fue dializado en bolsa de poro 6 – 8 kDa (Spectra, relación 7,9 mL/cm) durante 72 h contra agua corriente y luego por 48 h contra agua destilada. Finalmente los extractos fueron reunidos y liofilizados (liofilizador L T-12 Rificor) a una

2. Materiales y Métodos

presión menor de 0,1 mm Hg y a una temperatura aproximada de -45 °C. Posteriormente, se calcularon los respectivos rendimientos de cada extracción (gramos de extracto por 100 g de peso seco).

Los extractos provenientes de las distintas partes del talo de *M. pyrifera* fueron nombrados como **EFLO**, **ELAM** y **ECAU** para fucoidanos provenientes de flotadores, láminas y cauloide respectivamente. El extracto de fucoidanos provenientes de esporofilos de *U. pinnatifida* se nombró **EUND**.

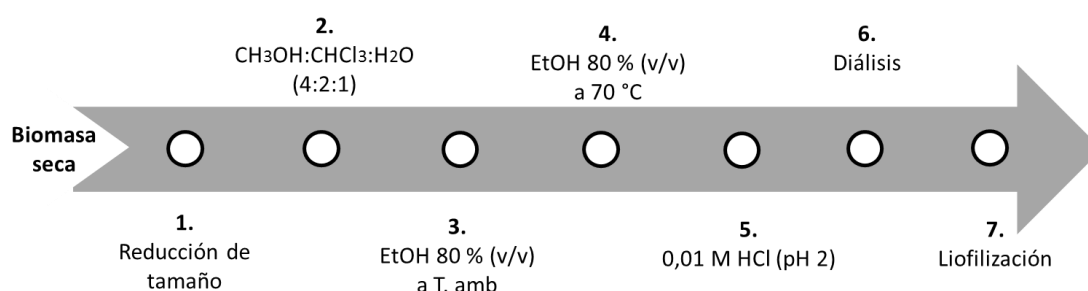


Figura 2.5. Esquema de la serie de pasos aplicados en la extracción de fucoidanos a partir de la biomasa seca. Todos los pasos, a excepción del 4 y el 7, fueron realizados a temperatura ambiente.

2.10.2.1. Caracterización de los extractos mediante técnicas analíticas

2.10.2.1.1. Determinación de azúcares totales

Se llevó a cabo mediante el método fenol-sulfúrico utilizando fucosa como estándar (Dubois *et al.*, 1951). A los fines de obtener una solución conteniendo hasta 80 µg/mL de hidratos de carbono, se pesaron aproximadamente 4 mg de extractos y/o fracciones de fucoidanos y se disolvieron en 10 mL de agua destilada. Se tomaron alícuotas de 50, 100 y 150 µL de las muestras y se realizaron 3 réplicas para cada volumen. A todos los tubos se le adicionaron 0,5 mL de fenol al 5 % (p/v) y se agitaron utilizando un agitador tipo vórtex. Luego, se agregaron 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (98 % grado analítico) sobre la superficie de la solución a fin de asegurar un calentamiento máximo y se dejaron reposar 10 min. Transcurrido este tiempo, los tubos se agitaron en vórtex y se mantuvieron 20 min a temperatura ambiente. En forma paralela, se preparó un blanco con agua destilada. Finalmente se leyó la absorbancia del color desarrollado a 490 nm y el contenido de hidratos de carbono totales se cuantificó

2. Materiales y Métodos

por referencia a curvas patrón de fucosa. El resultado se expresó como porcentaje de azúcar anhidro (x 146/164).

2.10.2.1.2. Determinación de ácidos urónicos

Se realizó siguiendo la modificación de Filisetti-Cozzi y Carpita del método de Blumenkrantz y Asboe-Hansen (Filisetti-Cozzi y Carpita, 1991). Para la determinación se prepararon los siguientes reactivos:

- Solución A: ácido sulfámico/sulfamato de potasio 4 M (pH 1,6).
- Solución B: tetraborato de sodio 0,0125 M en ácido sulfúrico concentrado, grado analítico.
- Solución C: *m*-hidroxidifenilo (0,15 %) en hidróxido de sodio acuoso al 0,5 % (p/v).

Se pesaron aproximadamente 4 mg de fucoidanos, y fueron disueltos en 10 mL de agua destilada. Se tomaron alícuotas de la muestra de polisacárido de 100, 200 y 300 μ L y se llevaron a un volumen final de 400 μ L con agua destilada. De esta forma, se obtuvieron hasta 200 nmoles de ácido hexurónico en dicho volumen final. El blanco consistió en 400 μ L de agua destilada. Se preparó una solución patrón de D-glucuronalactona de una concentración de 80 μ g/mL. Posteriormente se agregaron 40 μ L de Solución A en cada tubo y se agitó en vórtex. Sobre los tubos colocados en baño de hielo, se adicionaron 2,5 mL de la Solución B. Nuevamente se agitaron los tubos, y se llevaron a un baño de agua a 100 °C durante 20 min. Luego, se colocaron en un baño de hielo para alcanzar la temperatura ambiente rápidamente y se agregaron 80 μ L de la Solución C. Finalmente se agitaron los tubos, se dejaron reposar 5 min y se determinó la absorbancia a 525 nm.

2.10.2.1.3. Determinación cuantitativa de proteínas totales

Se determinó a partir de la técnica descrita por Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Para la determinación de proteínas totales se utilizaron los siguientes reactivos:

- Solución A: solución de carbonato de sodio al 2 % (p/v) en hidróxido de sodio 0,1 M.
- Solución B: sulfato cúprico pentahidratado al 0,5 % (p/v) en solución de tartrato de sodio y potasio al 1 % (p/v).

2. Materiales y Métodos

- Solución C: se mezclaron 50 mL de la Solución A y 1 mL de la Solución B.
- Solución D: dilución al medio de un volumen del reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck).

Se tomaron alícuotas de la solución de la muestra conteniendo hasta 500 µg de proteínas por mL, y se llevaron a un volumen final de 0,5 mL con agua destilada. A cada tubo se le añadió 2,5 mL de Solución C, se mezclaron en vórtex y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se agregaron 0,2 mL de Solución D y se agitó rápidamente. Finalmente, las muestras se incubaron 30 min a temperatura ambiente para luego obtener las absorbancias mediante lectura a 600 nm. En forma paralela, se preparó una curva patrón con solución de BSA de concentración 500 µg/mL. Los resultados fueron expresados en gramos de proteína por 100 g de extracto seco (% p/p).

2.10.2.1.4. Determinación del contenido de ésteres sulfato.

Esta determinación se realizó por medio del método turbidimétrico de Dodgson y Price (Dodgson y Price, 1962).

Para la determinación, se prepararon los siguientes reactivos:

- Cloruro de bario-gelatina: se preparó por disolución de 200 mg de gelatina (Oxoid, libre de sulfatos) en 40 mL de agua destilada, a 60 - 70 °C. Esta solución se mantuvo en heladera por 24 h. Luego se disolvieron en la misma 200 mg de cloruro de bario (grado analítico) y se almacenó en heladera por 3 h.
- Solución de ácido tricloroacético (TCA) 3 % (p/v): se preparó por disolución de 15 g del ácido en agua destilada, llevando a un volumen final de 500 mL.

Se dispusieron hasta 3 mg de las muestras conteniendo entre 20 y 200 µg de SO_4^{2-} /0,2 mL de solución final, en viales con tapas de teflón. La hidrólisis se llevó a cabo en 1 mL de 1 M HCl por 4,5 h a 110 °C. Una vez enfriadas las muestras, se tomaron alícuotas del hidrolizado que fueron llevadas a un volumen final de 400 µL con 1 M HCl. A cada muestra se le añadió 2,8 mL de 3 % (p/v) TCA y se agitó en vórtex. Luego, se agregaron 800 µL de reactivo cloruro de bario-gelatina y tras agitar nuevamente se dejó en reposo por 20 min. Como patrón se utilizó una solución de sulfato de sodio anhidro de una concentración equivalente a 400 µg/mL de SO_4^{2-} . El blanco fue realizado en

2. Materiales y Métodos

condiciones idénticas, utilizando 500 µL de 1 M HCl. Finalmente se procedió a leer las absorbancias a una longitud de onda de 360 nm.

2.10.2.1.5. Determinación de los azúcares componentes

A los fines de conocer y comparar la composición de azúcares neutros de los fucoidanos extraídos, se realizó un análisis mediante cromatografía gaseosa previa derivatización a los alditoles peracetilados correspondientes del polisacárido hidrolizado (Albersheim *et al.*, 1967; Shea y Carpita, 1988). Cada muestra fue realizada por triplicado.

2.10.2.1.6. Hidrólisis ácida con ácido trifluoroacético (TFA)

Se colocaron hasta 4 mg de muestra en viales con tapa de teflón, y se hidrolizaron con 1 mL de 2 M TFA por 90 min en estufa a 121 °C. Una vez cumplido el tiempo de la reacción, los viales fueron llevados a sequedad bajo corriente de aire. Posteriormente, los hidrolizados fueron disueltos en agua y evaporados nuevamente. Este tratamiento se realizó 4 veces a los efectos de eliminar totalmente el ácido. Las muestras fueron colocadas en un desecador al vacío durante una noche.

2.10.2.1.7. Preparación de los alditoles peracetilados

A las muestras secas contenidas en los viales (provenientes de las hidrólisis), se les agregaron 0,5 mL de hidróxido de amonio 1 M y se redujeron con borohidruro de sodio (5 mg) durante 12 h a temperatura ambiente. En un paso posterior se adicionaron gotas de ácido acético diluido para eliminar el exceso de agente reductor hasta que cesó la efervescencia, y se descationizaron por agregado de resina Amberlite IR-120 (H⁺). Las muestras se filtraron y evaporaron a sequedad bajo corriente de aire. El ácido bórico generado se eliminó como borato de metilo, mediante 5 lavados de 0,5 mL de metanol y evaporación a sequedad en cada oportunidad. Se dejaron en desecador al vacío durante una noche y la mezcla de alditoles obtenida se acetiló con 1 mL de anhídrido acético-piridina (1:1), calentando durante 45 min a 100 °C. La solución resultante se enfrió y se extrajo con 2 mL de cloroformo-agua (1:1). La fase acuosa se recuperó y se extrajo nuevamente con una mezcla de iguales características. Los extractos clorofórmicos se reunieron y fueron lavados 3 veces con 1 mL de solución saturada de bicarbonato de sodio y dos veces con 1 mL de agua destilada. En todos los casos se fue

2. Materiales y Métodos

descartando la fase acuosa. Finalmente, se secaron con cantidad necesaria de sulfato de sodio anhidro y se evaporaron.

Las cromatografías gas-líquido se realizaron en un cromatógrafo Nexis GC-2030 Shimadzu equipado con un detector de ionización de llama (FID). Se utilizó nitrógeno como gas portador y las corridas se efectuaron con una relación de split 90:1. Se utilizó una columna capilar SP-2330 (Supelco), de 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y 0,20 μm de espesor de la fase líquida. El flujo del gas portador fue de 1 mL/min y la presión en cabeza de columna fue de 15 Psi (= 1,02 atm). Se realizó una corrida isotérmica a 220 °C y las temperaturas del inyector y detector fueron de 240 °C.

Previamente a ser inyectadas en el cromatógrafo, las muestras se disolvieron con 10 a 20 μL de cloroformo. Además de las muestras, se inyectó una mezcla de estándares de alditos peracetilados obtenido por derivatización de: L-ramnosa, L-fucosa, D-arabinosa, D-xilosa, D-manosa, D-galactosa y D-glucosa.

Se calcularon los moles % de cada monosacárido en función de las áreas obtenidas para cada uno y sus respectivos pesos moleculares. Se consideró que el área es proporcional al peso del derivado que pasó por el FID.

Para el análisis de los azúcares metilados se utilizó un programa de temperaturas (Shea y Carpita, 1988): 160 °C \rightarrow 210 °C, a 2 °C/min y luego 210 °C \rightarrow 240 °C, a 5 °C/min. En este caso las temperaturas del inyector y detector se mantuvieron a 245 °C.

2.10.2.1.8. Determinación del peso molecular por cromatografía de permeación en gel

La determinación del peso molecular de los fucoidanos fue realizada por cromatografía de permeación en geles (GPC) en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (GPC-HPLC). Este equipo pertenece al CIHIDECAR-CONICET y fue realizado por el operador del equipo. Se utilizó una bomba Shimadzu LC-20AT y un detector de índice de refracción Shimadzu RID-10A. Los análisis se realizaron utilizando columnas conectadas en serie. Se utilizaron las columnas PolySep-GFC-P 5000 y Progel-TKS G4000-PWXL (ambas de 300 x 7,8 mm). Como solvente de elución se utilizó una solución de nitrato de sodio 0,05 M conteniendo 0,02 % (p/v) de NaN_3 preparada con agua de calidad HPLC (Sigma-Aldrich). Se trabajó a flujo constante de 0,6 mL/min. Se inyectaron 100 μL de una solución 3 mg/mL del polisacárido disuelto en la fase móvil y

2. Materiales y Métodos

previamente filtrado a través de una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,22 μm (GV, Millipore). La columna se calibró usando dextrans y oligosacáridos sulfatados de pesos moleculares conocidos como estándares. El rango de peso molecular utilizado para la calibración estuvo entre 6 kDa y 500 kDa, y entre 400 Da y 1200 Da.

2.10.3. Fraccionamiento del sistema de polisacáridos

Se aplicó la metodología de precipitación con una sal de amonio cuaternario para los fucoidanos extraídos de flotadores (**EFLO**) y láminas (**ELAM**) de *M. pyrifera*.

2.10.3.1. Precipitación con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)

De los extractos obtenidos, se pesaron 0,6 ó 1 g que fueron disueltos en 120 mL de agua destilada. Luego se agregó una solución de 10 % (p/v) de CTAB, agitando lentamente hasta que la reacción de precipitación sea negativa, es decir, que todos los polisacáridos cargados se encuentren insolubilizados. El soluble obtenido tras centrifugación constituyó la fracción F0 (Figura 2.6.). Luego el precipitado de las sales de CTAB se suspendió en una solución de 0,5 M NaCl, y se agitó durante toda la noche. Posteriormente, el precipitado se centrifugó y la fracción sobrenadante constituyó la fracción F1 (Figura 2.6.), la cual se extrajo con *n*-pentanol (3x30 mL), se dializó, concentró y liofilizó. El mismo procedimiento se efectuó tratando el precipitado con concentraciones de NaCl de 1, 2 y 3 M, a partir de las cuales se obtuvieron las fracciones F2, F3 y F4 respectivamente (Figura 2.6.).

2. Materiales y Métodos

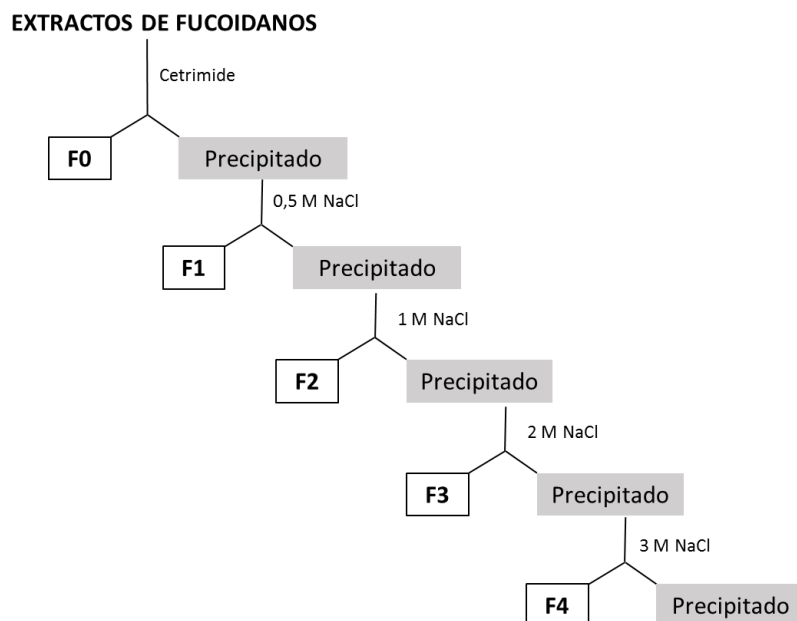


Figura 2.6. Esquema de la serie de pasos aplicados en el fraccionamiento de fucoidanos a partir de los extractos de fucoidanos obtenidos de láminas y cauloides de *M. pyrifera*.

2.10.3.2. Caracterización química de las fracciones obtenidas

Sobre las fracciones obtenidas a partir de la precipitación de fucoidanos con CTAB y posterior redisolución con soluciones de concentraciones crecientes de NaCl, se aplicaron los análisis descritos en la sección 2.10.2.1., los cuales incluyen el porcentaje de azúcares totales, ácidos urónicos, azúcares componentes, contenido de grupos sulfato y proteínas, como sí también se calcularon los rendimientos obtenidos.

2.10.3.2.1. Determinación del peso molecular por cromatografía de permeación en gel

La determinación del peso molecular de las fracciones obtenidas fue realizada por GPC tal como se describe en la sección 2.10.2.1.8.

2.10.3.3. Análisis de desulfatación

La desulfatación de las fracciones de fucoidanos se llevó a cabo utilizando microondas, según el método de Navarro y colaboradores (Navarro *et al.*, 2007). Se partió de las sales de piridinio de los polisacáridos. Para preparar dichas sales, aproximadamente 20 mg de muestra fueron disueltos en 3 mL de agua destilada y pasados a través de una columna ácida Amberlite IR-120 (H⁺) previamente activada a la forma piridinio. Luego se agregaron 2 ó 3 gotas de piridina hasta llegar a pH neutro, y se procedió a liofilizar. Posteriormente, dicha sal de piridinio fue disuelta en 9,8 mL de

2. Materiales y Métodos

DMSO y en 0,2 mL de pridina anhidra. La mezcla fue trasvasada a un recipiente de teflón con tapa a rosca y tratada en horno a microondas SHARP mediante 6 pulsos de 10 s cada una, enfriando en baño de hielo tras cada tratamiento. Luego una porción se reservó para proceder a la desulfatación, y el resto se dializó en bolsa de poro 3500 durante 48 h en sistema abierto y 24 h más en sistema cerrado, para finalmente ser liofilizada.

2.10.3.4. Análisis de metilación

Para proceder a los análisis de metilación, se prepararon las sales de trietilamonio de las fracciones de polisacáridos (Ponce *et al.*, 2003). Se disolvieron entre 12 y 15 mg de las muestras en 0,5 mL de agua y se sembraron en una columna que contenía una resina ácida fuerte Amberlite IR-120 (H⁺) previamente equilibrada con clorhidrato de trietilamonio al 5 % (p/v). Posteriormente, se lavó con abundante agua hasta reacción negativa de cloruros en las aguas de lavado. Las sales de trietilamonio de los polisacáridos se recuperaron por elución con agua, luego se liofilizaron y posteriormente se realizó la metilación. Para ello las muestras, aproximadamente 15 mg, se disolvieron como sus sales de Et₃NH⁺ en 2 mL de DMSO y se calentó a 50 °C hasta disolución completa. Luego de enfriar, se agregaron 100 mg de hidróxido de sodio pulverizado y se agitó en agitador magnético durante 15 min. A continuación, se agregaron 0,5 mL de yoduro de metilo y se agitó por 30 min. Luego se agitó por el mismo período pero a 50 °C y se dejó enfriar. Este procedimiento se repitió dos veces más. Para finalizar, se llevó a neutralidad con ácido acético, se burbujeó nitrógeno a través de una aguja, se dializó y liofilizó.

Para la metilación de los fucoidanos desulfatados aproximadamente a 1,5 mL de la solución de dichos productos, se le agregó una espátula de hidróxido de sodio pulverizado, y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Luego, se agregó 1 mL de yoduro de metilo y se continuó la agitación durante 1 h. Finalmente, sobre un baño de hielo se agregaron unas gotas de agua destilada y se procedió a dializar los polisacáridos desulfatados y metilados, en una membrana de poro 3500.

2.10.3.5. Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance Neo a 500,13 (¹H) y 125,77 (¹³C) MHz a temperatura ambiente. Este análisis fue realizado como

2. Materiales y Métodos

servicio por el UMYMFOR-CONICET. Se utilizó acetona como estándar interno, el grupo metilo se calibró en 31,1 ppm en ^{13}C y en 2,22 ppm en ^1H . Se pesaron 20 mg de muestra que fueron disueltos en 800 μL de agua destilada, disponiéndose, previa filtración, en tubos de 5 mm de diámetro. Se efectuaron análisis bidimensionales de las fracciones de fucoidanos (HSQC, *Heteronuclear Single Quantum Coherence*). Los espectros HSQC se realizaron con la secuencia “hsqcetgpsi2” y los parámetros utilizados fueron los siguientes: TD de 1532 x 512, NS de 16 y un tiempo de relajación de 1,52 s.

2.11. Determinación de actividad fucoidanasa y caracterización de los productos resultantes

La determinación de la actividad enzimática se realizó mediante visualización de los productos resultantes de la catálisis en un gel de poliacrilamida de carbohidratos (C-PAGE).

2.11.1. Reacción enzimática a baja escala

El volumen final de la reacción fue de 30 μL , y consistió en un *buffer* de reacción de 100 mM Tris-HCl (pH 7,5) y 500 mM NaCl, 0,4 % (p/v) de extractos de fucoidanos de distintas especies de algas pardas y 1 μM de las enzimas purificadas. La reacción se incubó por 25 min a 25 °C, y se detuvo por incubación a 100 °C durante 2 min. Los controles negativos consistieron en el agregado del *buffer* de reacción en lugar de la enzima.

2.11.2. Determinación de las condiciones óptimas para la catálisis

Se evaluaron distintas condiciones con el propósito de determinar las condiciones óptimas para la actividad enzimática.

-Temperatura: Las temperaturas evaluadas fueron 5, 10, 15, 20, 25, 35, 45, 55 y 65 °C en cámara con temperatura controlada, evaluándose la actividad a los 30 s y al minuto.

-pH: para identificar el pH óptimo de actividad fucoidanasa se realizaron pruebas de actividad enzimática a la temperatura óptima identificada y variando el pH en un rango de 2,5 a 10. Para ello, se empleó una serie de soluciones *buffer* con concentración final en 100 mM y 500 mM de NaCl.

- *buffer* PIPES: pH 2,5, 3,5 y 5,5

2. Materiales y Métodos

- *buffer* Acetato de Sodio: pH 4,5
- *buffer* HEPES: pH 6,5
- *buffer* Tris-HCl: pH 7,5, 8, 8,5 y 9
- *buffer* Ácido bórico/KCl: pH 10

-Tiempo de reacción enzimática: se evaluaron tiempos de actividad enzimática desde los 30 s hasta los 50 min aplicando la temperatura óptima identificada.

-Salinidad: se evaluó el efecto de la concentración de NaCl desde valores de 10 a 1300 mM, realizando las reacciones de hidrólisis según las condiciones estandarizadas previamente.

La presencia de productos resultantes de la degradación fue visualizada en una electroforesis en gel de poliacrilamida de carbohidratos (C-PAGE), como se describe a continuación.

2.11.3. Visualización de los oligosacáridos resultantes de la actividad enzimática

Se analizaron entre 6 y 10 μ L resultantes de la actividad enzimática mediante la técnica C-PAGE. En este método, los oligosacáridos se resuelven de acuerdo a su peso molecular y su carga en un gel de poliacrilamida (Cao, 2019).

2.11.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida de carbohidratos

Se utilizaron geles verticales de 10 cm de altura y 10 cm de ancho con un espesor de 1 mm. Para el gel de separación (8 cm de altura), se utilizaron concentraciones de poliacrilamida de 27 % (p/v), en 100 mM Tris-HCl (pH 7,8) y 0,1 % (p/v) APS. El gel de concentración (2 cm de altura) contenía 6 % (p/v) de poliacrilamida en la misma concentración final de Tris y APS que el gel de separación. En ambos casos la relación de acrilamida/bis-acrilamida utilizada fue 29:1. Las corridas electroforéticas fueron realizadas a temperatura ambiente con una intensidad de corriente de 20 mA durante 4 h. Previo a la siembra, a cada muestra se le añadieron 2 μ L de una solución de 5 % (v/v) glicerol y 0,005 % (p/v) de azul de bromofenol. El *buffer* de electrodo consistió en 40 mM Tris-HCl (pH 7,8) y 40 mM de ácido acético glacial. Luego de la electroforesis, los oligosacáridos fueron teñidos sumergiendo los geles en una solución de 0,03 % (p/v) de azul de Alcian 8 GX en 2 % (v/v) de ácido acético glacial o en 0,1 % (p/v) de azul de

2. Materiales y Métodos

toluidina disuelto en 1 % (v/v) de ácido acético glacial. En ambos casos la decoloración se realizó con el uso de una solución de ácido acético 1 % (v/v). Se tomaron fotografías utilizando un transiluminador de luz blanca y posteriormente se realizó un análisis por densitometría de la banda de menor peso molecular mediante el programa ImageJ v1.52.

2.11.5. Reacción enzimática a mayor escala: separación y análisis de oligosacáridos

La reacción enzimática descrita anteriormente fue realizada a una mayor escala, utilizando como sustrato el extracto de fucoidanos de láminas de *M. pyrifera* (**ELAM**) y una de las fracciones purificada a partir del extracto de flotadores de la misma especie (**F4FLO**, obtenida por redisolución con 3 M de NaCl). En este último caso se utilizaron como sustrato 100 mg de la fracción **F4FLO**, los cuales fueron disueltos en 3 mL de *buffer* 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl. A dicho volumen se le añadieron 100 µL de enzima fucoidanasa #113643 (1 µg/µL), y se dejó actuar durante 50 h a 25 °C con agitación suave. La actividad enzimática se detuvo por calentamiento a 80 °C durante 10 min, y el precipitado obtenido fue removido por centrifugación 10.000 xg durante 20 min. Posteriormente, los productos de alto peso molecular resultantes fueron precipitados con etanol 96 % (v/v) en una relación 1:3 (v/v), y luego se centrifugó a 9.000 xg durante 20 min. El sobrenadante obtenido, que contenía productos de bajo peso molecular, fue concentrado utilizando un evaporador rotatorio (Buchi RE 111) con temperatura de baño de agua menor a 45 °C. Los productos de bajo peso molecular así obtenidos fueron sembrados en una columna de Bio-Gel P-6 (1,5 x 90 cm, Bio-Rad), equilibrada con agua destilada. La elución fue realizada con agua destilada recogiendo fracciones de 2,7 mL mediante el uso de un colector automático. Se determinó el contenido de azúcares totales mediante el método fenol-sulfúrico (sección 2.10.2.1.1.) en las alícuotas de cada una de las fracciones obtenidas. Las distintas fracciones fueron liofilizadas. Previamente, se efectuó la determinación de V_0 y V_T de dicha columna, utilizando azul dextrano y fucosa.

En la segunda estrategia utilizada se pesaron 200 mg de extracto de lámina (**ELAM**) de *M. pyrifera*, que fueron disueltos en 15 mL de *buffer* 100 mM Tris-HCl (pH 7,5) y 300 mM NaCl. A dicho volumen se le añadió 1 mL de enzima #113643 (0,6 µg/µL), la cual se dejó actuar durante 70 h a 25 °C, con agitación constante (60 rpm). La actividad

2. Materiales y Métodos

enzimática se detuvo por calentamiento realizando posteriormente la serie de pasos descritos en la estrategia anterior. La fracción principal proveniente de la cromatografía sobre Bio-Gel P-6, fue solubilizada en agua destilada y aplicada en una columna de Bio-Gel P-2 (1,5 x 73 cm). La elución se llevó a cabo con agua destilada, recogiendo fracciones de 2,7 mL y luego se procedió de igual manera a lo descrito en el caso de la columna Bio-Gel P-6. Previamente, se efectuó la determinación de V_0 y V_T , sobre dicha columna utilizando azul dextrano y fucosa. Las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante GPC y RMN bidimensional (HSQC). Sobre la fracción principal se determinó la composición de monosacáridos mediante CG y el contenido de sulfato fue determinado mediante cromatografía iónica isocrática, utilizando una columna aniónica DIONEX AS4A, y como eluyente una solución de Na_2CO_3 1,8 mM- HNCO_3 1,7 mM en un equipo DIONEX DX-100 (servicio brindado por INQUIMAE-CONICET, FCEN-UBA). Además, se realizó un análisis de espectrometría de masas (servicio brindado por UMYMFOR-CONICET), en un espectrómetro Bruker micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) equipado con una fuente de ionización electrospray empleada en modo negativo (ESI).

3. FUCOIDANOS: EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y FRACCIONAMIENTO

3. Fucoïdanos: Extracci3n, purificaci3n y fraccionamiento

3.1. INTRODUCCI3N

Los fucoïdanos presentan una amplia diversidad estructural, lo cual suele constituir una gran dificultad para la determinaci3n de su composici3n y estructura quïmica. Existen diferentes mïtodos de extracci3n de fucoïdanos, los cuales pueden afectar la composici3n quïmica y el rendimiento de los mismos (Mak *et al.*, 2014). Aùn no existe un consenso sobre quï mïtodo de extracci3n permite obtener fucoïdanos de mayor calidad y que a su vez, conserven su composici3n quïmica natural. Dentro de los factores implicados se incluyen: el tiempo de extracci3n, la temperatura y el solvente utilizado. Cada tïcnica presenta ventajas y desventajas, y su conveniencia va a depender del costo, eficiencia de la extracci3n, tiempo e impacto ambiental (Liu *et al.*, 2020). Por otro lado, la estructura quïmica tambiïn es dependiente de la especie de alga parda, del ciclo de vida en el que se encuentre el organismo en el momento de cosecha, de la localizaci3n geogrãfica y del tipo de tejido utilizado, ya sea vegetativo o reproductivo (Ponce *et al.*, 2020; Shanti *et al.*, 2021). Se ha reportado que diferentes tipos de fucoïdanos pueden coexistir en la misma especie, incluso en la misma parte del alga (Mark *et al.*, 2014). En este contexto, la elecci3n de un mïtodo de extracci3n y purificaci3n resulta de un paso esencial para la obtenci3n de fucoïdanos puros y bioactivos.

Los fucoïdanos, como la mayorïa de los polïmeros, son polidispersos. Esto significa que no existe un peso molecular definido, sino que al obtenerlos se trata de una mezcla de pesos moleculares (Fitton *et al.*, 2015; Vanavil *et al.*, 2020). Esta complejidad y heterogeneidad presente en las molïculas de fucoïdanos varïa no solo por el mïtodo de extracci3n aplicado y de la fuente macroalgal, sino tambiïn por las condiciones climãticas de crecimiento del alga y el momento de cosecha (Hentati *et al.*, 2018). Estas caracterïsticas, sumado a su naturaleza heterogïnea han dificultado los estudios estructurales en profundidad (Bilan y Usov, 2008).

En este capïtulo se exponen los resultados obtenidos en la extracci3n de fucoïdanos de dos especies de algas pardas de la costa Patag3nica (*U. pinnatifida* y *M. pyrifera*), como asï tambiïn el posterior fraccionamiento de aquellos provenientes de *M. pyrifera* y los estudios de elucidaci3n estructural. Estos estudios fueron necesarios dado que no se contaba con dicha informaci3n, que resulta de mucha utilidad para

3. Fucoïdanos: Extracci3n, purificaci3n y fraccionamiento

complementar la informaci3n que se obtiene al analizar los productos de degradaci3n generados por las enzimas fucoïdanasas que constituyen la base de esta tesis doctoral.

3.2. RESULTADOS

3.2.1. Extracci3n y an3lisis qu3mico de los fucoïdanos de algas pardas

Las algas recolectadas fueron lavadas con agua de mar a los efectos de eliminar restos de organismos epif3ticos, sedimentos y residuos org3nicos. Posteriormente fueron trasladadas al laboratorio donde se realiz3 un segundo lavado con agua de mar para luego ser secadas a temperatura ambiente sobre papel. Se aplicaron varias rotaciones durante el d3a para evitar adhesiones al papel. El secado se mantuvo hasta que las algas presentaron un peso constante.

La extracci3n de fucoïdanos se realiz3 de acuerdo al protocolo descrito en la secci3n 2.10.2, a partir de la biomasa seca de ejemplares de las especies de algas pardas *U. pinnatifida* y *M. pyrifera*. Las extracciones se llevaron a cabo con 3cido clorh3drico (pH 2) durante 6 h y a temperatura ambiente, dando lugar a los extractos **EFLO**, **ELAM** y **ECAU** en el caso de flotadores, l3minas y cauloides de *M. pyrifera*, respectivamente, y **EUND** para los fucoïdanos de espor3filos de *U. pinnatifida*. Se obtuvo un rendimiento del 10 % (gramos de extracto/100 g de peso seco) en la extracci3n de fucoïdanos de espor3filos de *U. pinnatifida*, mientras que para **EFLO**, **ELAM** y **ECAU** los rendimientos fueron 3 %, 6 % y 5,5 % respectivamente.

La composici3n qu3mica de los extractos obtenidos se encuentra resumida en las tablas 3.1. y 3.2. Las muestras de fucoïdanos extra3dos en este trabajo consistieron principalmente en hidratos de carbono (44 – 70 %), presentaron importantes proporciones de grupos sulfatos (16 – 29,4 %) y menores de 3cidos ur3nicos (5,7 – 10,8 %). Los extractos de fucoïdanos de las distintas partes del talo de *M. pyrifera* (flotadores, l3minas y cauloides), presentaron un mayor porcentaje de grupos 3ster sulfato con respecto a los fucoïdanos obtenidos a partir de *U. pinnatifida* (Tabla 3.1.). Los productos obtenidos de la l3mina de *M. pyrifera* mostraron porcentajes de hidratos de carbono y de 3steres sulfato superior a los aislados a partir de flotadores y cauloides, mientras que ocurri3 lo inverso con el contenido de 3cidos ur3nicos. Sin embargo, las diferencias encontradas no resultaron significativas (p-valor > 0,05).

3. Fucoïdanos: Extracci3n, purificaci3n y fraccionamiento

Tabla 3.1. Caracterizaci3n quımica de los fucoïdanos extraıdos de distintas especies de algas pardas. Los resultados est3n expresados en % (p/v) de compuesto por 100 g de peso seco.

Especie	Origen del fucoïdano	Nombre del extracto	Ácidos ur3nicos (%)	Sulfatos (% SO ₃ Na)	Hidratos de carbono (% anh.)
<i>Undaria pinnatifida</i>	Espor3filos	EUND	9,6	16,3	70,0
<i>Macrocystis pyrifera</i>	Flotadores	EFLO	10,8	25,0	44,3
<i>Macrocystis pyrifera</i>	L3minas	ELAM	5,7	29,4	50,2
<i>Macrocystis pyrifera</i>	Cauloides	ECAU	9,1	27,1	44,7
<i>Scytosiphon lomentaria</i> ¹	Alga entera	ES	7,1	18,6	73,0
<i>Adenocystis utricularis</i> ¹	Alga entera	EA	8,0	32,0	59,0
<i>Myriogloea major</i> ²	Alga entera	EM	13,1	19,1	58,6

¹Datos publicados por Ponce *et al.*, 2003; 2019.

² Datos publicados por Conesa *et al.*, 2023.

Los fucoïdanos provenientes de las especies *S. lomentaria*, *A. utricularis* y *M. major* fueron extraıdos con 3cido clorhıdrico diluido y caracterizados con anterioridad por el grupo de la Dra. Ponce (Ponce *et al.*, 2003; Ponce *et al.*, 2019; Conesa *et al.*, 2023), quıen facilit3 dicho material para la caracterizaci3n de las enzimas expresadas. De los polisac3ridos evaluados aquel perteneciente a *M. major* present3 el mayor porcentaje de 3cidos ur3nicos, mientras que *A. utricularis* present3 el mayor contenido de sulfato y *S. lomentaria* el mayor porcentaje de hidratos de carbono anhidro (Tabla 3.1.).

Respecto de la composici3n monosacarıdica en los distintos extractos, la fucosa fue el monosac3rido m3s abundante (Tabla 3.2.), alcanzando un 48,4 % en el fucoïdano de *U. pinnatifida* y entre 78 – 86 % en los fucoïdanos provenientes de *M. pyrifera*. Al igual que en las especies nombradas anteriormente, en los fucoïdanos de *S. lomentaria*, *M. major* y en los de *A. utricularis* predomin3 la fucosa. A excepci3n del extracto **EM**, el segundo monosac3rido m3s importante fue la galactosa. Este 3ltimo tambi3n present3 cantidades significativas de glucosa (11,2 %).

En los tres extractos de fucoïdanos de *M. pyrifera*, los porcentajes de los restantes az3cares neutros analizados (exceptuando la fucosa y la galactosa), fueron ≤ 10 % (Tabla 3.2.). Con respecto al extracto **EUND**, la galactosa alcanz3 proporciones similares a la fucosa, con lo cual la relaci3n fucosa/galactosa fue cercana a 1.

3. Fucoïdanos: Extracci3n, purificaci3n y fraccionamiento

Tabla 3.2. Composici3n de monosac3ridos (moles/100 moles de az3cares)* de fucoïdanos extra3idos de distintas especies de algas pardas.

Extracto	Fucosa	Xilosa	Galactosa	Glucosa	Ramnosa	Arabinosa	Manosa
EUP	48,5	0,7	42,9	1,20	3,1	1,5	2,1
EFLO	78,5	3,4	9,9	Trazas ³	0,9	3,3	3,9
ELAM	83,4	1,8	10,2	Trazas ³	0,5	1,7	2,4
ECAU	85,9	3,1	6,0	Trazas ³	0,5	0,9	3,5
ES¹	70,0	4,0	11,0	5,0	4,0	-	6,0
EA¹	84,0	Trazas ³	10,0	1,0	1,0	-	4,0
EM²	77,1	3,4	5,3	11,2	0,6	2,2	0,3

* Derivatizados como alditoles peracetilados y analizados por cromatograf3a gaseosa.

¹ Datos publicados por Ponce *et al.*, 2003; 2019.

² Datos publicados por Conesa *et al.*, 2023.

³ Proporciones menores a 0,5 mol/100 mol.

Los an3lisis del contenido de prote3nas en los fucoïdanos extra3idos de *M. pyrifera* resultaron en valores menores al 3 %, siendo 1,8 %, 2,9 y 1,5 % para **EFLO**, **ELAM** y **ECAU** respectivamente. Las mediciones del porcentaje de prote3nas en esporofilos de *U. pinnatifida* resultaron por debajo del l3mite de detecci3n de la t3cnica.

Las determinaciones de los pesos moleculares de los extractos se llevaron a cabo mediante GPC, donde el extracto **EFLO** mostr3 un tope de pico de 718 kDa y un \overline{M}_w (peso molecular promedio pesado 3 masa molar promedio en peso) de 1163,3 kDa. Se observaron valores similares en el caso del extracto **ELAM**, con 864 kDa de tope de pico y 1328,7 kDa de \overline{M}_w (Figuras 3.1. y 3.2.).

3.2.2. Fraccionamiento de los polisac3ridos y an3lisis estructural

Al momento de comenzar con esta tesis doctoral, se desconoc3a la estructura de los fucoïdanos de *M. pyrifera*. Por ello, en primer lugar se procedi3 a fraccionar los distintos extractos de fucoïdanos de *M. pyrifera* y analizar las fracciones obtenidas, con el fin de poder seleccionar aquellas que presentaran buen rendimiento y/o caracter3sticas interesantes. Por otra parte, se decidi3 efectuar el an3lisis estructural de tales polisac3ridos utilizando m3todos qu3micos (an3lisis de metilaci3n, desulfataci3n-metilaci3n y RMN), dado que, conocer detalles estructurales de los fucoïdanos,

3. Fucoïdanos: Extracci3n, purificaci3n y fraccionamiento

permitiría corroborar y/o complementar la informaci3n sobre la estructura químicade los oligosacáridos obtenida a partir de la catálisis enzimática.

Los extractos de fucoïdanos obtenidos de lámina (**ELAM**) y flotadores (**EFLO**) de la especie *M. pyrifera*, fueron fraccionados mediante precipitaci3n con CTAB y posterior redisoluci3n con soluciones de concentraci3n creciente de NaCl, obteniéndose las fracciones F0, F1, F2, F3 y F4 en cada caso (**F0FLO, F1FLO, F2FLO, F3FLO, F4FLO** para los fucoïdanos fraccionados de flotadores y **F0LAM, F1LAM, F2LAM, F3LAM y F4LAM** para los de lámina).

Sobre cada una de las fracciones obtenidas se calcularon los rendimientos y se llevaron a cabo determinaciones de azúcares totales, ácidos ur3nicos, ésteres sulfato, peso molecular y proteínas (Tabla 3.3), como así también, la composici3n de monosacáridos (Tabla 3.4.).

El rendimiento obtenido de F0 para ambos fucoïdanos (**F0FLO y F0LAM**), resultó bajo y se observó la presencia de ácidos ur3nicos y de ésteres sulfato. Las fracciones obtenidas mediante redisoluci3n con NaCl mostraron bajos rendimientos en general hasta 2 M en el caso de fracciones provenientes de flotadores, y hasta 1 M en el caso de fracciones provenientes de lámina. Los mayores rendimientos se obtuvieron al utilizar 3 M de NaCl (29,0 % y 14,3 % para **F4FLO y F4LAM** respectivamente). Los porcentajes de azúcares totales fueron importantes en todas las fracciones, siendo mayoritarias en las fracciones redisueltas con 0,5 M NaCl (**F1FLO y F1LAM**, Tabla 3.3.).

Los ácidos ur3nicos predominaron en las fracciones obtenidas con la menor concentraci3n de NaCl utilizada (**F1FLO y F1LAM**). Al avanzar en el fraccionamiento, el porcentaje de estos compuestos i3nicos decreci3. Sin embargo, el contenido fue alto en **F2FLO y F3FLO**, mientras que en la fracci3n obtenida con 3 M NaCl para **F4FLO** las cantidades de ácidos ur3nicos fueron bajas siendo cercanas al 3 % (Tabla 3.3.). Se observó la misma tendencia en las fracciones provenientes de fucoïdanos de láminas, si bien los porcentajes fueron mucho menores. La fracci3n obtenida con 3 M de NaCl a partir de lámina (**F4LAM**) solo presentó cantidades despreciables de ácidos ur3nicos. Respecto de los ésteres sulfato, tal como era esperable, se observó un incremento de los porcentajes de estos grupos i3nicos al aumentar la fuerza i3nica. Las fracciones

3. Fucoïdanos: Extracci3n, purificaci3n y fraccionamiento

obtenidas con 3 M de NaCl presentaron 36,9 y 41,4 % de SO₃Na para **F4FLO** y **F4LAM**, respectivamente. Las proporciones de prote3na fueron m3s altas en las fracciones provenientes de l3mina, sobre todo en las fracciones obtenidas con 0,5 y 1 M de NaCl, mientras que fueron despreciables en las fracciones altamente sulfatadas.

Tabla 3.3. Rendimiento y an3lisis de las fracciones obtenidas por precipitaci3n con CTAB y redisoluci3n con NaCl, provenientes de los extractos EFLO y ELAM de *M. pyrifera*. Los resultados est3n expresados en % (p/v) de compuesto por 100 g de peso seco.

Fracci3n	Rendimiento (%)	Hid. de carbono (% anh.)	Acidos ur3nicos (%)	Sulfato (% SO ₃ Na)	Prote3nas (%)
F0FLO	1,9	36,9	9,6	s.d.*	2,7
F0LAM	2,8	49,4	9,3	13,7	6,5
F1FLO	3,8	75,5	38,0	10,2	2,1
F1LAM	4,0	71,9	17,9	16,9	5,9
F2FLO	2,9	66,5	22,9	21,5	2,9
F2LAM	2,2	57,6	5,6	24,9	4,2
F3FLO	3,6	60,8	21,1	26,1	1,7
F3LAM	8,9	56,6	4,20	35,3	0,4
F4FLO	29,0	49,2	3,40	36,9	1,8
F4LAM	14,3	53,6	0,10	41,4	0,5

* s.d.: sin determinar.

El an3lisis de az3cares componentes realizado sobre las cinco fracciones de los extractos de flotadores (**EFLO**) y l3minas (**ELAM**) se indica en la Tabla 3.4. Se puede observar que la fucosa fue el monosac3rido predominante en la mayor3a de las fracciones. Las proporciones de este az3car tienden a incrementarse a medida que aumenta la fuerza i3nica, mientras que el porcentaje de los az3cares xilosa y manosa, muestran cierta tendencia a disminuir al avanzar con el fraccionamiento. La glucosa se encontr3 en bajas proporciones.

Las fracciones obtenidas con la m3s alta concentraci3n de la sal de sodio (3 M, fracciones F4), presentaron una composici3n basada casi exclusivamente en fucosa, con bajas proporciones de los restantes monosac3ridos (Tabla 3.4.).

3. Fucoïdanos: Extracci3n, purificaci3n y fraccionamiento

Tabla 3.4. Azúcares componentes (% mol) obtenidos mediante análisis de cromatografía gaseosa de las fracciones de fucoïdanos provenientes de extractos de flotadores (EFLO) y láminas (ELAM) de *M. pyrifera*.

Fracci3n	Ramnosa	Fucosa	Arabinosa	Xilosa	Manosa	Galactosa	Glucosa
F0FLO	2,9	30,5	1,6	30,8	27,7	2,2	4,5
F0LAM	Trazas ¹	65,7	5,7	8,8	6,0	10,3	3,3
F1FLO	Trazas ¹	31,6	1,0	24,6	34,6	4,9	3,2
F1LAM	1,1	64,6	3,3	14,9	6,1	9,1	1,0
F2FLO	1,0	25,6	2,6	13,4	19,7	35,1	2,6
F2LAM	3,0	72,4	5,0	3,4	1,1	14,5	0,6
F3FLO	1,3	55,2	1,6	4,2	8,6	28,0	1,2
F3LAM	1,1	85,2	2,1	2,1	1,7	7,9	Trazas ¹
F4FLO	1,0	87,9	1,3	Trazas ¹	0,6	9,2	Trazas ¹
F4LAM	Trazas ¹	92,4	0,6	Trazas ¹	Trazas ¹	6,5	0,7

¹Proporciones menores a 0,5 mol/100 mol.

Las Figuras 3.1. y 3.2. presentan los perfiles obtenidos mediante GPC para las fracciones redisueltas con NaCl provenientes de flotadores y la fracci3n F4 proveniente del extracto de lámina (**F4LAM**). Este análisis no pudo ser realizado para la fracci3n **F0FLO**, dado su bajo rendimiento. En todos los casos, los pesos moleculares (\overline{M}_w) resultaron altos (> 100 kDa, Figuras 3.1. y 3.2.).

3. Fucoidanos: Extracción, purificación y fraccionamiento

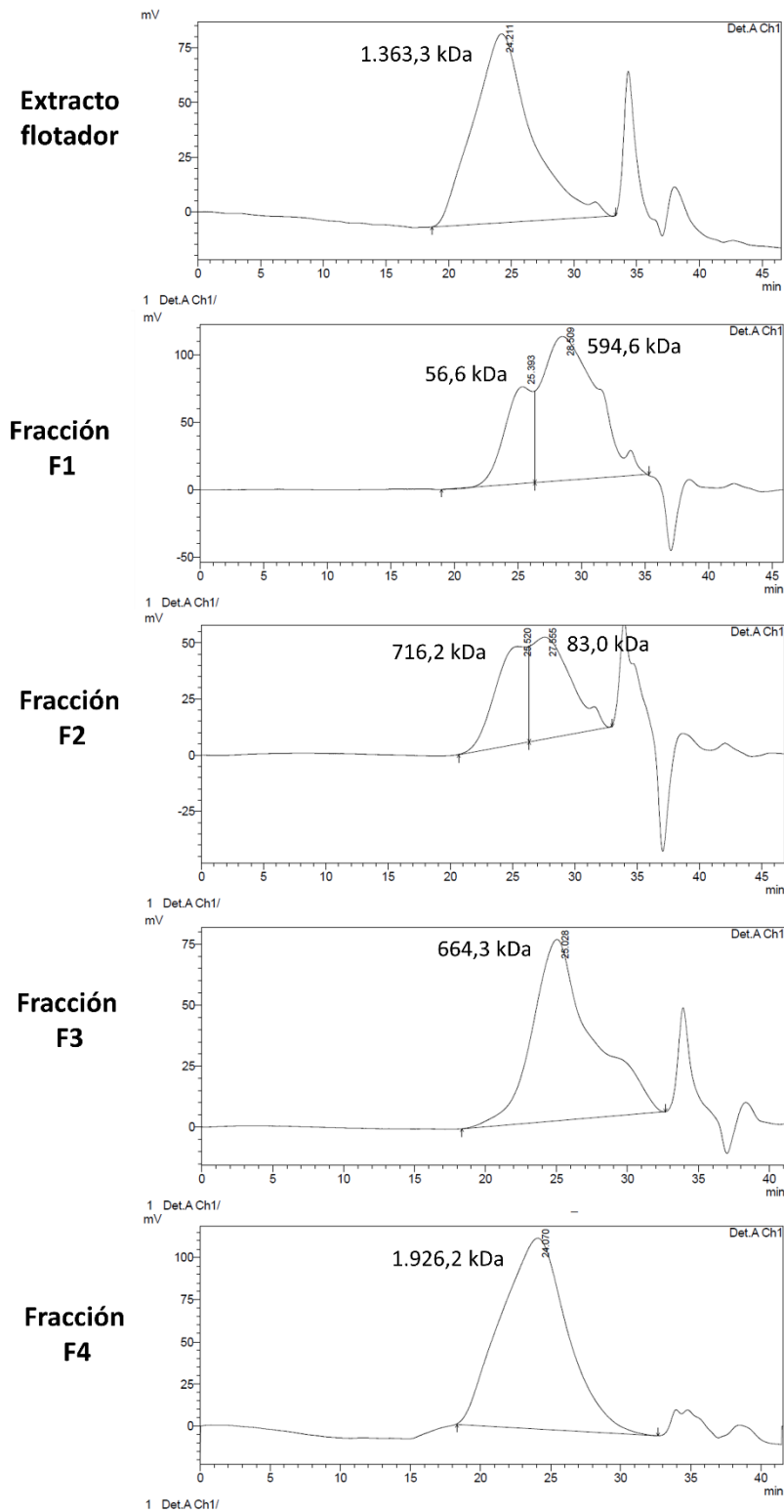


Figura 3.1. Perfiles obtenidos por cromatografía de permeación de geles (GPC) para la determinación del peso molecular del extracto (EFLO) y de fracciones obtenidas de fucoidanos de flotadores (F1FLO, F2FLO, F3FLO y F4FLO) de *M. pyrifera*. Se indican los valores de \overline{M}_w (peso molecular promedio pesado) en cada caso.

3. Fucoïdanos: Extracci3n, purificaci3n y fraccionamiento

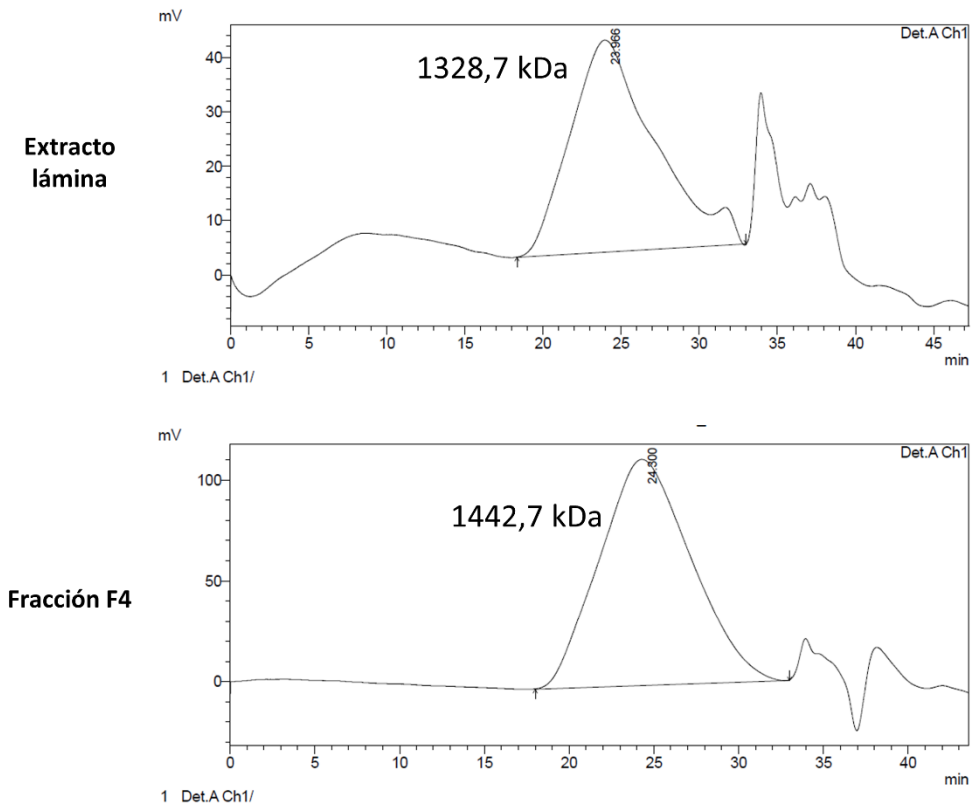


Figura 3.2. Perfiles obtenidos por cromatografía de permeaci3n de geles (GPC) para la determinaci3n del peso molecular del extracto (ELAM) y de la fracci3n F4LAM obtenida de fucoïdanos de láminas de *M. pyrifera*. Se indican los valores de \overline{M}_w (peso molecular promedio pesado) en cada caso.

3.2.2.1. Análisis por metilaci3n

Se seleccionaron las fracciones obtenidas con 3M NaCl provenientes de flotadores y láminas de *M. pyrifera* (**F4FLO y F4LAM**), dado que presentaban elevados rendimientos y características interesantes en cuanto a su composici3n, tal como el contenido de ésteres sulfato. Tales fracciones, estaban compuestas por galactofucanos con un alto grado de pureza (proporciones de fucosa cercanas a 90 %) (Tabla 3.4.).

En primer lugar, se llevó a cabo el procedimiento de metilaci3n para conocer los tipos de uniones presentes entre los residuos del polisacárido. Dada la dificultad conocida para lograr la metilaci3n de los fucoïdanos en general, y aprovechando la experiencia en la metilaci3n de los galactofucanos de *A. utricularis* y *S. lomentaria* obtenida en el grupo de trabajo de la Dra. Ponce, se optó por el método que utiliza varios agregados de reactivo metilante y calentamiento a 50 °C (Ponce *et al.*, 2003; Ponce *et al.*, 2019). El polisacárido se metiló con ICH_3 en presencia de DMSO, luego se hidrolizó y

3. *Fucoïdanos: Extracci3n, purificaci3n y fraccionamiento*

la mezcla de monosacáridos parcialmente metilados se derivatizó y se analizó por CGL y CGL-MS.

Los resultados obtenidos en las metilaciones de **F4FLO** y **F4LAM** se presentan en la Tabla 3.5. El patr3n de metilaci3n de ambas fracciones fue semejante, y bastante heterogéneo a nivel de los residuos metilados. Se observaron derivados metilados de fucosa y galactosa, y s3lo trazas de derivados de otros monosacáridos, tal como era esperado de acuerdo con la composici3n de los extractos. Las fucosas aparecieron principalmente metiladas en posici3n 2, y se observaron altos porcentajes de 2,4-di-*O*-metilfucosa. Adem3s, se encontraron cantidades importantes de 2,3-di-*O*- y 4-*O*-metilfucosa, y menores de fucosas metiladas en *O*-3. Por otro lado, la fracci3n **F4FLO**, present3 menores porcentajes de unidades de 2,3,4-tri-*O*-metilfucosa (1,9 %) y cantidades importantes de fucosas no metiladas (17,1 %). Respecto de las galactosas para ambas fracciones, se observ3 una mayor variedad de unidades metiladas. La fracci3n proveniente de flotadores mostr3 mayoritariamente 2,3,4-, 2,6- y 2,4-di-*O*-metilgalactosa, y tambi3n present3 unidades metiladas en posici3n 2-, mientras que en el an3lisis de aquella proveniente de lámina tambi3n se observaron cantidades trazas de otras unidades metiladas. En esta última fracci3n tambi3n se detectaron pequeños porcentajes de xilosa no metiladas.

3. Fucoïdanos: Extracci3n, purificaci3n y fraccionamiento

Tabla 3.5. Composici3n de azúcares de las fracciones **F4FLO** y **F4LAM** metiladas^b.

Azúcar metilado en	F4FLO ^a	F4LAM ^a
Fucosa		
2,3,4	1,9	6,1
2,3	5,0	6,8
2,4	22,0	15,8
3,4	-	2,9
2	32,9	47,5
3	2,1	1,6
4	7,5	4,1
-	17,1	8,8
Galactosa		
2,3,4,6	0,5	-
2,3,4	3,2	0,8
2,3,6	-	Tr. ^c
2,3	-	1,0
2,4	2,0	1,2
2,6	2,8	Tr. ^c
3,6	-	Tr. ^c
3,4	-	Tr. ^c
2	1,8	1,1
3	0,6	Tr. ^c
-	0,6	Tr. ^c
Xilosa		
-	-	0,8
Manosa		
-	-	0,7
Glucosa		
2,3,6	-	-
-	-	0,8

^a Moles por cada 100 moles de azúcar. ^b Derivatizados como alditoles acetilados.

Tr^c = trazas (proporciones < 0,5).

3. Fucoïdanos: Extracci3n, purificaci3n y fraccionamiento

3.2.2.2. Desulfataci3n y metilaci3n de los polisac3ridos desulfatados

Ya que ambas fracciones presentaban altos porcentajes de 3steres sulfatos (Tabla 3.3.), a los fines de distinguir las posiciones ocupadas por dichos grupos i3nicos, de aquellas involucradas en enlaces glicos3dicos es necesario aplicar alg3n m3todo de desulfataci3n. Se decidi3 utilizar el m3todo de Navarro y colaboradores (Navarro *et al.*, 2007), el cual realiza un an3lisis de desulfataci3n-metilaci3n *one-pot* con ayuda de microondas. Tras la metilaci3n, en este caso tambi3n con ICH_3 , se procedi3 a hidrolizar y preparar los alditoles peracetilados que fueron analizados por CGL-MS. Las diferencias en los residuos sustituidos encontrados tras la desulfataci3n-metilaci3n, comparada con las proporciones de los derivados de las fracciones metiladas originales permitir3an la determinaci3n inequ3voca de las posiciones de los grupos sulfato en el polisac3rido original, en el caso en el que la desulfataci3n haya sido completa.

El rendimiento del producto desulfatado de **F4FLO** result3 muy bajo. En el an3lisis de dicha fracci3n, la suma de residuos metilados de fucosa fue muy inferior a las proporciones de fucosa de la fracci3n original, lo cual, sumado al bajo rendimiento obtenido tras la desulfataci3n, fue un indicativo de que ocurri3 degradaci3n del polisac3rido. En consecuencia, los porcentajes de galactosa aparecieron sobreestimados. Otra evidencia de la degradaci3n del polisac3rido es el alto porcentaje de unidades de manosa metiladas y no metiladas. Desafortunadamente, tales resultados no permitieron concluir acerca de las uniones de los fucoïdanos presentes en **F4FLO**.

En el caso de la fracci3n proveniente de l3mina (**F4LAM**), los resultados demostraron que la degradaci3n en el proceso de desulfataci3n fue menor. Se observ3 un incremento de la de 2,4-di-*O*-metilfucosa a expensas de la 2-*O*-metilfucosa. Tambi3n se observ3 un aumento de los residuos de fucosa terminales, de la 3,4-di-*O*-metilfucosa y de la fucosa metilada en *O*-4. Fue evidente adem3s el aumento de la 3-*O*-metilfucosa y la disminuci3n de las unidades de fucosa sin metilar. La fucosa dimetilada en posiciones 2- y 3- permaneci3 pr3cticamente constante. Respecto de la galactosa, si bien las proporciones eran pequeñas, se evidenci3 un incremento de las proporciones de 2,3,4,6-tetra-, 2,3,4-tri-*O*-metilgalactosa y galactosa metilada en *O*-6, mientras que decrec3an la 2,6-di y la 2-mono-*O*-metilgalactosa. Tales resultados sugieren que el

3. Fucoïdanos: Extracci3n, purificaci3n y fraccionamiento

fucoïdano presente en las l3minas de *M. pyrifera*, contiene principalmente fucosas enlazadas por la posici3n -3 y sulfatadas en la posici3n C-4. La presencia de unidades de 2-*O*-metilfucosa sugiere la presencia de cadenas laterales en el polisac3rido. Adem3s, se encontraron residuos de fucosa terminales en el fucoïdano.

3.2.2.3. Espectroscopía de RMN

Dado los resultados obtenidos tras desulfatar y metilar se decidi3 realizar el espectro de RMN solamente de la fracci3n **F4LAM**. Como es usual en los fucoïdanos, el espectro de dicha fracci3n present3 gran complejidad, por lo cual resulta difícil interpretarlo completamente, sin embargo, la regi3n de las señaes anom3ricas puede aportar los datos m3s importantes. Se realiz3 RMN bidimensional (HSQC), el cual es un experimento de detecci3n de protones que muestra los carbonos que est3n directamente conectados (un enlace). En la regi3n anom3rica se observaron señaes que pueden ser asignadas a residuos de α -fucosas (panel superior izquierdo, Figura 3.3.). La señaal mayoritaria aparece a 99,8/5,41 ppm sugiriendo que el polisac3rido consiste principalmente de residuos de fucopiranosas con enlaces (1 \rightarrow 3)- dentro de un sistema alternante 3-/4-, y la señaal a 99,0/5,43 ppm correspondería a unidades sulfatadas en C2 y enlazadas en posici3n 4, dentro del mismo sistema alternante (Bilan *et al.*, 2004; Ponce *et al.*, 2019). Adem3s, se observaron señaes cercanas a 103 ppm (103,4/4,78 y 103,6/4,60 ppm) las cuales pueden ser asignadas a unidades de β -galactosa (Thinh *et al.*, 2013). En la regi3n del C-6 (correspondiente al CH₃ de la fucosa) se observ3 una señaal a 16,2/1,25 ppm y otra a 16,8/1,33 ppm, esta última coincidente con los desplazamientos del residuo \rightarrow 3)- α -L-Fucp-2,4-SO₃⁻(1 \rightarrow). La señaal a 61,8/3,80 ppm corresponde a unidades de galactopiranosas con el grupo CH₂OH no sustituido. Por otro lado, las señaes que se encuentran entre 66 y 81 ppm indican los correspondientes protones unidos a los carbonos de los anillos (H-2, H-3, H-4 y H-5). No se encontraron señaes de grupos *O*-acetilos.

3. Fucoïdanos: Extracci3n, purificaci3n y fraccionamiento

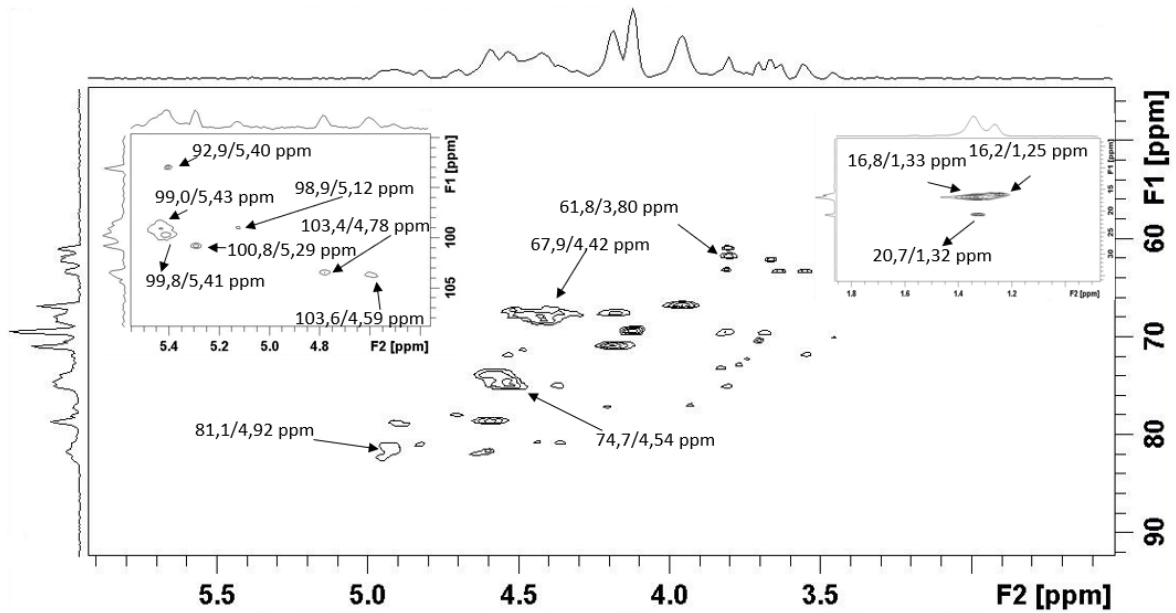


Figura 3.3. Espectro de RMN (HSQC) de la fracci3n de fucoïdanos F4LAM de *M. pyrifera*.

3.3. DISCUSI3N

En Patagonia, las especies de *M. pyrifera* y *U. pinnatifida* forman grandes praderas y bosques submareales que alcanzan altas biomasa, lo cual las convierte en un recurso aprovechable para la extracci3n de fucoïdanos (Luizzi *et al.*, 2011; Balquita *et al.*, 2022; Ponce *et al.*, 2022). En este contexto, los fucoïdanos de ambas especies fueron extraïdos, purificados y caracterizados, a los efectos de ser utilizados como sustratos en las determinaciones de actividad fucoïdanasa de las enzimas putativas expresadas en *E. coli*.

Con la finalidad de obtener un polisac1rido de alta pureza, se aplic3 una metodologïa de extracci3n constituïda por dos etapas. La primera etapa consisti3 en un pretratamiento de los fucoïdanos, a los que posteriormente se les aplic3 una extracci3n en medio 1cido. El pretratamiento consisti3 primeramente en una extracci3n con la mezcla de solventes metanol/cloroformo/agua, el cual ha sido ampliamente utilizado para la extracci3n de polisac1ridos de distintas especies de macroalgas (Al-Amoudi *et al.*, 2009). Dicha mezcla permite eliminar fenoles, lïpidos, pigmentos, proteïnas y compuestos de bajo peso molecular (Ale y Meyer, 2013; Dobrincic *et al.*, 2020). El pretratamiento finaliza con la extracci3n con etanol 80 % (v/v), el cual contribuye a la remoci3n de otros compuestos de bajo peso molecular, como por ejemplo el manitol. El

3. Fucoïdanos: Extracci3n, purificaci3n y fraccionamiento

siguiente paso consisti3 en la extracci3n con HCl (pH 2), el cual se ha demostrado que en algunos casos puede maximizar la extracci3n de fucoïdanos y minimizar la co-extracci3n de proteïnas, sin evidenciar signos de degradaci3n (Ponce *et al.*, 2003). Esto pudo haber ocurrido en las extracciones de fucoïdanos de ambas especies, donde las determinaciones del contenido de proteïnas arrojaron valores m1s bien bajos, 3 bien, por debajo del lïmite de detecci3n de la t3cnica. El uso de una baja concentraci3n del 1cido (0,01 M) evita la degradaci3n del polisac1rido, efecto que se ha observado con concentraciones de HCl superiores, produciendo fucoïdanos con bajas proporciones de fucosa (Ale y Meyer, 2013).

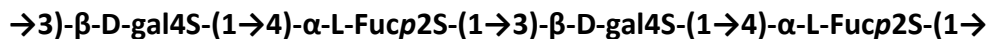
La metodologïa de extracci3n utilizada permiti3 obtener fucoïdanos con alto contenido de fucosa (entre 48 y 86 %) y de 3steres sulfato (entre 16 y 28 %), siendo estos 3ltimos de gran relevancia dado que la p3rdida de los mismos disminuye la actividad biol3gica de los fucoïdanos (Ale y Meyer, 2013; Kusaykin, 2016). El alto contenido de fucosa es concordante con reportes de trabajos previos sobre otras especies de algas pardas, en donde la fucosa es el principal monosac1rido (Bilan *et al.*, 2002; Bilan *et al.*, 2010).

Se ha demostrado la presencia de tres tipos principales de fucoïdanos, cuya estructura quïmica ha sido dilucidada. El primero de ellos se denomina uronofucoïdanos, tambi3n llamados GA-fucoïdanos 3 U-fucoïdanos (Wang *et al.*, 2020). Los mismos est1n compuestos por una mezcla heterog3nea de monosac1ridos y un porcentaje de 1cidos ur3nicos mayor al de grupos sulfato. En segundo lugar, se encuentran los galactofucanos (tambi3n llamados G-fucoïdanos), donde predomina la fucosa acompa1ada por galactosa y con altos porcentajes de grupos 3steres sulfato y bajos de 1cidos ur3nicos (Duarte *et al.*, 2001; Ponce *et al.*, 2003; Ponce *et al.*, 2019). El tercer tipo corresponde a los F-fucoïdanos, constituidos exclusivamente de fucosa sulfatada (Wang *et al.*, 2020). Dentro de las algas pertenecientes al orden Laminariales se han encontrado, en muchos casos, galactofucanos usualmente con bajas proporciones de xilosa o manosa. La familia Alariaceae (a la que pertenece la especie *U. pinnatifida*) produce principalmente galactofucanos (Usoltseva *et al.*, 2016). Sin embargo, algunas especies pertenecientes al mismo orden mostraron estar compuestas por fucoïdanos casi puros (fucanos), tal como es el caso de *Laminaria angustata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina cichorioides* y

3. Fucoïdanos: Extracci3n, purificaci3n y fraccionamiento

Saccharina jap3nica (Ponce y Stortz, 2020). En el caso de *M. pyrifera*, ya haba sido informada la presencia de fucoïdanos casi puros (Schweiger, 1962), como as3 tambi3n de galactofucanos (Fitton *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015).

El fucoïdano de *U. pinnatifida* analizado en esta tesis doctoral, present3 caracter3sticas de un galactofucano sulfatado (Zvyagintseva *et al.*, 2021), es decir, una composici3n basada principalmente en los az3cares fucosa y galactosa, y a su vez, con presencia de sustituciones de grupos sulfatos. Estos resultados se corresponden con estudios previos realizados por otros investigadores con biomasa de dicha especie proveniente de otras regiones geogr3ficas (Hemmingson *et al.*, 2006; Synytsya *et al.*, 2010), presentando un esqueleto de fucosa con uniones α -(1 \rightarrow 3)-, con abundancia de sustituciones de sulfato en posiciones 2 y 4, y algunas ramificaciones de residuos de galactosa enlazados β -(1 \rightarrow 4)- (Cao *et al.*, 2018). La Figura 3.4. presenta la estructura construida a partir de la informaci3n descripta por Koh y colaboradores (Koh *et al.*, 2019), para los fucoïdanos de *U. pinnatifida* de Nueva Zelanda. Se han descripto numerosas bioactividades asociadas a dicha estructura, entre ellas: actividad anticancer3gena, antioxidante, antimicrobial y anticoagulante (Wang *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2018).



2S = SO₃⁻ en posici3n 2

4S = SO₃⁻ en posici3n 4

Figura 3.4. Estructura del fucoïdano de *U. pinnatifida*. El fucoïdano est3 constituido por un esqueleto de fucosa-galactosa, con sustituciones de grupos sulfato en las posiciones C2 y C4. Estructura construida a partir de la informaci3n publicada por Koh *et al.*, 2019.

Las caracter3sticas estructurales de los fucoïdanos de *U. pinnatifida* que han sido relacionadas con la actividad anticancer3gena son el contenido de sulfato y el tipo de enlace α -(1 \rightarrow 3)- del esqueleto del polisac3rido, mientras que los principales factores que afectan la actividad antioxidante, antiviral y anticoagulante ser3an el contenido de sulfato y el peso molecular del polisac3rido (Zhao *et al.*, 2018), lo cual puede deberse a su similitud estructural con la heparina (Wang *et al.*, 2020). Con respecto a otras bioactividades, la actividad antimicrobiana se ha informado que se debe a la cantidad de sulfato y de 3cido glucur3nico en los productos de despolimerizaci3n del fucoïdano. Por otro lado, la actividad antiinflamatoria est3 fuertemente influenciada por el peso

3. Fucoïdanos: Extracci3n, purificaci3n y fraccionamiento

molecular de los fucoïdanos, por ejemplo, fucoïdanos de alto peso molecular extraïdos a partir de *Cladsiphon okamuranus* incrementaron el nivel de producci3n de c3lulas T (Shimuzi *et al.*, 2005).

Los fucoïdanos de la especie *M. pyrifera* de las costas patag3nicas de la Argentina, a3n no habían sido caracterizados estructuralmente al comienzo de esta tesis. En este contexto, resultaba de inter3s la extracci3n de los fucoïdanos diferenciando las distintas partes del talo. El an3lisis comparativo de los tres extractos obtenidos del alga *M. pyrifera* indic3 que no existen diferencias significativas con respecto en la composici3n de az3cares, como as3 tampoco en la concentraci3n de fucosa, contenido de 3steres sulfato y de 3cidos ur3nicos. Dichos fucoïdanos mostraron que est3n constituidos principalmente por fucosa (80 - 86 %) e importantes porcentajes de grupos sulfato (23 – 28 %). En extractos de fucoïdanos de esta especie, en la que se han aplicado otras metodolog3as de extracci3n y purificaci3n, la fucosa fue el monosac3rido predominante seguido por galactosa, aunque tambi3n ha sido informada la presencia de xilosa, glucosa y manosa, con altos contenidos de sulfatos y menores de 3cidos ur3nicos (Zhang *et al.*, 2015; Lorbeer *et al.*, 2017; Sichert *et al.*, 2021). Sin embargo, en dichos trabajos los porcentajes de fucosa obtenidos fueron menores al 30 %. Esto indicaría que el m3todo de extracci3n aplicado en este trabajo de tesis resulta adecuado para la obtenci3n de fucoïdanos sulfatados ricos fucosa. Cabe destacar que la metodolog3a de extracci3n aplicada, como as3 tambi3n el tiempo y la temperatura, afecta directamente al rendimiento y a la composici3n estructural de los fucoïdanos obtenidos (Morya *et al.*, 2010).

Los altos pesos moleculares obtenidos de los extractos de flotadores (**EFLO**) y l3minas (**ELAM**), indican tambi3n que el tratamiento 3cido de extracci3n a altas temperaturas, no parece haber producido la escisi3n de las cadenas de fucoïdanos. Los perfiles obtenidos mediante GPC señalaron una clara polidispersi3n, con valores de \overline{M}_w muy similares entre ellos. Valores similares han sido obtenidos tambi3n en los extractos de fucoïdanos de las especies *U. pinnatifida*, *Fucus serratus*, *Fucus vesiculosus* y *Ascophyllum nodosum* (Synytsya *et al.*, 2010; Fletcher *et al.*, 2017; Ptak *et al.*, 2021).

Dado que en los extractos obtenidos se encuentra presente una mezcla compleja de cadenas de fucoïdanos con diferencias estructurales, resulta de inter3s contar con

3. Fucoïdanos: Extracci3n, purificaci3n y fraccionamiento

una muestra lo m3s homog3nea posible, que puede obtenerse a partir del fraccionamiento. El m3todo de fraccionamiento fue aplicado para los extractos **ELAM** y **EFLO**, el cual result3 exitoso. Las fracciones solubles ante el agregado de CTAB (**F0FLO** y **F0LAM**), mostraron sorprendentemente la presencia de fucosa y sulfatos, indicando que algunas cadenas de fucoïdano permanecieron solubles. Adem3s, los bajos porcentajes de glucosa encontrados en estas fracciones revelan la ausencia de laminaranos, el producto de reserva de las algas pardas. Las fracciones obtenidas con bajas concentraciones de NaCl dieron lugar a fracciones muy heterog3neas en cuanto a la composici3n de monosac3ridos, mientras que la concentraci3n 3 M de dicha sal permiti3 obtener fucoïdanos pr3cticamente puros y altamente sulfatados. Estos resultados son concordantes con la composici3n qu3mica de las fracciones obtenidas a partir de fucoïdanos de *Macrocystis integrifolia* (Soto-V3squez *et al.*, 2023). Los perfiles de las muestras al ser analizadas mediante GPC, permitieron observar que al aumentar la fuerza i3nica en el fraccionamiento, las fracciones incrementaron su pureza hasta llegar a **F4FLO** y **F4LAM**, las cuales se tratan de muestras polidispersas respecto del peso molecular. Los valores de \overline{M}_w resultaron ser altos, resultado que no se ve reflejado en los an3lisis de RMN, con lo cual cabe la posibilidad de que las cadenas polisac3ridicas se encuentren agregadas sobreestim3ndose dicho valor.

En las fracciones derivadas de **ELAM** no se evidenci3 la presencia de uronofucoïdanos, mientras que en la fracci3n **F1FLO** si se encontraron presentes. Con la m3xima concentraci3n de sal de sodio utilizada (**F4LAM** y **F4FLO**), se obtuvieron fucoïdanos con alto contenido de 3steres sulfato y muy bajo contenido de 3cidos ur3nicos. Estas 3ltimas fueron sometidas a diversos an3lisis con el fin de dilucidar su estructura. En cuanto a las metilaciones, los bajos rendimientos obtenidos tras la desulfataci3n de **F4FLO**, indicaron que los fucoïdanos hab3an sido degradados y evidentemente hab3an atravesado la membrana de di3lisis. Otro intento para preparar la sal de piridinio de los fucoïdanos consisti3 en pasar una soluci3n del polisac3rido a trav3s de una columna rellena con resina cati3nica, recibiendo la soluci3n que elu3a sobre una mezcla de piridina/agua. Este fue nuevamente un intento infructuoso ya que tambi3n se observ3 importante p3rdida de masa durante la di3lisis, dejando en

3. Fucoïdanos: Extracci3n, purificaci3n y fraccionamiento

evidencia que por alg3n motivo la sal de piridinio del polisac3rido se degrada en el pH 3 de trabajo.

Si bien la fracci3n **F4FLO** no permiti3 obtener resultados concluyentes, en el caso de la fracci3n **F4LAM** los resultados sugirieron que el fucoïdano presente en las l3minas de *M. pyrifera* contiene principalmente α -L-fucosas con enlaces α -(1 \rightarrow 3)- y sulfato en la posici3n 4. El tipo de enlace glicosídico fue corroborado con los resultados de la espectroscopía de RMN bidimensional, la cual señal3 enlaces en posici3n 3, con unidades disulfatadas en C-2 y C-4, como así tambi3n fucosas enlazadas en posici3n -4, dentro de un bloque conteniendo díadas con enlaces alternantes α -(1 \rightarrow 3)- y α -(1 \rightarrow 4)-. Se ha publicado un trabajo sobre la estructura de los fucoïdanos de *M. pyrifera*, sin embargo, dicho trabajo plantea una estructura incorrecta para los fucoïdanos, producto de las asignaciones err3neas realizadas en los an3lisis de RMN (Zou *et al.*, 2021), donde sugieren la presencia de enlaces β -L-fucosa en la cadena central de fucoïdano. Por otro lado, los autores no aclaran sobre que tejido han realizado dicha extracci3n ni tampoco el origen geogr3fico de las muestras utilizadas para la extracci3n de fucoïdano.

Sistemas similares al encontrado en este trabajo para *M. pyrifera* han sido publicados para otras especies de Laminariales, tal es el caso de *Lessonia vadosa* (Chandia *et al.*, 2008), *Saccharina latissima* (Bilan *et al.*, 2010) y en *Laminaria jap3nica* (Zayed *et al.*, 2020). Esta 3ltima especie mostr3 que tales residuos estaban sulfatados en C-4 y/o en C-2 y ramificadas en C-2 por unidades de α -L-Fucp. El fucoïdano de la especie *Chorda filum* contiene una cadena principal de poli- α -(1 \rightarrow 3)-fucopiranosas con alto grado de ramificaci3n, principalmente de unidades α -(1 \rightarrow 2)-, sulfatadas en posiciones O-4 (principalmente) y O-2 (Chizhov *et al.*, 1999). Se ha demostrado que otras algas pardas tambi3n poseen principalmente residuos de fucosa enlazados en -3, tal es el caso de *Cladosiphon okamunarus* (Hidari *et al.*, 2008) y *Chordaria glagelliformis* (Bilan *et al.*, 2008). Otras especies poseen enlaces en α -(1 \rightarrow 3)- y α -(1 \rightarrow 4)- no alternantes, en los cuales tienden a predominar los enlaces en -3 (Ponce *et al.*, 2003; Adhikari *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2011).

4. IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS A ENZIMAS FUCOIDANASAS EN UN AMBIENTE SUBPOLAR



4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

4.1. INTRODUCCIÓN

Los ambientes extremos constituyen habitats ideales para la prospección biotecnológica, en la que se incluye la identificación de enzimas novedosas que resulten activas bajo dichas condiciones (Hamid *et al.*, 2022). Aproximadamente el 75 % de la biosfera de la Tierra está expuesta a bajas temperaturas ($< 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Huston, 2008), constituyendo un enorme reservorio para la bioprospección de enzimas de interés adaptadas al frío (Van den Burg, 2003). Particularmente, las enzimas provenientes de organismos adaptados a ambientes fríos (psicrófilos), presentan importantes ventajas para su aplicación a nivel industrial. Entre ellas, se incluyen reacciones enzimáticas que pueden ser llevadas a cabo a temperatura ambiente y pueden ser inactivadas mediante un aumento moderado de temperatura (Vester *et al.*, 2014). Estas características implican menores costos en su producción industrial al no ser necesario invertir en energía para poner en marcha un proceso dependiente de la temperatura, y por otra parte, existe un menor riesgo de contaminación. En este contexto, los ambientes fríos resultan de particular interés para la bioprospección de organismos novedosos, como así también de enzimas con potenciales aplicaciones biotecnológicas (Ferres *et al.*, 2015).

La identificación de biocatalizadores con características novedosas a partir de microorganismos previamente cultivados en el laboratorio es una estrategia comúnmente utilizada. Dada la dificultad para aislar la gran mayoría de microorganismos marinos, en particular aquellos de ciertos grupos taxonómicos, los enfoques metagenómicos permiten la bioprospección de enzimas de interés a partir de comunidades microbianas, sin las limitaciones impuestas por la dificultad para cultivar los mismos (Lorenz y Eck, 2005; Prayogo *et al.*, 2020). Este enfoque presenta, sin embargo, una limitación importante, relacionada con la limitada información que existe sobre la diversidad de secuencias codificantes de ciertas enzimas (Wani *et al.*, 2022) como por ejemplo fucoidasas, lo cual resulta esencial para la identificación de secuencias en *sets* de datos metagenómicos. La búsqueda de secuencias de interés en dichos *sets* de datos requiere generar modelos estadísticos a partir de secuencias conocidas, generalmente de enzimas caracterizadas provenientes de organismos aislados. Dada las limitaciones previamente mencionadas, las mismas no reflejan la

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

diversidad real de secuencias de las enzimas de interés. En consecuencia, existirá una limitación en la capacidad de estos modelos para identificar las secuencias de interés, en particular, aquellas novedosas.

En este capítulo se describen los resultados de la identificación de secuencias homólogas a enzimas fucoidasas en un *set* de datos metagenómico generado a partir de la comunidad microbiana de los sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina. Además, se describe la caracterización *in silico* de dichas secuencias y la selección de aquellas más novedosas para su posterior expresión y caracterización enzimática. A su vez, se describe el análisis de los fragmentos metagenómicos que contienen dichas secuencias, sus posibles hospedadores y el potencial metabólico que podrían presentar dichos organismos.

4.2. RESULTADOS

La identificación de secuencias homólogas a las enzimas fucoidasas pertenecientes a ambas familias CAZy (GH107 y GH168) en el *set* de datos metagenómico de sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia, se realizó por medio de la construcción de HMMs específicos para dichas familias, como así también mediante las herramientas de anotación dbCAN2 y CUPP. El uso de múltiples herramientas permite evaluar el grado de concordancia entre las mismas, lo cual incrementa la confianza en la anotación específica. Los perfiles fueron generados a partir de alineamientos múltiples de las secuencias de referencia incluidas en cada familia en la base de datos CAZy, y utilizados para la identificación de las secuencias de interés. Dado que el número de secuencias de referencia y el número de familias GH que incluyen fucoidasas se incrementó desde el inicio del trabajo de tesis, periódicamente se reevaluó la identificación de las secuencias de fucoidasas putativas generando nuevos modelos y reanalizando la biblioteca metagenómica. Los resultados que se muestran en este capítulo corresponden al estado de la base de datos CAZy con respecto a estas dos familias en mayo de 2022, donde se incluían 31 y 42 secuencias para las familias GH107 y GH168 respectivamente. Al momento de presentación de la tesis doctoral, la base de datos CAZy incluye 36 secuencias para la familia GH107 y 52 secuencias para la familia GH168.

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

4.2.1. Familia GH107

4.2.1.1. Identificación de secuencias homólogas a miembros de la familia GH107

Para la identificación de secuencias homólogas se utilizó el HMM construido a partir del módulo catalítico (también denominado D1) de 31 secuencias de la familia GH107. Se identificaron 7 secuencias homólogas a enzimas de la familia GH107 en el set de datos metagenómico de sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia (Tabla 4.1.). Fueron consideradas aquellas secuencias que presentaron valores de significancia estadística ($E\text{-value}$) $\leq 10^{-5}$. Como segundo y tercer método de identificación se utilizaron las herramientas dbCAN2 y CUPP (sección 2.1.3.). En ambas búsquedas se identificaron las siete secuencias anotadas anteriormente.

Tabla 4.1. Secuencias homólogas a fucoidasas de la familia GH107 (CAZy) identificadas en el set de datos metagenómico OR07. En rojo se indican las secuencias parciales; en negro las secuencias completas.

Nombre de la secuencia	Longitud de la secuencia (aá)	Nombre del scaffold	Longitud del scaffold (pb)	Coordenadas de la secuencia
27010	137	scaffold-1575_S2	11.409	(-)2-412
140846	400	scaffold-10782_S2	35.308	(+) 33815-35017
289547	709	scaffold-70692_S1	2.456	(-) 1-2127
163424	650	scaffold-9822_S1	5.199	(+) 47-1999
277285	380	scaffold-322417_S2	24.006	(+) 10660-11802
113643	394	scaffold-6734_S1	34.700	(-) 30305-31489
57307	508	scaffold-3923_S1	14.646	(+) 9537-11063

De las siete secuencias identificadas, cinco se encontraban completas (nombre de las secuencias en color negro, Tabla 4.1.), en el sentido de que no estaban truncadas en uno de los extremos del scaffold. Las secuencias 27010 y 289547 se encontraban truncas en el C-terminal. Las secuencias completas presentaron longitudes entre 380 y 650 aminoácidos, lo cual sugiere que algunas de las secuencias contendrían dominios adicionales, además del posible módulo catalítico GH107. De forma comparativa, las secuencias contenidas en la familia GH107 presentaron un tamaño entre 400 y 1320 aminoácidos.

4.2.1.2. Identificación de péptido señal y de dominios en secuencias GH107 putativas

El péptido señal (S, en Figura 4.1.) fue identificado a fin de conocer si la proteína sería exportada. Esta información es de interés además para su posterior remoción en

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidanasas

las secuencias que sean seleccionadas para su expresión heteróloga. El mismo fue identificado en seis secuencias putativas de fucoidanasas y presentaron longitudes entre 17 y 45 aminoácidos. En la secuencia 27010 no se pudo detectar el péptido señal posiblemente se deba a que se trata de una secuencia muy corta.

La identificación y anotación de dominios en las secuencias putativas identificadas se realizó en primer lugar utilizando la herramienta InterProScan (www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/). Los mismos se indican en la Figura 4.1.A. Dado que no existen dominios específicos para las enzimas fucoidanasas de la familia GH107, los dominios identificados fueron generales para enzimas glicósido hidrolasas. El módulo GH (en amarillo, Figura 4.1.A), identificado en todas las secuencias a excepción de 57307, representaría el módulo putativo responsable de la actividad fucoidanasa.

El módulo GH29 (acceso a InterPro: IPR000933) estuvo presente en una de las secuencias (57307), el cual se encuentra en enzimas de la familia GH29. Esta familia incluye enzimas α -L-fucosidasas, que actúan en los enlaces terminales de los fucoidanos mediante un mecanismo de exo-hidrólisis. Por lo tanto, es probable que la secuencia 57307 corresponda a una enzima α -L-fucosidasa, tratándose de una identificación inespecífica. Sin embargo, será considerada en posteriores análisis dada su similitud en el mecanismo de acción con respecto a las enzimas fucoidanasas de la familia GH107.

El dominio *SLA1 homology domain 1* (SHD1, IPR007131) fue identificado en las secuencias 113643 y 140846 (Figura 4.1.A). De acuerdo a la información provista en InterProScan, dicho módulo suele encontrarse en organismos eucariotas como así también en bacterias del superphylum Planctomycetota-Verrucomicrobiota-Chlamydiota (PVC). En ambas secuencias, el módulo SHD1 se encontró próximo al extremo N-terminal. En la secuencia 163424 se identificó el módulo PSS (IPR026444), el cual corresponde a un sistema de secreción C-terminal, mientras que en las secuencias 277285 y 289574 no se identificaron dominios adicionales al utilizar herramientas basadas en la estructura primaria de la enzima putativa (Figura 4.1.A).

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidanasas

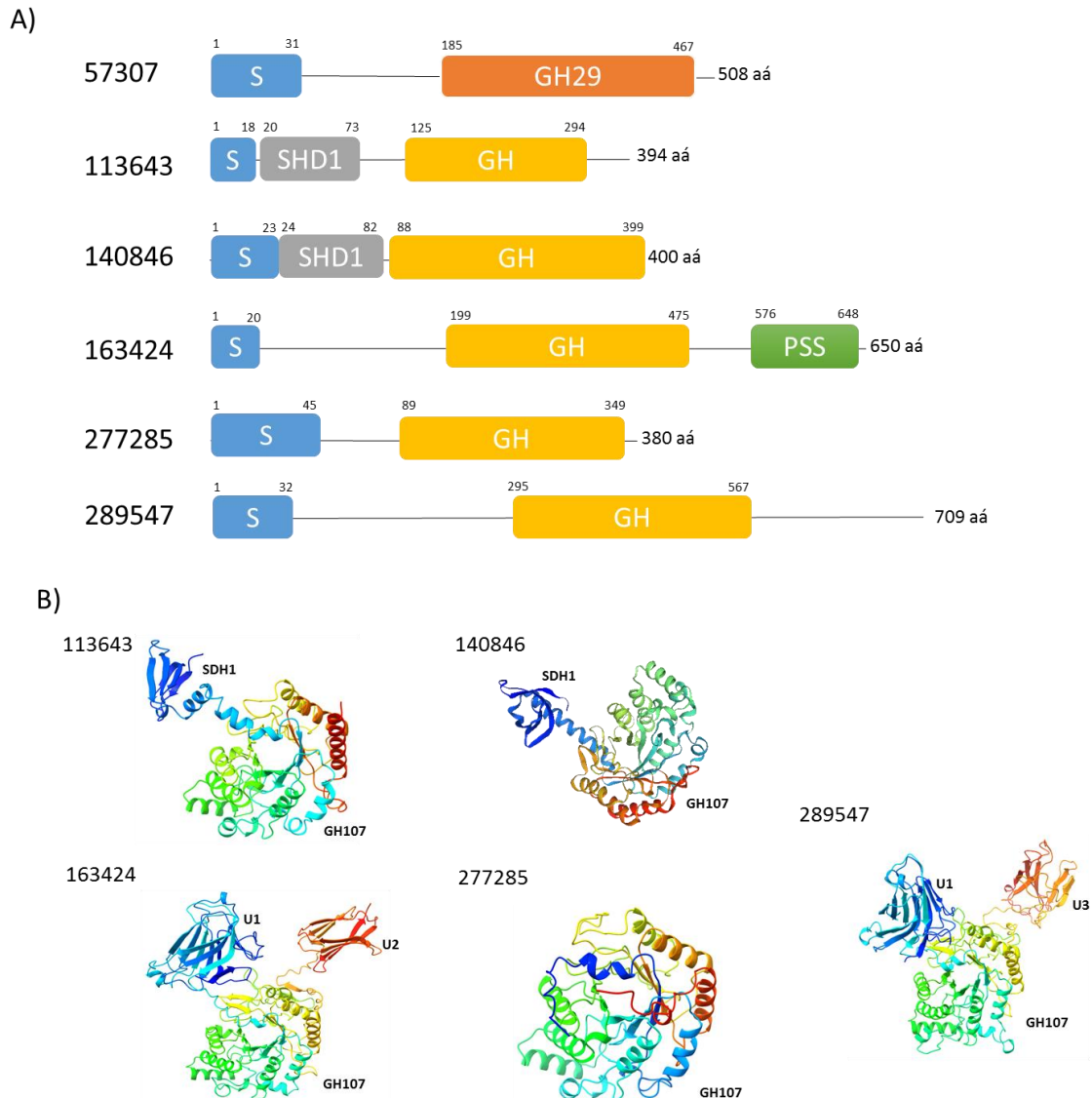


Figura 4.1. Dominios identificados en las secuencias completas homólogas a fucoidanasas de la familia GH107. A) Módulos identificados a partir de la estructura primaria mediante InterProScan. S: péptido señal, SHD1: proteína de función desconocida, GH29: módulo de actividad α -L-fucosidasa, PSS: sistema de secreción C-terminal, GH: módulo glicosido hidrolasa. B) Módulos identificados a partir del modelo de estructura tridimensional. Las secuencias fueron modeladas sin el péptido señal y los modelos fueron visualizados en UCF Chimera utilizando el modo rainbow (azul a rojo, N- a C-terminal). Los dominios con función desconocida fueron analizados en el servidor Dali.

Como se observa en la Figura 4.1.A, las secuencias 163424 y 289547 presentaron regiones que no pudieron ser anotadas funcionalmente utilizando InterProScan o métodos similares. Para poder analizar con mayor profundidad los dominios de las secuencias identificadas y definir la posible función de las regiones no anotadas, se modeló la estructura tridimensional de estas proteínas utilizando la herramienta AlphaFold2, y se visualizaron los modelos en UCSF Chimera para definir las regiones

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

comprendidas en cada dominio. Se analizaron los dominios utilizando el servidor Dali (Holm, 2022), comparando el modelo de cada dominio con la base de datos de estructuras PDB. Las posiciones relativas de los dominios o las orientaciones que se observan en los mismos presentan, sin embargo, un bajo nivel de confianza y no deben ser interpretadas en los modelos tridimensionales (<http://alphafold.ebi.ac.uk/faq>). La Figura 4.1.B muestra el modelado de cinco de las secuencias identificadas, utilizando una visualización de tipo *ribbon* ó *cartoon* y un gradiente de colores para distinguir el extremo N-terminal (azul) del C-terminal (rojo).

En el caso de las secuencias 113643 y 140846, el extremo N-terminal presentó una estructura similar a la proteína SLA1 de *Saccharomyces cerevisiae* (PDB: 2HBP), lo cual estuvo en concordancia con la anotación funcional en InterProScan. Esta identificación presentó un RMSD (media cuadrática mínima) de 1,3 Å con un 26 % de identidad de secuencia en 58 residuos con la estructura 2HBP. La secuencia 277285 en cambio, sólo presentó un único dominio, correspondiente al módulo GH107 putativo.

Las secuencias 163424 y 289547 comparten un 32,46 % de identidad a nivel de aminoácidos, similitud que se observa a lo largo de las proteínas, a excepción de la región C-terminal que presentó mayor divergencia. Este alineamiento sugiere una similar estructura multidominio en parte de las proteínas hipotéticas. Al comparar el modelo tridimensional del dominio N-terminal U1 de ambas secuencias (Figura 4.1.B), denominado U1, se observó un valor de RMSD de 1,3 Å con un 42 % de identidad en 170 aminoácidos (168 residuos equivalentes). El modelo de dominio U1 de la secuencia 163424 fue comparado con la base de datos de estructuras utilizando la herramienta *pdb search* del servidor Dali. El mismo mostró similitud con regiones no catalíticas de diversas enzimas, incluyendo β-agarasas y endo-1,4-β-xilanasas (por ejemplo PDB: 4BQ4 y 2W5F, respectivamente). En particular, este dominio presentó un RMSD de 2,9 Å con un 15 % de identidad sobre 250 residuos (137 residuos equivalentes) con el dominio CBM44 de la enzima CtCel9D-Cel44A de *Clostridium thermocellum* (PDB: 2C4X, Najmudin *et al.*, 2006), sugiriendo su posible función como un módulo de unión a carbohidratos, presente en ambas enzimas putativas.

No se observó, en cambio, una similitud en la estructura tridimensional de la región C-terminal de las secuencias 163424 y 289547 (parwise, servidor Dali), y dichos

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

dominios fueron nombrados como U2 y U3, respectivamente. Al comparar con la base de datos de estructuras, el servidor identificó al dominio DUF3244 con un tipo de plegamiento *beta-sandwich Immunoglobulin-like* de función desconocida en el caso del dominio U2 de la secuencia 163424 (PDB: 3SD2, RMSD 1,9 Å y 13 % de identidad sobre los 86 residuos, 77 equivalentes, no publicado) y un dominio CBM22-1 de una xilanasas de la familia GH10 en el caso del dominio U3 de la secuencia 289574 (PDB: 2W5F, RMSD 2,4 Å y 9 % de identidad en 511 residuos, 117 equivalentes, Najmudin *et al.*, 2010). La anotación de un sistema de secreción C-terminal (residuos 576-648) de la secuencia 163424 coincide con la posición del dominio U2 modelado (residuos 569 a 650).

4.2.1.3. Posibles hospedadores de las secuencias identificadas

La asignación taxonómica de las secuencias identificadas homólogas a fucoidasas de la familia GH107 fue realizado utilizando el programa Megan6. Dicha asignación fue establecida tanto a nivel de la secuencia identificada como del *scaffold*, en ambos casos a nivel de aminoácidos. En el segundo caso, se asignó taxonómicamente cada secuencia deducida de aminoácidos predicha en el *scaffold*.

La mayoría de las secuencias identificadas pertenecerían a organismos del *phylum* Planctomycetota (Tabla 4.2.), encontrándose menos representado el *phylum* Bacteroidota (Tabla 4.2.). Las asignaciones taxonómicas a nivel de secuencia y de *scaffold* fueron concordantes. En particular, todas las secuencias codificantes fueron asignadas al mismo *phylum* en el caso de los *scaffolds* de las secuencias 27010, 57307, 113643 y 163424, coincidiendo con la asignación taxonómica de la secuencia GH107 putativa. El *scaffold* 70692 no pudo ser asignado taxonómicamente dado que contenía un tamaño menor a 3 Kb (indicado con un asterico en la Tabla 4.2.).

La asignación taxonómica de la secuencia 140846 como así también del *scaffold* que la contiene, no permitió llegar a nivel de *phylum*, quedando su asignación a nivel de dominio.

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidanasas

Tabla 4.2. Asignaciones taxonómicas del gen y del scaffold al que pertenecen las secuencias putativas a fucoidanasas de la familia GH107 obtenidas a partir del servidor MEGAN.

Secuencia_Scaffold	Secuencia	Scaffold
27010_Scaffold-1575_S2	Planctomycetota	100 % de las secuencias Planctomycetota
57307_Scaffold-3923_S1	Planctomycetota	100 % de las secuencias Planctomycetota
113646_Scaffold-6734_S1	Planctomycetota	100 % de las secuencias Planctomycetota
163424_Scaffold-9822_S1	Bacteroidota	100 % Bacteroidota
140846_Scaffold-10782_S2	Bacteria	Bacteria
289547_Scaffold-70692_S1	Bacteroidota	*
277285_Scaffold-322417_S2	Planctomycetota	63 % de las secuencias Planctomycetota

*Scaffold sin asignar taxonómicamente, tamaño menor a 3 Kb.

Con respecto a las secuencias más cercanas de la base de datos nr del NCBI (realizado en mayo de 2022, utilizando el algoritmo blastp), la mayoría de las secuencias compartieron elevados porcentajes de identidad (entre 61 y 82 %) con las secuencias identificadas en el *set* de datos metagenómico (Tabla 4.3.). Los porcentajes de cobertura fueron en todos los casos altos ($\geq 96\%$), a excepción de la secuencia 163424 con respecto a la secuencia con número de acceso WP_139959462. En todos los casos, la secuencia más cercana de la base de datos perteneció al mismo grupo taxonómico que la asignación taxonómica de la secuencia GH107 putativa.

Se corroboró la posible actividad fucosidasa de la secuencia 57307, dado que la secuencia más cercana (61,66 % de identidad) presente en la base de datos nr se trataba de una secuencia anotada como una α -L-fucosidasa proveniente del organismo *Novipirellula aureliae* del *phylum* Planctomycetota.

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

Tabla 4.3. Resultados de la búsqueda de secuencias similares en la base de datos de proteínas no redundante del NCBI, mediante el algoritmo blastp. Para cada secuencia identificada, se indica la secuencia más cercana proveniente de un microorganismo cultivado.

Secuencia	Proteína	No. Acceso GenBank	Organismo	Phylum	% identidad	% cobertura
57307	alpha-L-fucosidase	WP_146602643	<i>Novipirellula aureliae</i>	Planctomycetota	61,66	96
113643	hypothetical protein	TWT80423	<i>Planctomycetes bacterium</i> CA13	Planctomycetota	80,51	98
140846	hypothetical protein	TWT80423	<i>Plactomycetes bacterium</i> CA13	Planctomycetota	75,82	99
163424	hypothetical protein	WP_139959462	<i>Flavicella sediminum</i>	Bacteroidota	73,90	56
277285	hypothetical protein	TWU50609	<i>Rubripirellula tenax</i>	Planctomycetota	81,32	100
289547	hypothetical protein	WP_139958824	<i>Flavicella sediminum</i>	Bacteroidota	71,07	100
27010	hypothetical protein	TWT80423	<i>Planctomycetes bacterium</i> CA13	Planctomycetota	37,59	97

4.2.1.4. Análisis filogenéticos de las secuencias pertenecientes a la familia GH107 y las secuencias GH107 putativas identificadas

Dada la divergencia existente entre los miembros de la familia GH107, se realizó en primer lugar un análisis filogenético entre dichas secuencias, para luego evaluar su relación con las secuencias homólogas identificadas a partir de ellas.

4.2.1.4.1. Relaciones filogenéticas entre miembros de la familia GH107

A partir del alineamiento múltiple de los módulos catalíticos GH107 de 31 miembros de la familia GH107, se realizó un análisis filogenético que reveló la presencia de dos agrupamientos, indicados con las letras A y B en la Figura 4.2. El agrupamiento A incluye mayormente secuencias que han sido clasificadas dentro de dicha familia pero que aún no han sido caracterizadas bioquímicamente. La excepción incluye a las enzimas caracterizadas P5AFcnA de *Psychromonas* sp. SW5A y Mef2 de *M. eckloniae* en donde sólo en la última se ha determinado su especificidad por enlaces α -(1→3)- (Tran *et al.*, 2022). Por otro lado, el clado B incluye casi en su totalidad secuencias de enzimas caracterizadas (señaladas en negrita en el árbol de la Figura 4.2.), las cuales son enzimas que reconocen enlaces α -(1→4)- de los fucoidosanos.

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

Por fuera de los dos clados mayoritarios, se encuentran dos enzimas fucoidasas (Fda2 y Fda2) de *Alteromonas* sp. SN-1009 que reconocerían enlaces del tipo α -(1→3)- (Takayama *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2021), y la enzima fucoidasa putativa SVI_0379 no caracterizada de *S. violaceae* DSS12.

En el margen derecho de la Figura 4.2. se indica la arquitectura modular de las enzimas de la familia GH107 que han sido caracterizadas. El dominio propuesto como responsable de la actividad fucoidasa se indica en color amarillo y se presentó próximo al extremo N-terminal. Además del péptido señal (letra S en Figura 4.2.) se identificaron dominios *Inmunoglobulin-like* (Ig R1/R2/R3), módulos de unión al calcio (ConA y EF), proteínas de la superficie celular (SprB_repeat), módulo de unión a carbohidratos (CBM), módulo de unión a galactosa (Galactose-bd), módulo implicado en la adhesión celular (Invasin) y módulos en la región C-terminal (Pept1/Pep2 y PSS).

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidanasas

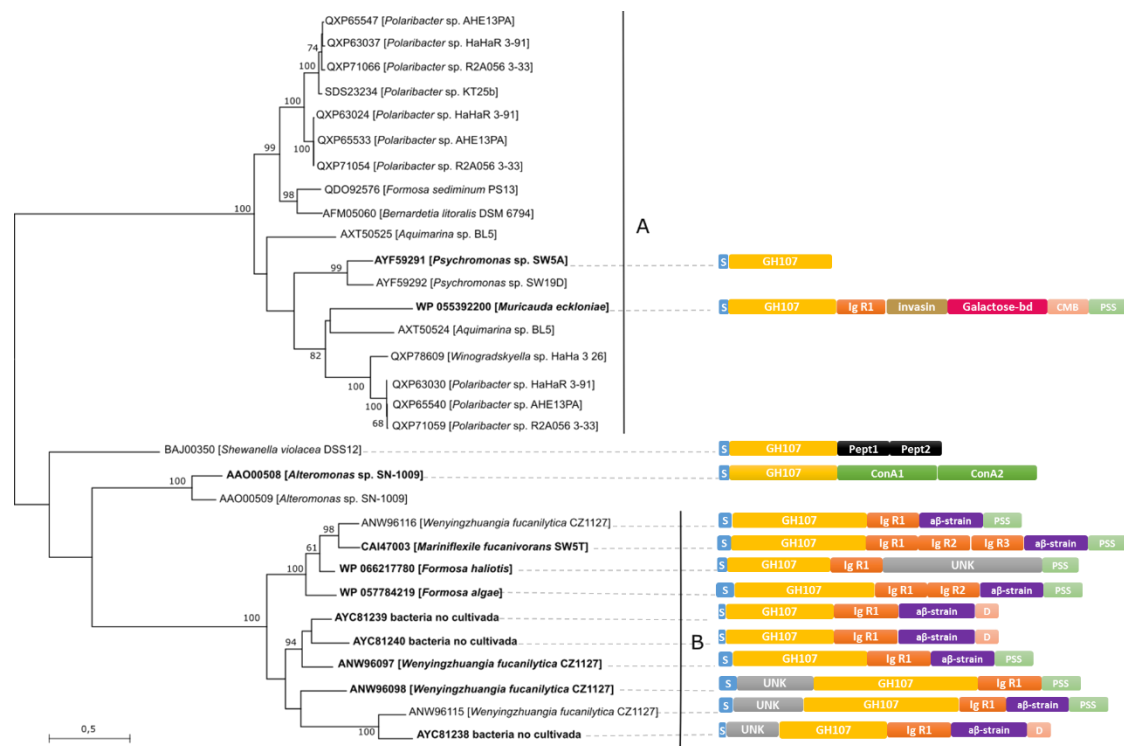


Figura 4.2. Relaciones filogenéticas entre secuencias de enzimas fucoidanasas pertenecientes a la familia GH107 (CAZy) y arquitectura modular de dichas secuencias. En negrita se indican las secuencias de referencia que han sido expresadas y caracterizadas hasta el momento. Los números y letras iniciales corresponden al número de acceso en la base de datos GenBank del NCBI. El árbol fue construido a partir del alineamiento de los módulos catalíticos (268 aminoácidos), mediante el método de máxima verosimilitud, aplicando el modelo WAG+G y validado por el algoritmo *Neighbor-joining*. Se indican los valores de bootstrap > 60 % (100 replicas). En el margen derecho se indica la arquitectura modular (obtenidos mediante InterProScan) de las enzimas que han sido caracterizadas. S: péptido señal, SprB_repeat: dominio proteína de la superficie celular (IPR025667), GH107: módulo catalítico, Ig R1/R2/R3: dominio de inmunoglobulina (IPR013783), Pept1/Pep2: módulo C-terminal asociado con peptidasas (IPR007280), EF1/EF2: EF-hand unión al calcio (IPR18247), Galactose-bd: Galactosa binding-like (IPR008979), aβ-strain: modulo de cadenas β, CBM: módulo de unión a carbohidratos (IPR005084), PSS: módulo de secreción C-terminal (IPR026444), Invasin: fragmento de adhesión celular (IPR008664), UNK: dominio putativo con función desconocida y ConA: dominio *Concavalina A-like* (IPR013320).

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

4.2.1.4.2. Relaciones filogenéticas entre miembros de la familia GH107 y las secuencias identificadas

El análisis filogenético fue realizado a partir del alineamiento múltiple del módulo catalítico de 31 secuencias de enzimas fucoidasas de la familia GH107 y 6 secuencias homólogas identificadas a partir de ellas. El árbol filogenético reveló la presencia de 2 grandes agrupamientos (*clusters*) bien soportados (*cluster* A y B en Figura 4.3.). El *cluster* A contiene las mismas secuencias de referencia que el *cluster* A de la Figura 4.2., donde incluye en su mayoría miembros de la familia GH107 que no han sido caracterizados, además de dos de las secuencias homólogas (289547 y 163424), asignadas al *phylum* Bacteroidota. A excepción de las dos secuencias pertenecientes al género *Psychromonas*, las secuencias genómicas incluídas en este *cluster* pertenecen a organismos del mismo *phylum*.

En el segundo *cluster* (B) se incluyen tres de las secuencias homólogas a la familia GH107, 113643, 140846 y 277285, todas asignadas al *phylum* Plactomycetota. Las secuencias 113643 y 140846 formaron un pequeño *cluster* (83 % de identidad a nivel de aá), vinculado (aunque no bien soportado) a otro agrupamiento de tres miembros de la familia GH107 (35 – 38 % identidad), perteneciendo estas últimas enzimas a organismos del *phylum* Pseudomonadota y con posible actividad $\alpha(1\rightarrow3)$ - en el caso de las enzimas de *Alteromonas* sp. SN-1009.

La secuencia 57307 resultó ser muy divergente con respecto a las enzimas de la familia GH107 y a las restantes secuencias homólogas identificadas en este trabajo, con porcentajes de identidad < 11 % a nivel de aminoácidos, lo cual se ve reflejado con su posición distante en el árbol como así también por el largo de la rama que la contiene. La presencia del dominio GH29 (descrito anteriormente), como así también su similitud a una secuencia putativa de una α -L-fucosidasa de *N. aureliae*, sumando al bajo porcentaje de identidad con respecto a las restante secuencias homólogas identificadas, sugieren su posible actividad fucosidasa.

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidanasas

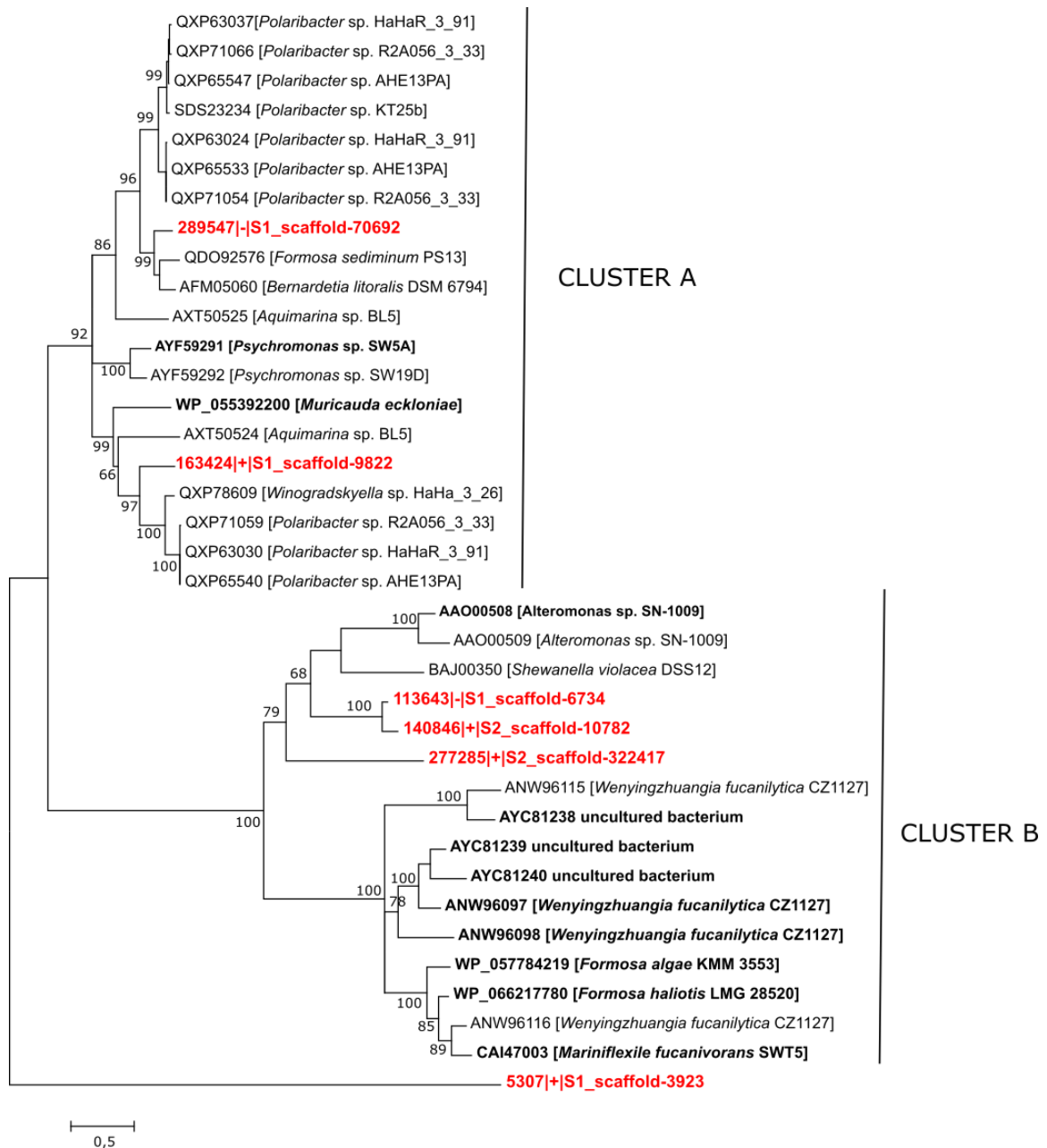


Figura 4.3. Relaciones filogenéticas entre miembros de la familia GH107 y las secuencias identificadas por homología a partir de ellas. En negrita se indican las enzimas fucoidanasas GH107 que han sido caracterizadas. Las secuencias metagenómicas (mayores de 300 aa) identificadas en este trabajo se indican en color rojo. El árbol fue construido a partir del alineamiento de los módulos catalíticos (241 aminoácidos), mediante el método de máxima verosimilitud, aplicando el modelo WAG+G+I y validado por el algoritmo *Neighbor-joining*. Se indican los valores de bootstrap $\geq 60\%$ (100 replicas).

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

4.2.1.5. Análisis estructurales de las secuencias GH107 putativas

4.2.1.5.1. Conservación de los residuos catalíticos en alineamientos múltiples

Se analizaron los alineamientos de la estructura primaria de las secuencias GH107 que han sido caracterizadas (en negrita Figura 4.3.) y las secuencias metagenómicas identificadas, considerando únicamente el módulo catalítico GH107. La secuencia 57307 al tratarse de una secuencia putativa de α -L-fucosidasas, fue excluida en dicho alineamiento y por lo tanto del análisis. Tampoco se consideró la secuencia 27010, dado que se encontraba trunca con una longitud menor a 300 aa, por lo que no incluye completamente el módulo catalítico.

Se analizaron los motivos 'RxxxxDxWxxD' y 'DxxxGH', donde el primero incluye al aminoácido aspartato (segunda D, indicado con una flecha violeta en la Figura 4.4.A) y el segundo al residuo histidina (H, indicado con una flecha azul en la Figura 4.4.B), ambos propuestos como residuos directamente involucrados en la actividad fucoidasasa y por lo tanto, altamente conservados en miembros de la familia GH107 (Colin *et al.*, 2006; Vickers *et al.*, 2018). En la Figura 4.4.A se indica la sección del alineamiento correspondiente al primer motivo, donde no existió una estricta conservación entre las secuencias analizadas, aunque sí del residuo asparato.

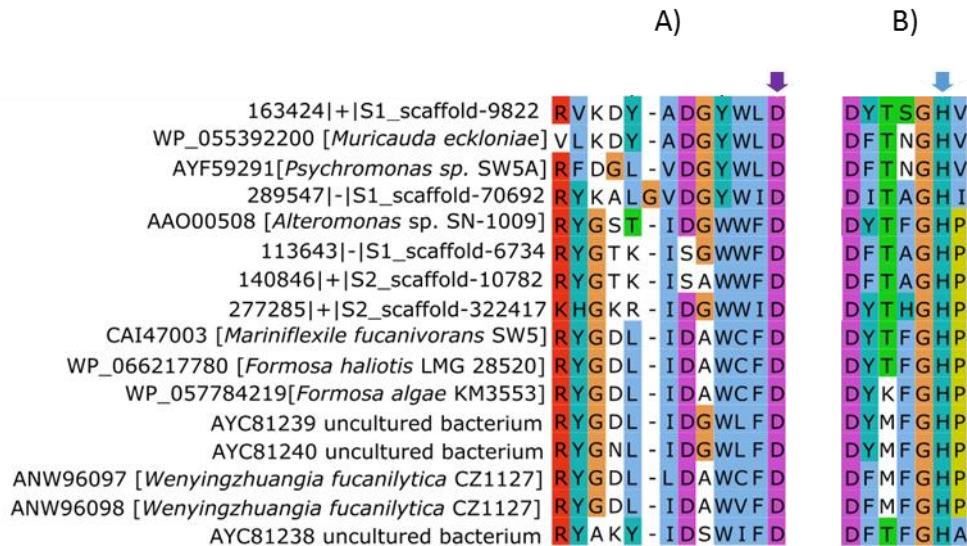


Figura 4.4. Sección del alineamiento entre enzimas caracterizadas de la familia GH107 y las fucoidasas putativas identificadas. A) Se indica la conservación del motivo 'RxxxxDxWxxD'. La flecha violeta indica la posición del residuo aspartato (D) implicado en la actividad fucoidasasa. B) Se indica la conservación del motivo 'DxxxGH'. La flecha azul indica la posición del residuo histidina (H) implicado en la actividad fucoidasasa.

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidanasas

En la Figura 4.4.B se indica la sección del alineamiento correspondiente al segundo motivo 'DxxxGH', donde todas las fucoidanasas putativas lo presentan, el cual contiene el segundo residuo implicado en la actividad fucoidanasa (señalado con una flecha azul). La presencia de ambos aminoácidos (D y H) constituye una evidencia de la posible actividad fucoidanasa de las secuencias putativas identificadas.

De igual manera, se analizó la conservación de los residuos propuestos como involucrados en el reconocimiento del sustrato (conformando el subsitio -1), cuyas posiciones reportadas para la enzima Fhf1 de *Formosa haliotis* LMG 28520 son Y142, N144, N266 y W364.

Los aminoácidos tirosina (Y) y triptofano (W), indicados para la enzima Fhf1 en las posiciones 142 y 364 respectivamente, se encontraron presentes en todas las secuencias analizadas (flecha verde y naranja respectivamente, Figura 4.5.). Al analizar la posición N266 de la enzima Fhf1 (flecha gris, Figura 4.5.), se observaron tres variantes en las secuencias, asparagina (N), glutamina (Q) y serina (S). Estos tres residuos (N, Q y S) corresponden a aminoácidos polares sin carga. Para el restante residuo potencialmente implicado en el reconocimiento del sustrato, se analizó la posición N144 de Fhf1 (flecha amarilla, Figura 4.5.), donde se encontraron tres variantes, siendo ellas los aminoácidos asparagina (N), alanina (A) y serina (S). Las secuencias 113643 y 140846 presentaron el aminoácido alanina al igual que la enzima Fda1 de *Alteromonas* sp. SN-1009. Por otro lado, las secuencias 277285 y 289574, presentaron el aminoácido asparagina (N) al igual que 9 miembros de la familia GH107 (considerados en el alineamiento). Por último, la secuencia 163424, presentó el aminoácido serina, al igual que la enzima Mef2 de *M. eckloniae*, siendo una variante menos predominante.

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

	Y	N/A/S	N	W
163424 + S1_scaffold-9822	Y	I	A	K
WP_055392200 [<i>Muricauda eckloniae</i>]	Y	I	T	R
AYF59291 [<i>Psychromonas</i> sp. SW5A]	Y	L	V	S
289547 - S1_scaffold-70692	Y	L	A	T
AAO00508 [<i>Alteromonas</i> sp. SN-1009]	Y	I	F	S
113643 - S1_scaffold-6734	Y	F	N	W
140846 + S2_scaffold-10782	Y	F	S	T
277285 + S2_scaffold-322417	Y	F	M	K
CAI47003 [<i>Mariniflexile fucanivorans</i> SW5]	Y	V	F	S
WP_066217780 [<i>Formosa haliotis</i> LMG 28520]	Y	V	F	S
WP_057784219 [<i>Formosa algae</i> KM3553]	Y	V	F	S
AYC81239 uncultured bacterium	Y	V	F	S
AYC81240 uncultured bacterium	Y	V	F	R
ANW96097 [<i>Wenyngzhuangia fucanilytica</i> CZ1127]	Y	V	F	S
ANW96098 [<i>Wenyngzhuangia fucanilytica</i> CZ1127]	Y	V	F	S
AYC81238 uncultured bacterium	Y	L	F	A

Figura 4.5. Conservación de los residuos que conforman el subsitio -1. El alineamiento incluye a miembros de la familia GH107 y a secuencias putativas a fucoidasas identificadas en el set de datos metagenómico.

4.2.1.5.2. Análisis de modelos de la estructura tridimensional

El modelado de la estructura tridimensional de las secuencias identificadas permite evaluar el grado de similitud estructural de dichas secuencias con estructuras determinadas experimentalmente dentro de la familia GH107, y complementan las observaciones realizadas en los alineamientos múltiples, específicamente en la determinación de conservación de los residuos implicados en la actividad fucoidasasa. Previo al análisis del modelado de la estructura tridimensional, se realizó la búsqueda de los plantados para cada secuencia completa utilizando el servidor SWISS-MODEL. El primer plantado obtenido, el cuál presentaba el mayor porcentaje de identidad y cobertura, fue utilizado para la predicción de la estructura tridimensional (Tabla 4.4.). A excepción de la secuencia 57307, los primeros plantados listados en SWISS-MODEL se correspondían con las estructuras conocidas de enzimas pertenecientes a la familia GH107, con una alta cobertura (si bien bajos porcentajes de identidad) en la región del probable módulo catalítico. Esto constituye una nueva evidencia de la relación que existe entre las secuencias identificadas y estos miembros de dicha familia.

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

Tabla 4.4. Templados de las secuencias homólogas a miembros de la familia GH107 obtenidos a partir del servidor SWISS-MODEL.

Secuencia	Código PDB*	Templado	% identidad	Rango de cobertura
113643	6DNS	Alpha-1,4-endofuoidanase (MfFcnA9)	33,81	88 – 377
140846	6DLH	Alpha-1,4-endofuoidanase (MfFcnA4)	34,55	94 – 383
163424	6M8N	P5AFcnA	46,07	197 – 561
277285	6DLH	Alpha-1,4-endofuoidanase (MfFcnA4)	28,25	32 – 263
289547	6M8N	P5AFcnA	44,82	198 – 571

*Código de acceso a la base de datos Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>)

En tres secuencias (113643, 140846 y 277285), todas asignadas al *phylum* Planctomycetota, el primer templado sugerido por la herramienta SWISS-MODEL fue la estructura de la enzima FcnA de *M. fucanivorans* SWT5 en dos de sus variantes (PDB: 6DNS y 6DLH, Vickers *et al.*, 2018), con porcentajes de identidad > 28 %. Estas estructuras consisten en dos formas trucas de la enzima FcnA, donde MfFcnA4 incluye Gln29-Ser734 (el módulo GH107 y tres dominios Ig-R) y MfFcnA9 a los residuos Gln29-Asp623 (con el módulo GH107 y dos dominios Ig-R). El análisis de la estructura multidominio de las secuencias identificadas en el set de datos metagenómico (sección 4.2.1.2.) mostró que las mismas no contenían dominios Ig-R, por lo que sólo la región del módulo GH107 putativo podrá ser modelada en esta herramienta. Las secuencias 163424 y 289547, asignadas al *phylum* Bacteroidota, presentaron como primer templado sugerido a la estructura de la enzima fucoidasasa P5AFcnA (PDB: 6M8N) de *Psychromonas* sp. SW5A (Vickers *et al.*, 2018). Esta enzima comparte porcentajes de identidad más altos (44 – 46 %) con dichas secuencias, y sólo contiene el módulo GH107. A modo de comparación, las secuencias de las enzimas FcnA y P5AFcnA comparten un 12 % de identidad a nivel de aminoácidos, lo cual refleja un alto grado de divergencia entre ellas.

Para la determinación general de la calidad del modelo obtenido en SWISS-MODEL se consideraron dos parámetros de calidad del modelo: GMQE y Z-QMEAN. El modelo de la secuencia 113643 generado por la herramienta SWISS-MODEL utilizando la estructura 6DNS (MfFcnA9) como templado, presentó valores de GMQE y Z-QMEAN de 0,36 y -4,24, respectivamente, por lo que el modelo obtenido representa una baja calidad (Figura 4.6.A.). Dado que los porcentajes de identidad observados en las

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

secuencias 113643 y 140846 con respecto a las estructuras conocidas resultaron bajas, y en consecuencia la calidad de los modelos fue pobre, se analizó el modelo generado utilizando la herramienta AlphaFold2 para el modelado tridimensional de la región del módulo catalítico GH107 putativo de dichas secuencias. El modelo generado en AlphaFold2 mostró una alta calidad, con bajos valores en el gráfico PAE y altos valores de pLDDT (Figura 4.6.B.). Se compararon los dos modelos generados a partir del módulo catalítico putativo de la secuencia 113643, con las herramientas SWISS-MODEL y AlphaFold2 utilizando la herramienta UCSF Chimera. En primer lugar se calcularon los valores de RMSD al superponer ambos modelos, y los valores obtenidos se discriminaron en el modelo colorando los residuos basados en los valores de RMSD obtenidos. Si bien pueden observarse importantes diferencias entre los modelos generados con las herramientas SWISS-MODEL y AlphaFold2, los mismos mostraron una mayor similitud en la región del sitio activo, con valores menores de RSMD mostrados en color azul (Figura 4.6.C.). Aquellos residuos que presentaron valores altos de RSMD se indican en color rojo, mientras que en amarillo se muestran los residuos que no fueron modelados en SWISS-MODEL y por lo tanto carecen de valor de RSMD (Figura 4.6.C.).

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

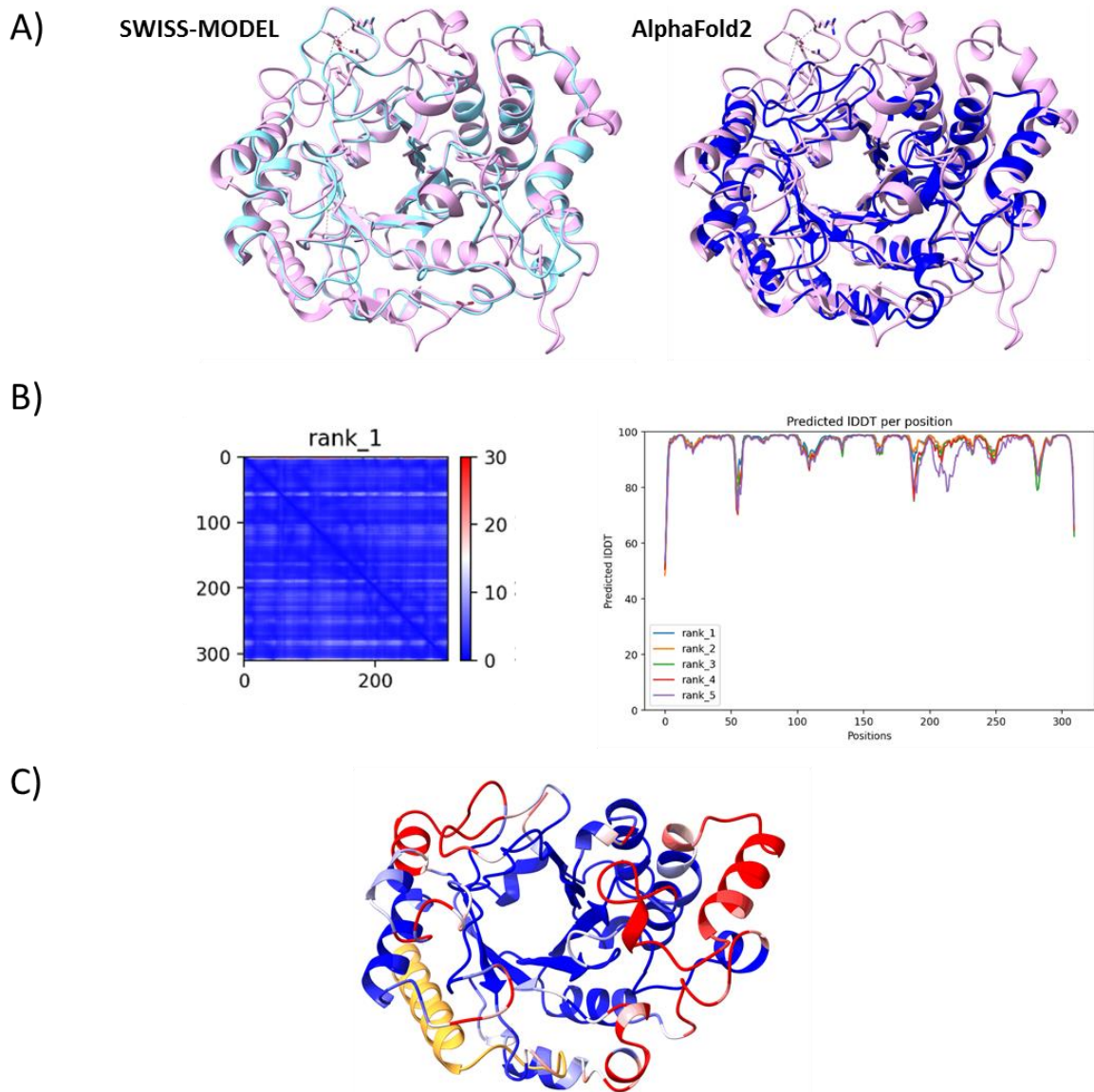


Figura 4.6. Modelado tridimensional de la secuencia 113643. A) modelo superpuesto a la estructura de la enzima MfFcnA9 (PDB: 6DNS, en rosa, sin los dominios Ig R). Izquierda, modelo obtenido por SWISS-MODEL (en color celeste), derecha, obtenido en AlphaFold2 (Rank1, en color azul). B) Estimadores de calidad del modelo generado en AlphaFold2. Izquierda, gráfico PAE del modelo con Rank1, derecha, gráfico de pDDT predicho por posición para los cinco modelos generados. C) Comparación de los modelos generados en SWISS-MODEL y AlphaFold2. El modelo generado en AlphaFold2 se observa coloreado en base a su diferencia con el modelo generado en SWISS-MODEL, de acuerdo a los valores de RMSD por residuo (Å, azul a rojo). En color amarillo se muestran los residuos faltantes en el modelo generado por SWISS-MODEL, y por lo tanto sin información de RMSD por residuo.

A partir del modelado obtenido mediante Alphafold2 para la secuencia 113643, se observó la conservación de los residuos propuestos como implicados en la catálisis (Figura 4.7.). Este análisis complementa los resultados indicados en las Figuras 4.4. y

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

4.5., donde se observó la conservación de los residuos catalíticos a partir del alineamiento múltiple con secuencias de referencia.

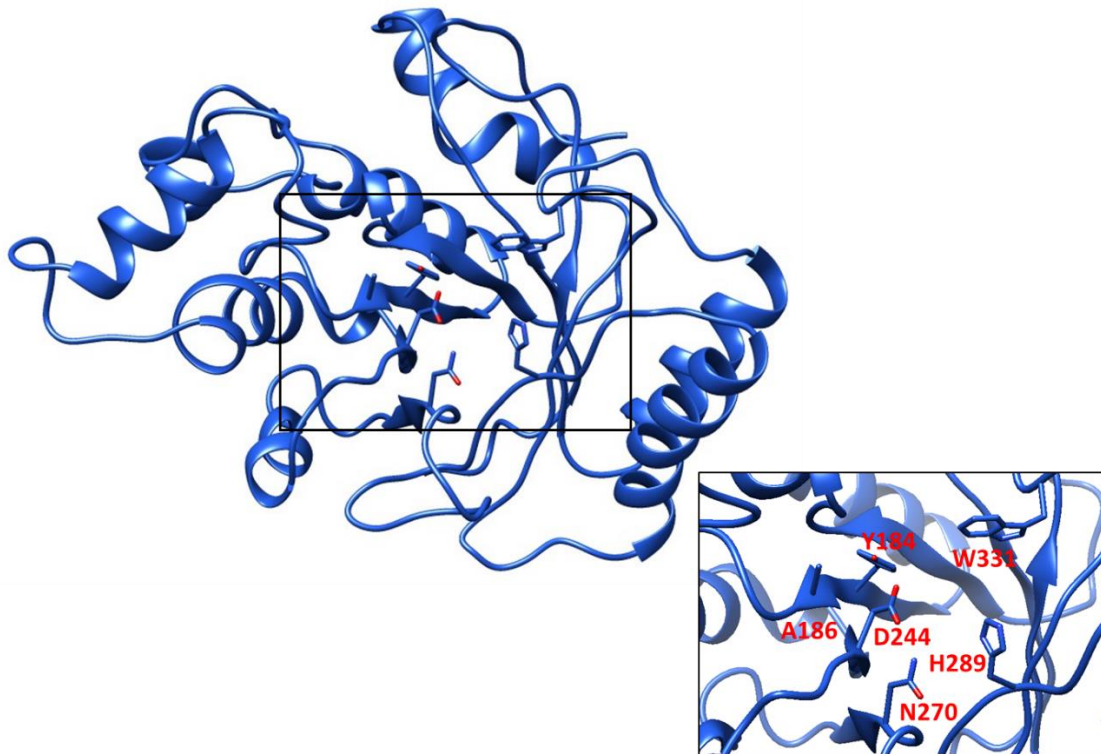


Figura 4.7. Identificación de los residuos implicados en la catálisis en el modelo obtenido para la secuencia 113643 mediante AlphaFold2. Los residuos propuestos como implicados en la catálisis enzimática son D244 y H289, mientras que los cuatro residuos restantes conforman el sitio -1. Las numeraciones corresponden a las presentes en la secuencia 113643.

En las estructuras 6DNS y 6DLH se identificaron sitios de unión al Ca^{2+} en los módulos catalíticos GH107. Mediante la superposición del modelo de la secuencia putativa 113643 obtenido por AlphaFold2 y dichas estructuras, se determinó si los mismos se encontraban conservados en la secuencia metagenómica. En la Figura 4.8. se observa que en ambos casos la región de la proteína relacionada con la unión al calcio no se encuentra conservada en el modelo obtenido para la secuencia 113643 (en azul). Este es el caso del sitio de unión al Ca^{2+} que contienen las estructuras 6DNS (izquierda, en naranja) y 6M8N (derecha, en verde).

Debido a la similitud en la arquitectura modular entre las secuencias 140846 y 113643, como así también, el alto porcentaje de identidad que comparten, no se realizó el modelo de la secuencia 140846.

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

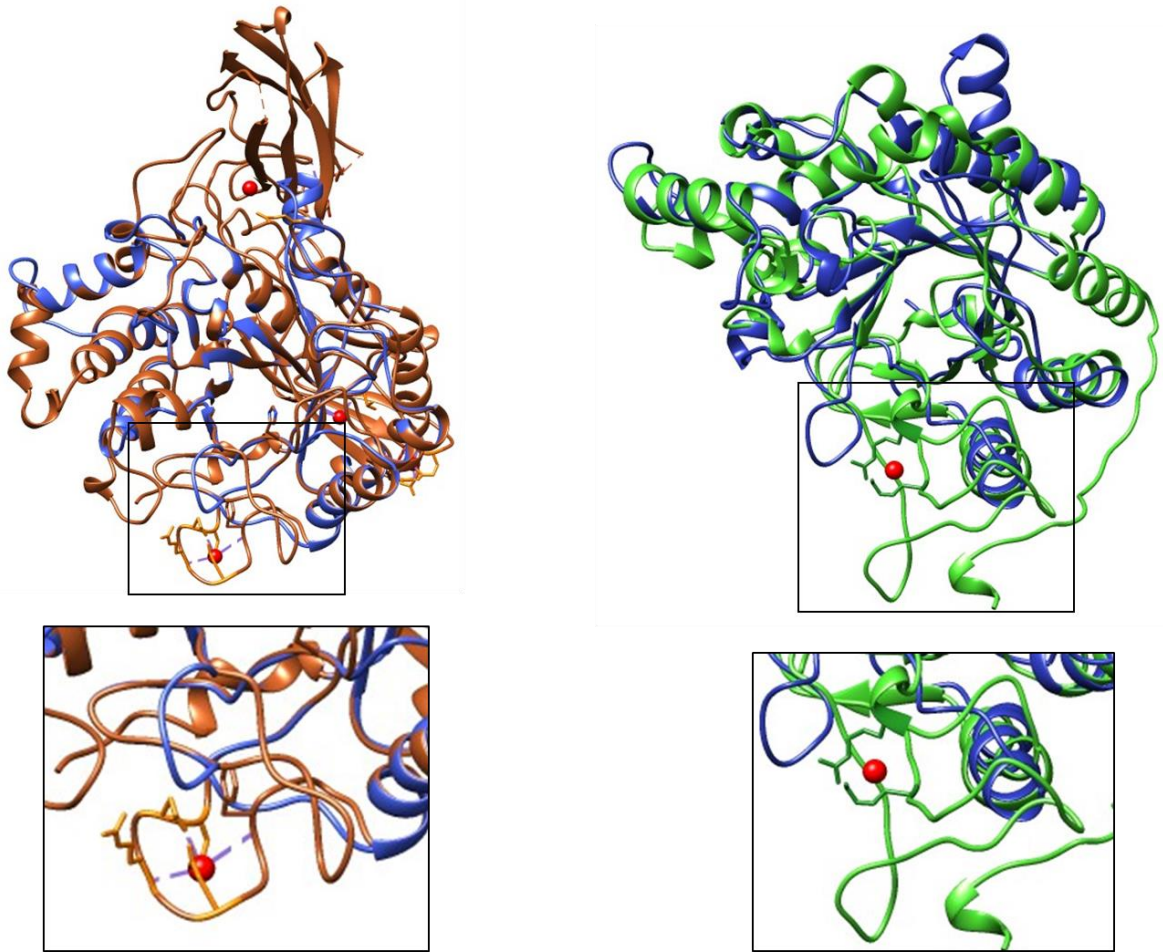


Figura 4.8. Identificación de sitios de unión al Ca^{2+} . A) Superposición del modelo obtenido para la secuencia putativa 113643 (azul) con la estructura de la enzima MfFcnA9 de *M. fucanivorans* (PDB: 6DNS) en color naranja. B) Superposición del modelo obtenido para la secuencia putativa 113643 (azul) con la estructura de la enzima P5AFcnA de *Psychromonas* sp. SW5A (PDB: 6M8N) en color verde. Los recuadros indican en detalle los sitios de unión al calcio, ambos ausentes en la secuencia modelada. Los iones calcio se indican con un círculo rojo.

La secuencia 163424 fue modelada utilizando la estructura de la enzima P5AFcnA (PDB: 6M8N) como templado, con la cual comparte un porcentaje de identidad de 46,07 % (Figura 4.9.). Los valores de los parámetros de calidad del modelo fueron 0,46 para GMQE y -2,39 de Z-QMEAN. Estos resultados indican un modelo de mayor calidad con respecto al modelo anterior obtenido por SWISS-MODEL. En el lado izquierdo de la Figura 4.9. se muestra la superposición del templado utilizado y del modelo obtenido, mientras que en el lado derecho se indica el detalle de la conservación de los residuos propuestos como involucrados en la catálisis. Existieron discrepancias con respecto a dos aminoácidos que conforman el subsitio -1 correspondiendo dichos residuos a S303 y Q385 de la secuencia modelada (en celeste, Figura 4.9.). Se pudo observar que la región que incluye al sitio de unión al calcio en la estructura de P5AFcnA (círculo rojo,

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

Figura 4.9.), se encontraba en el modelo obtenido para la secuencia 163624, por lo que es posible que posea dicho sitio.

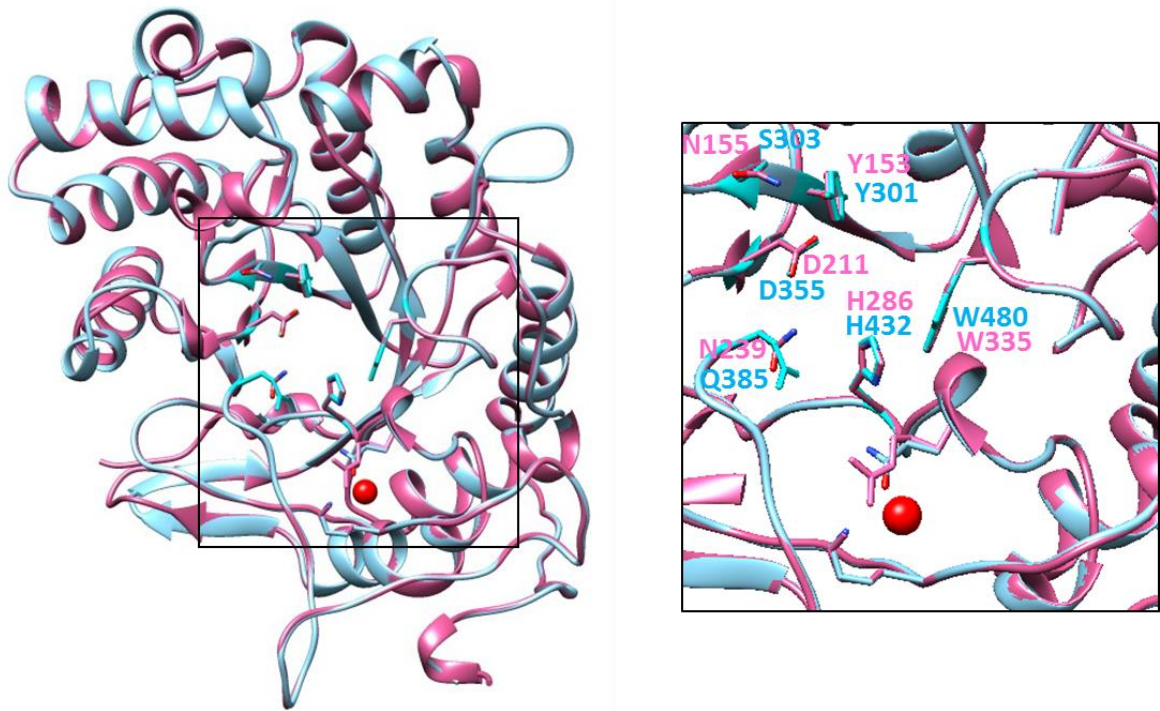


Figura 4.9. Modelado tridimensional de la secuencia 163424 (celeste) obtenido a partir de SWISS-MODEL. Izquierda: Superposición del modelo obtenido con la estructura 6M8N (magenta) de la enzima P5AFcnA. Derecha: identificación de los residuos implicados en la catálisis y en el reconocimiento del sustrato. El ión calcio se indica en color rojo.

Al igual que en el caso anterior, la secuencia 289547 fue modelada tridimensionalmente (en amarillo, Figura 4.10.) a partir de la estructura 6M8N de la enzima P5AFcnA (magenta, Figura 4.10.), presentando un porcentaje de identidad de 44,82 %. Los valores de los parámetros de calidad del modelo fueron 0,40 para GMQE y -2,09 de Z-QMEAN. Estos resultados sugieren un modelo de calidad media para la secuencia 289547, como así también un ajuste aceptable con respecto a la estructura de la enzima P5FcnA. Con respecto a la conservación de los residuos implicados en la catálisis, se observó conservación de todos los residuos en el modelo de la secuencia 289547 (en amarillo del lado derecho, Figura 4.10.). Por otro lado, se pudo observar que la región que incluye al sitio de unión al calcio en la estructura de P5AFcnA (círculo rojo, Figura 4.10.), se encontraba en el modelo obtenido para la secuencia putativa, por lo que es posible que posea dicho sitio.

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidanasas

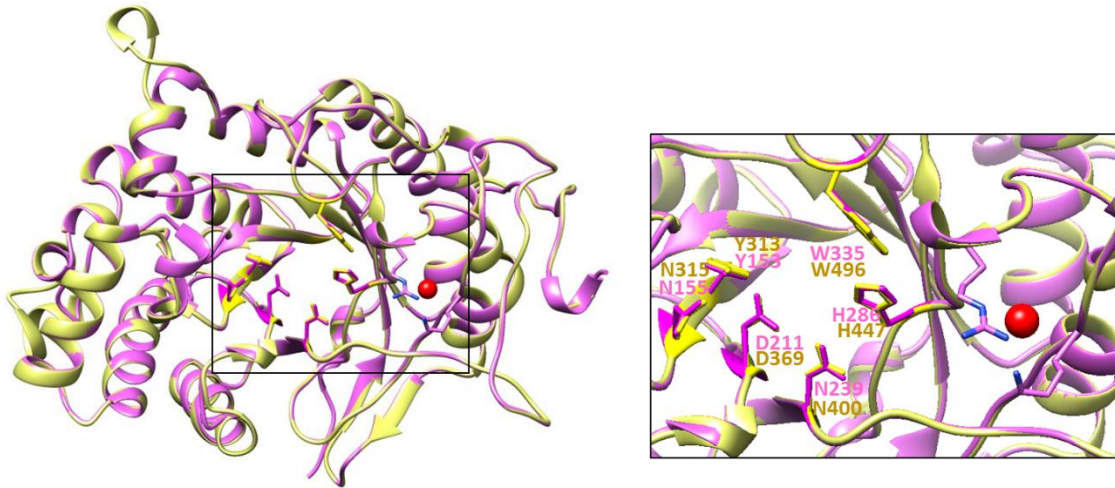


Figura 4.10. Modelado tridimensional de la secuencia 289547 (amarillo) obtenido a partir de SWISS-MODEL. Izquierda: Superposición del modelo obtenido con la estructura 6M8N (magenta) de la enzima P5AFcnA. Derecha: identificación de los residuos implicados en la catálisis y en el reconocimiento del sustrato. El ión calcio se indica en color rojo.

Al existir un limitado número de estructuras de miembros de la familia GH107 determinadas experimentalmente, y el bajo porcentaje de identidad que comparten con las secuencias identificadas en el *set* de datos metagenómico, la estrategia de modelado de la estructura tridimensional mediante el uso de un templado resultó en modelos que presentaron bajos a moderados valores de parámetros de calidad. Es posible que otras estructuras aún no disponibles puedan presentar un mejor ajuste, como por ejemplo la de las enzimas GH107 más cercanas a las secuencias identificadas. El modelo de la estructura tridimensional utilizando la herramienta AlphaFold2 resultó en un modelo con índices de calidad elevados, que resultaron de utilidad tanto para determinar la estructura multidominio como la posible estructura tridimensional del módulo catalítico GH107 putativo.

4.2.1.6. Contexto genómico de las secuencias putativas de fucoidanasas

El contexto genómico de las secuencias homólogas a enzimas de la familia GH107 brindan una nueva evidencia de la posible función de las secuencias identificadas, en base al principio “culpable por asociación” (*guilty by association*, Oliver, 2000). Este enfoque puede sugerir la función ó funciones de la secuencia a caracterizar, a partir de la función que presentan los genes adyacentes.

Los fragmentos ensamblados que contienen a los genes identificados fueron anotados funcionalmente y curados manualmente a fin de evaluar cuales podrían ser

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

las funciones de las secuencias presentes en cercanía de las secuencias codificantes de fucoidasas putativas. En particular, se evaluó si las secuencias contenidas en los *scaffolds* analizados podrían estar relacionadas con la asimilación de fucoanos. Estos procesos generalmente involucran enzimas asociadas a la despolimerización de los fucoanos, transportadores de los productos de degradación, como así también reguladores transcripcionales, los cuales pueden estar codificados en *clusters* de genes.

Se observó la presencia de numerosas secuencias codificantes de enzimas sulfatasas (flecha azul en Figura 4.11.), principalmente en *scaffolds* que pertenecerían a organismos del *phylum* Plactomycetota. Los genes que codifican para dichas enzimas se encontraron próximos a la secuencia identificada como homóloga a la familia GH107 (flecha verde en Figura 4.11.). En el *scaffold* 10782, que contiene la secuencia 140846, se identificaron cinco secuencias putativas de enzimas sulfatasas, una secuencia putativa a una α -L-fucosidasa (flecha color violeta en Figura 4.11.), como así también, una secuencia que codificaría para una enzima fucoidasa homóloga a miembros de la familia GH168 (secuencia 140843, flecha roja).

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidanasas

4.2.1.7. Sintenia compartida

El análisis de sintenia compartida mostró una muy limitada conservación del orden de los genes en los fragmentos metagenómicos que pertenecerían al *phylum* Planctomycetota y el fragmento genómico de *Planctomycetes bacterium* CA13. Se observó cierto grado de conservación en las secuencias que codificarían para enzimas sulfatasas (flecha azul, Figura 4.12.), con porcentajes de identidad a nivel de nucleótidos entre 70 y 87 %.

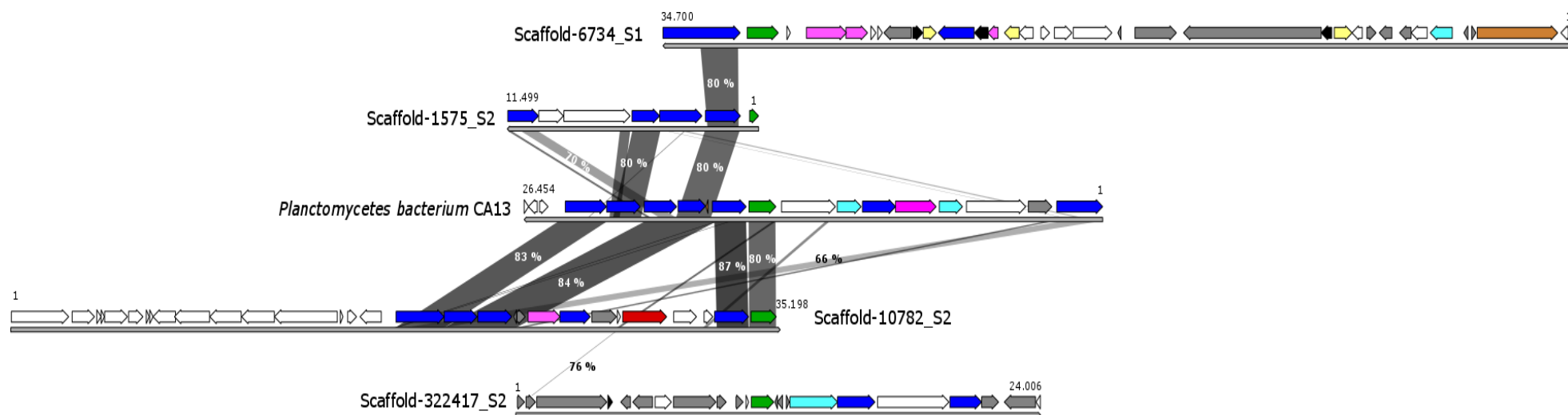


Figura 4.12. Sintenia compartida entre los scaffolds a los que pertenecen las secuencias putativas de fucoidanasas de la familia GH107 y una región del fragmento del genoma de *Planctomycetes bacterium* CA13. La proteína codificada por las distintas secuencias se indica con flechas de colores. Blanco: proteínas hipotéticas, azul: sulfatasa, verde: fucoidanasa putativa GH107, amarillo: acetilasas, turquesa: hidrolasa putativa, rosa: elemento transportador, negro: factor transcripcional, marrón: región β-helice, violeta: α-L-fucosidasas, rojo: fucoidanasa putativa GH168 y gris: otras enzimas no relacionadas con la degradación de fucoidanos.

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

4.2.1.8. Predicción de la solubilidad en *E. coli*

La solubilidad de las proteínas expresadas es un requisito esencial para futuros estudios funcionales y estructurales. En la Tabla 4.5. se detallan las predicciones de solubilidad de las secuencias homólogas a miembros de la familia GH107, las cuales fueron obtenidas a partir de tres servidores (Soluprot, CamSol y SOLpro).

Cuatro de las secuencias (113643, 140846, 163424 y 277285) presentaron predicciones de solubilidad positiva, es decir, una alta probabilidad de obtener la proteína en forma soluble. Se observó lo contrario en las predicciones de solubilidad de la secuencia 57307, donde los valores obtenidos no superan el umbral de solubilidad positiva.

Tabla 4.5. Determinaciones de solubilidad de las secuencias metagenómicas homólogas a miembros de la familia GH107. Se utilizaron tres servidores para la predicción de la solubilidad. La letra (S) indica solubilidad de la proteína.

Secuencia	Soluprot	CamSol	SOLpro
57307	0,47	0,15	0,64
113643	6,80 (S)	7,30 (S)	0,71 (S)
140846	5,61 (S)	1,05 (S)	6,91 (S)
163424	6,40 (S)	-1,08	0,89 (S)
277285	7,30 (S)	9,05 (S)	0,58 (S)

Las diferencias observadas entre los valores obtenidos para una misma secuencia en los distintos servidores se deben a que los mismos aplican distintos algoritmos para las determinaciones (sección 2.1.4.5. de Materiales y Métodos). La predicción de solubilidad *in silico* resulta en una herramienta útil para evaluar la probabilidad de obtener una proteína soluble luego de su expresión heteróloga. Sin embargo, no necesariamente se corresponde con los resultados obtenidos luego en el laboratorio.

4.2.1.9. Selección de secuencias para su expresión heteróloga

Para la selección de secuencias a expresar de forma heteróloga se tuvieron en cuenta diversos aspectos, entre ellos: secuencias completas y que representen la diversidad observada, secuencias con múltiples evidencias sobre su posible actividad fucoidasasa (dominios y contexto genómico), como así también, aspectos relacionados

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

con su solubilidad, lo cual resulta de gran relevancia en la etapa de expresión heteróloga. En este contexto fueron seleccionadas las secuencias 57307, 113643, 277285 y 163424. A pesar de las múltiples evidencias de la posible actividad fucosidasa de la secuencia 57307, resulta interesante su expresión y posterior comparación de actividad enzimática con respecto a las tres restantes secuencias con posible actividad fucoidasasa.

4.2.2. Familia GH168

4.2.2.1. Identificación de secuencias homólogas a miembros de la familia GH168

La familia GH168 fue creada en el año 2020, contando actualmente con sólo una enzima caracterizada, FunA de *W. fucanilytica* CZ1127, y ninguna estructura determinada experimentalmente. Se aplicaron tres estrategias para la búsqueda de secuencias homólogas a enzimas de la familia GH168. En primer lugar, se diseñó un HMM utilizando las secuencias incluidas en la base de datos CAZy para dicha familia (42 secuencias en diciembre 2021) para la identificación de secuencias homólogas a enzimas de la familia GH168 en el set de datos metagenómico OR07. Las dos estrategias restantes incluyeron la búsqueda de secuencias homólogas mediante las herramientas dbCAN2 y CUPP.

A partir del HMM construido, se identificaron 22 secuencias homólogas a enzimas de la familia GH168, donde 4 de ellas se encontraban trucas en uno de sus extremos (en rojo, Tabla 4.6.). De las secuencias completas identificadas, 12 de ellas presentaron tamaños entre 300 y 490 aminoácidos, mientras que 6 secuencias tuvieron entre 500 y 1100 aa de longitud. Dado que el dominio catalítico incluye 300 aminoácidos aproximadamente, es posible que las secuencias identificadas con longitudes mayores presenten una arquitectura de multidominio.

Mediante las herramientas dbCAN2 y CUPP se identificaron 11 y 13 secuencias respectivamente (indicadas con letras a y b en Tabla 4.6.) de las ya anotadas a partir del HMM construido. El menor número obtenido de secuencias identificadas con respecto al resultado obtenido a partir del HMM se deba posiblemente a que dichas herramientas aplican umbrales más restrictivos en las búsquedas.

Los resultados obtenidos con las tres herramientas fueron evaluados a los efectos de eliminar secuencias inespecíficas o secuencias excesivamente divergentes. A

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

fin de evaluar a las secuencias identificadas, en primer lugar se modeló la estructura tridimensional utilizando la herramienta AlphaFold2, y el modelo fue posteriormente comparado con el modelo de la enzima FunA (depositada en la base de datos de AlphaFold2) mediante el servidor Dali. Se consideraron sólo aquellas identificaciones con valores del parámetro Dali Z > 20.

Tabla 4.6. Secuencias identificadas en la biblioteca metagenómica homólogas a miembros de la familia GH168 (CAZy). En rojo se indican las secuencias parciales y en negro las completas.

Secuencia	Longitud (aá)	Scaffold	Longitud del scaffold (pb)	Coordenadas de la secuencia
110136 ^{a, b}	381	Scaffold-6594_S1	35.005	(-)5462-6607
111028 ^{a, b}	183			(-)15739-16290
111029 ^b	944	Scaffold-6632_S1	28.972	(-)16300-17808
111031 ^{a, b}	378			(-)21034-22170
169931 ^b	101	Scaffold-10444_S1	37.259	(-)10971-11276
17483 ^{a, b}	400	Scaffold-669_S1	20.934	(+)18963-20165
224488 ^{a, b}	403	Scaffold-23831_S1	5.173	(+)1165-2376
234750 ^{a, b}	399	Scaffold-27849_S1	28.975	(-)7433-8632
23838 ^{a, b}	174	Scaffold-960_S1	42.655	(+)20165-20689
311218 ^{a, b}	358	Scaffold-107267_S1	2.193	(-)658-1734
342719 ^a	388	Scaffold-288757_S1	3.325	(+)1717-2883
44404 ^b	1057	Scaffold-2391_S1	15.156	(+)1-3174
85624 ^{a, b}	385	Scaffold-5674_S1	33.784	(+)7183-8340
140843 ^{a, b}	413	Scaffold-10782_S2	35.308	(+)30127-31368
158528	544			(-)21828-23462
158531	563	Scaffold-16874_S2	29.841	(-)26673-28364
158527	548			(-)20008-21654
317700	392	Scaffold-124335_S1	2.187	(+)483-1661
269024	680	Scaffold-187977_S2	23.160	(-)19632-21674
151858	623	Scaffold-14216_S2	40.180	(-)6781-8652
239223	468	Scaffold-29893_S1	4.576	(-)2749-4155
244362	442	Scaffold-32505_S1	9.531	(+)1076-2404

^a Secuencias identificadas por dbCAN2

^b Secuencias identificadas por CUPP

Los resultados de la comparación de los modelados de las secuencias putativas GH168 (AlphaFold2) y el modelo de la enzima FunA en el servidor Dali con Z > 20 se indican en la Tabla 4.7. En todos los casos, el número de residuos alineados fue cercano a 300 aminoácidos (lali, Tabla 4.7.) cuya longitud resulta similar a la del módulo propuesto como catalítico en enzimas de la familia GH168. Los porcentajes de identidad

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

bajos a intermedios (< 66 % a nivel de aminoácidos) sugieren un cierto grado de divergencia con respecto a la única enzima caracterizada de la familia GH168.

Tabla 4.7. Comparación estructural del modelado tridimensional de las secuencias putativas a enzimas de la familia GH168 contra el modelo estructural de la enzima FunA utilizando el servidor Dali. Dali Z: puntuación de Dali, RMSD: desviación de la media cuadrática, Lali: número de residuos alineados, Nres: número total de residuos, %id: identidad de secuencia.

Secuencia	Dali Z	RMSD	Lali	Nres	%id
110136	41,1	2,1	339	358	31
111031	41,8	11,5	350	378	30
140843	36,2	5,7	349	390	31
17483	54,7	6,7	392	400	53
224488	57,6	6,3	398	403	66
234750	54,8	8,7	393	399	52
311218	31,4	4,6	314	388	23
342719	28,0	2,7	314	388	23
44404	36,9	3,6	348	1057	30
85624	42,2	11,1	357	385	29
15828	26,8	3,0	304	511	16
317700	23,2	3,7	285	366	14
269024	26,1	12,1	333	680	15
151858	25,6	3,6	322	623	16
158531	26,8	13,3	334	563	15
158527	23,1	10,2	325	548	15
239223	22,7	5,0	316	468	15
244362	20,3	5,5	302	442	12

4.2.2.2. Identificación de dominios conservados y péptido señal en secuencias completas GH168 putativas

La presencia del módulo catalítico GH168 putativo fue identificado a partir de las tres herramientas anteriormente mencionadas: el perfil HMM, CUPP y dbCAN2. En la mayoría de las secuencias identificadas, el dominio GH168 putativo se encontraba próximo al extremo N-terminal. En las secuencias 44404 y 151858 (Figura 4.13.), el dominio GH168 putativo se identificó próximo al extremo C-terminal. En ambos casos las longitudes de los posibles módulos catalíticos fueron entre 245 y 375 aminoácidos.

El péptido señal fue identificado en las 18 secuencias completas y presentó longitudes entre 16 y 58 residuos. Los dominios conservados fueron identificados

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

mediante la plataforma InterProScan utilizando la base de datos Pfam. Las secuencias putativas que presentaron longitudes mayores a 500 aminoácidos contenían dominios adicionales (Figura 4.13.). La secuencia 44404 (1057 aá) presentó un dominio Beta_helix (PF132229) cercano al extremo N-terminal. Las tres secuencias identificadas en el *scaffold* 16874 (158527, 158528 y 158531) presentaron una arquitectura similar con variaciones en el número de dominios HemolysinCabind (PF00356) en la región C-terminal. Dicho dominio incluye proteínas de unión al calcio.

La secuencia 269024 (680 aá) presentó el dominio Big_7 (PF17957) adyacente al dominio GH168 putativo, el cuál representa un dominio similar a *Ig-like* presente en enzimas glucósido hidrolasas. Por otro lado, el dominio PPC (PF041151) fue identificado en la secuencia 151858 (623 aá) próximo al extremo N-terminal. De acuerdo a la información presente en el servidor Pfam, dicho dominio se encuentra comúnmente en la región C-terminal de enzimas proteasas de bacterias marinas con funciones aún desconocidas.

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidanasas

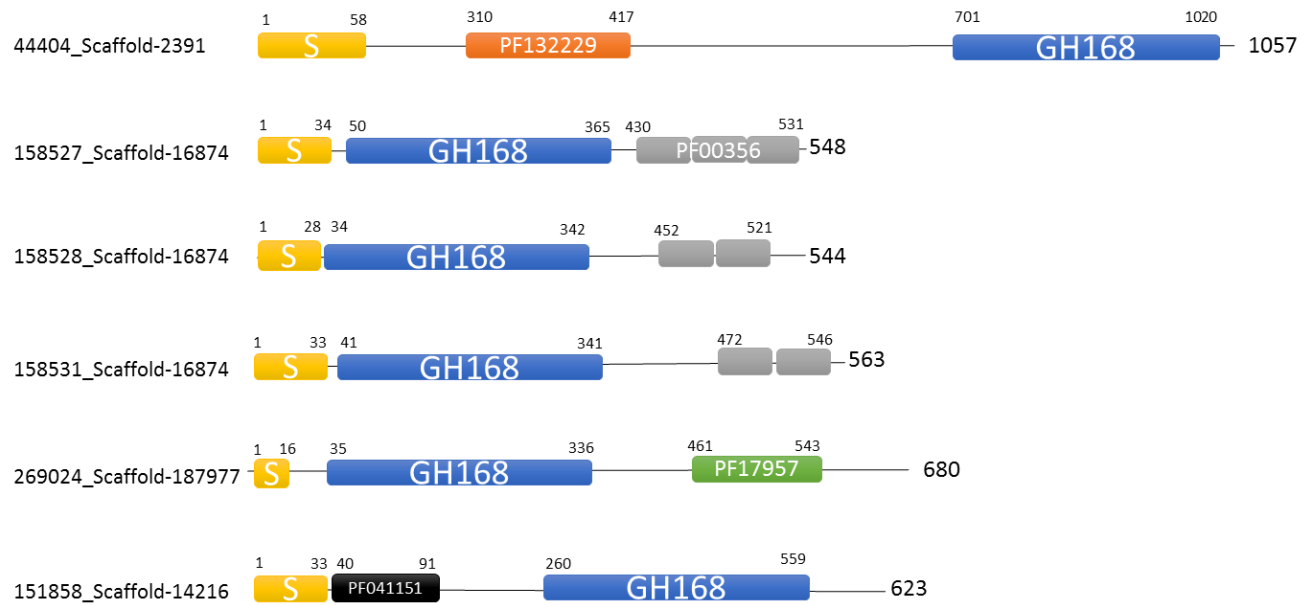


Figura 4.13. Dominios identificados en las secuencias homólogas a fucoidanasas de la familia GH168. Los dominios de color gris, negro y naranja fueron identificados a partir de la estructura primaria mediante InterProScan utilizando la base de datos Pfam. S (amarillo): péptido señal, GH168 (azul): módulo catalítico putativo, PF132229 (naranja): dominio Beta_helix, PF00356 (gris): módulo HemolysinCabind, PF17957 (verde): módulo Big_7, PF041151 (negro): dominio bacterial pre-peptidase C-terminal (PPC).

4.2.2.3. Posibles hospedadores de las secuencias identificadas

La asignación taxonómica de las secuencias completas identificadas fue realizada utilizando el programa MEGAN. La asignación fue establecida tanto en la secuencia como en el *scaffold* que la contiene, ambos a nivel de aminoácidos (Tabla 4.8.).

4. Identificación de secuencias putativas de fucoïdanasas

Tabla 4.8. Asignaciones taxonómicas de las secuencias homólogas a la familia GH168 y del *scaffold* al que pertenecen.

Nombre secuencia_ <i>Scaffold</i>	Secuencia	<i>Scaffold</i>
110136_ <i>Scaffold</i> -6594_S1	Bacteria	85 % Bacteria, 15 % Planctomycetota
111031_ <i>Scaffold</i> -6632_S1	Planctomycetota	60 % Bacteria, 40 % Planctomycetota
17483_ <i>Scaffold</i> -669_S1	Planctomycetota	44 % Bacteria, 38 % Planctomycetota, 18 % Pseudomonadota
224488_ <i>Scaffold</i> -23831_S1	Bacteroidota	100 % Bacteroidota
234750_ <i>Scaffold</i> -27849_S1	Planctomycetota	71 % Planctomycetota, 29 % Bacteria
311218_ <i>Scaffold</i> -107267_S1	Planctomycetota	*
342719_ <i>Scaffold</i> -288757_S1	Bacteria	100 % Bacteria
44404_ <i>Scaffold</i> -2391_S1	Planctomycetota	66,6 % Planctomycetota, 33,4 % Bacteria
85624_ <i>Scaffold</i> -5674_S1	Bacteria	70 % Planctomycetota, 30 % Bacteria
140843_ <i>Scaffold</i> -10782_S2	Planctomycetota	52 % Planctomycetota, 48 % Bacteria
158528_ <i>Scaffold</i> -16874_S2		
158531_ <i>Scaffold</i> -16874_S2	Actinomycetota	100 % Actinomycetota
158527_ <i>Scaffold</i> -16874_S2		
317700_ <i>Scaffold</i> -124335_S1	Planctomycetota	100 % Planctomycetota
269024_ <i>Scaffold</i> -187977_S2	Actinomycetota	100 % Actinomycetota
151858_ <i>Scaffold</i> -14216_S2	Actinomycetota	86 % Actinomycetota, 14 % Bacteria
239223_ <i>Scaffold</i> -29893_S1	Bacteria	100 % Bacteria
244362_ <i>Scaffold</i> -32505_S1	Bacteria	100 % Bacteria

* *Scaffold* sin asignar taxonómicamente, tamaño < a 3 Kb.

Un 38,8 % de las secuencias identificadas pertenecerían a organismos del *phylum* Planctomycetota, mientras que un 16,6 % a organismos del *phylum* Actinomycetota (Tabla 4.8.). Para las asignaciones taxonómicas a nivel de *scaffold*, fue indicado el porcentaje de las secuencias codificantes de dicho *scaffold* asignadas a los distintos *phyla*. Se observó un alto porcentaje de secuencias asignadas al dominio Bacteria, sugiriendo que las secuencias de la base de datos nr de NCBI incluidas en el análisis pertenecerían a distintos *phyla*, por lo que el algoritmo LCA definió la asignación taxonómica a nivel de dominio. Aún así, se observó pocas asignaciones a diferentes *phyla* entre las secuencias GH168 y los *scaffolds*.

Con respecto a las secuencias más cercanas de la base de datos nr del NCBI (realizado en septiembre de 2022), la mayoría compartieron porcentajes de identidad intermedios a altos (a nivel de aminoácidos) mayores al 57 % (Tabla 4.9.). Las secuencias 342719, 269024, 151858, 239223 y 244362 compartieron porcentajes de identidad bajos con respecto a secuencias conocidas y depositadas en la base de datos, por lo que

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

fueron las secuencias más divergentes. La mayoría de las secuencias identificadas utilizando el algoritmo blastp fueron secuencias de genomas ensamblados a partir de metagenomas (MAGs), por lo tanto provenientes de organismos no cultivados. Solo dos organismos han sido cultivados, *Aureliella helgolandensis* y *Rhodopirellula* sp. SWK7.

La mayoría de las asignaciones taxonómicas de las secuencias metagenómicas se correspondieron con el grupo taxonómico al cual pertenece el organismo aislado que contiene la secuencia más cercana (Tablas 4.8. y 4.9.).

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidanasas

Los *phyla* a los que pertenecieron las secuencias más similares depositadas en GenBank fueron Planctomycetota, Verrucomicrobiota, Bacteroidota y Actinomycetota.

Tabla 4.9. Resultados de la comparación, mediante el algoritmo blastp, de las fucoidanasas putativas, contra la base de datos de proteínas no redundante del NCBI.

Secuencia	Proteína	No. Acceso GenBank	Organismo	Phylum	% identidad	% cobertura
110136	MAG: hypothetical protein	MBK1855505	<i>Verrucomicrobiaceae</i> bacterium 5K15	Verrucomicrobiota	85,7 %	99 %
111031	MAG: hypothetical protein	MBL9189657	<i>Opitutaceae</i> bacterium	Verrucomicrobiota	72,7 %	100 %
17483	hypothetical protein	QDV25809	<i>Aureliella helgolandensis</i>	Planctomycetota	85,5 %	100 %
224488	hypothetical protein AXE80_10055	ANW97495	<i>Wenyngzhuangia fucanilytica</i>	Bacteroidota	74,0 %	91 %
234750	putative glycoside hydrolase	WP_231690833	<i>Aureliella helgolandensis</i>	Planctomycetota	88,4 %	82 %
311218	putative glycoside hydrolase	WP_009100252	<i>Rhodopirellula</i> sp. SWK7	Planctomycetota	84,0 %	100 %
342719	MAG: putative glycoside hydrolase	MCX6943081	<i>Verrucomicrobiota</i> bacterium	Verrucomicrobiota	31,2 %	88 %
44404	MAG: right-handed parallel beta-helix repeat-containing protein	MCP4197573	<i>Pseudomonadota</i> bacterium	Pseudomonadota	88,9 %	67 %
85624	MAG: hypothetical protein	HIJ54253	<i>Planctomycetota</i> bacterium	Planctomycetota	75,1 %	62 %
140843	putative glycoside hydrolase	WP_231690878	<i>Aureliella helgolandensis</i>	Planctomycetota	76,7 %	88 %
158528	MAG: calcium binding-protein	MCA0251376	<i>Actinomycetes</i> bacterium	Actinomycetota	59,6 %	20 %
158531	MAG: hypothetical protein	MBA2594600	<i>Gammaproteobacteria</i> bacterium	Pseudomonadota	61,5 %	16 %
158527	MAG: hypothetical protein	MCA1697317	<i>Actinomycetes</i> bacterium	Actinomycetota	58,4 %	20 %
317700	MAG: hypothetical protein	MBL6764337	<i>Verrucomicrobiaceae</i> bacterium	Verrucomicrobiota	57,1 %	95 %
269024	MAG: hypothetical protein	MCU1451267	<i>Acidimicrobiales</i> bacterium	Actinomycetota	43,9 %	56 %
151858	MAG: hypothetical protein	PZN27342	<i>Pseudomonadota</i> bacterium	Pseudomonadota	42,7 %	27 %
239223	MAG: hypothetical protein	TMG89321	<i>Betaproteobacteria</i> bacterium	Pseudomonadota	39,3 %	32 %
244362	MAG: hypothetical protein	TMH91973	<i>Betaproteobacteria</i> bacterium	Pseudomonadota	33,8 %	96 %

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

4.2.2.4. Análisis filogenéticos de las secuencias GH168 putativas

El análisis filogenético fue realizado a partir del alineamiento múltiple de las secuencias de los módulos catalíticos de la familia GH168 y de las secuencias putativas de fucoidasas de la familia GH168 identificadas en el metagenoma OR07.

El árbol filogenético reveló la presencia de dos agrupamientos (*clusters*), que contienen secuencias metagenómicas (en rojo, Figura 4.14.) y secuencias de referencia (en negro, Figura 4.14.), que comparten porcentajes de identidad a nivel de aminoácidos bajos a altos (entre 23 y 82 %). La secuencia metagenómica más cercana a FunA (en negrita Figura 4.14.) fue 224488, con un porcentaje de identidad de 72 %. Dicha secuencia metagenómica forma un sub*cluster* con la secuencia de la enzima FunA junto con otra secuencia de referencia proveniente de la misma especie. Ocho secuencias metagenómicas no agruparon con las secuencias de referencia.

En particular, cuatro secuencias putativas (269024, 158528, 158527 y 158531) conformaron un pequeño *cluster* bien soportado (*Cluster 3*, Figura 4.14.), siendo las secuencias putativas más divergentes con respecto a las restantes secuencias metagenómicas y a las secuencias de referencia. Dichas secuencias compartieron porcentajes de identidad ≤ 11 % (a nivel de aa) con respecto a la enzima FunA y pertenecerían a organismos del *phylum* Actinomycetota.

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas



Figura 4.14. Árbol filogenético entre las secuencias pertenecientes a la familia GH168 y las identificadas a partir de ellas por homología. En negrita se indica la única secuencia que ha sido expresada y caracterizada hasta el momento (FunA). Las secuencias metagenómicas identificadas se indican en rojo. El árbol fue construido a partir del alineamiento de los módulos catalíticos (288 aminoácidos), mediante el método de máxima verosimilitud, aplicando el modelo WAG+G+I. Se indican los valores de bootstrap > 60 % (100 replicas). La flecha azul indica las secuencias seleccionadas para su síntesis génica y expresión heteróloga.

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

4.2.2.5. Análisis estructurales de las secuencias GH168 putativas

4.2.2.5.1. Conservación de los residuos catalíticos en alineamientos múltiples

Se analizó el alineamiento que incluyó las secuencias metagenómicas identificadas y las secuencias de referencia utilizadas para su identificación. A partir de la única enzima caracterizada, se ha propuesto que un residuo de asparato (D206 de FunA) y un aminoácido de ácido glutámico (E264 en FunA) resultarían críticos para la actividad fucoidasasa (Shen *et al.*, 2020). La presencia de dichos residuos fue evaluada en las secuencias metagenómicas a partir de la visualización del alineamiento múltiple. En la Figura 4.15. se indica la sección del alineamiento que contiene a cada uno de los residuos.

Todas las secuencias metagenómicas presentaron los residuos propuestos como responsables de la actividad fucoidasasa: aspartato (D206 en FunA) y ácido glutámico (E264 en FunA). La conservación de ambos residuos constituye una evidencia de la posible actividad de las secuencias identificadas.

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidanasas

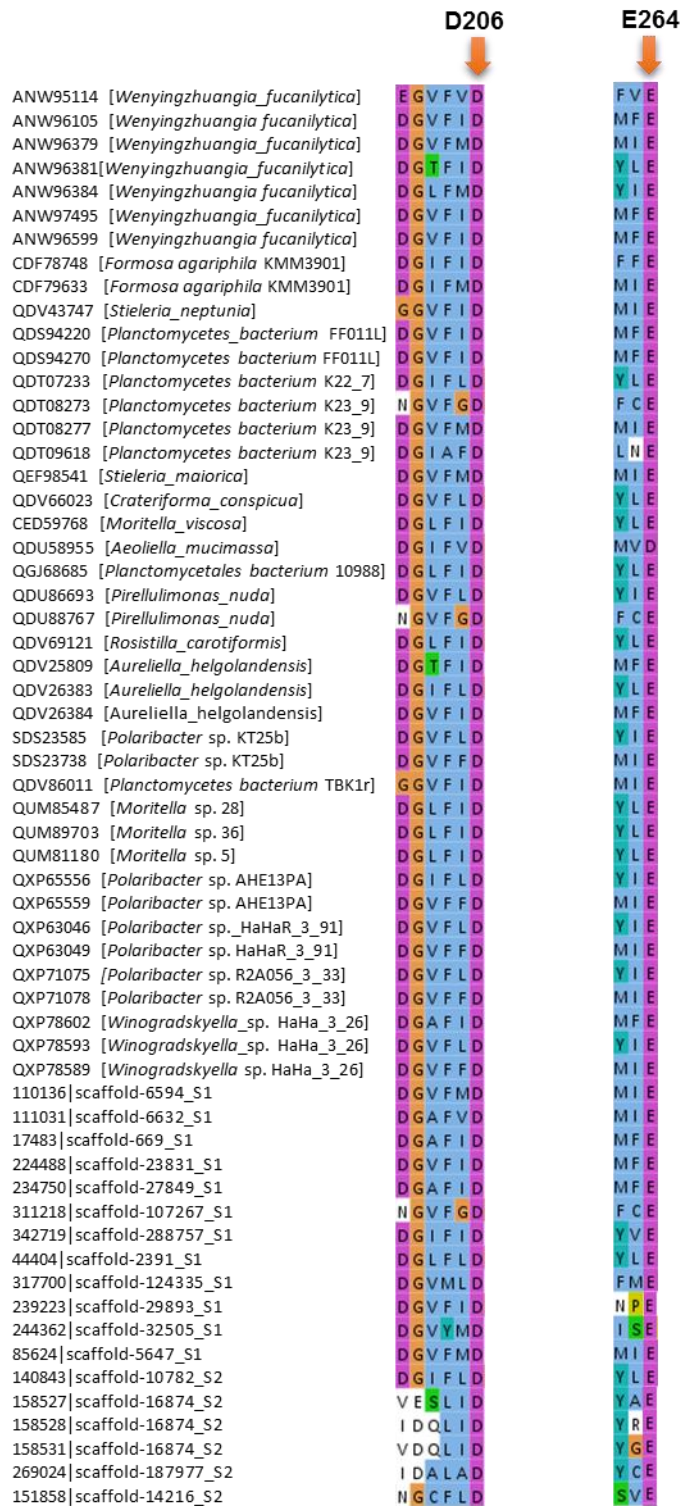


Figura 4.15. Alineamiento del módulo catalítico entre las secuencias putativas de fucoidanasas de la familia GH168 y las secuencias de referencia. A la izquierda se indica la posición del residuo ácido aspártico (D) en la posición 206 de la enzima FunA del organismo *W. fucanilytica* CZ1127 (ANW96599). A la derecha se indica la posición del residuo ácido glutámico (E) en la posición 264 de la enzima FunA.

4.2.2.5.2. Modelado de la estructura tridimensional

Hasta el momento, no existen en la base de datos PDB estructuras tridimensionales determinadas experimentalmente de enzimas fucoidanasas que conforman la familia GH168. El modelo de la única enzima caracterizada (FunA de *W. fucanilytica* CZ1127, Shen *et al.*, 2020) se encuentra depositado en el sitio AlphaFold2

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

(<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/A0A1B1Y779>). Esta familia presenta como potencial estructura a un plegado $(\beta/\alpha)_8$ (<http://www.cazy.org/GH168.html>), predicha a partir su modelado (Figura 4.16.). Además de este dominio, puede observarse un pequeño dominio con un plegado de tipo lámina beta antiparalela en el extremo C-terminal (marcado con un rectángulo negro en la Figura 4.16.).

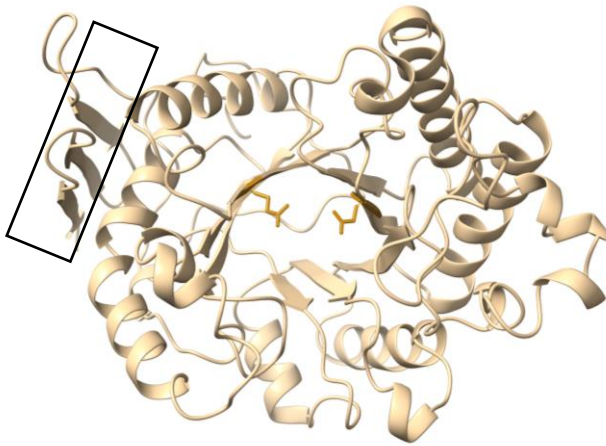


Figura 4.16. Modelo estructural de la enzima FunA. El rectángulo negro indica el dominio con un plegado de tipo lámina beta antipararela en el extremo C-terminal.

Este dominio también se observa en los modelos de las secuencias metagenómicas generados en AlphaFold2 (rectángulo negro, Figura 4.17.). Las estructuras tridimensionales obtenidas complementan los resultados de la arquitectura modular descrita anteriormente (sección 4.2.2.2., Figura 4.13.). En la Figura 4.17., los modelos obtenidos se indican en el modo *rainbow* (azul a rojo, N- a C-terminal).

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidanasas

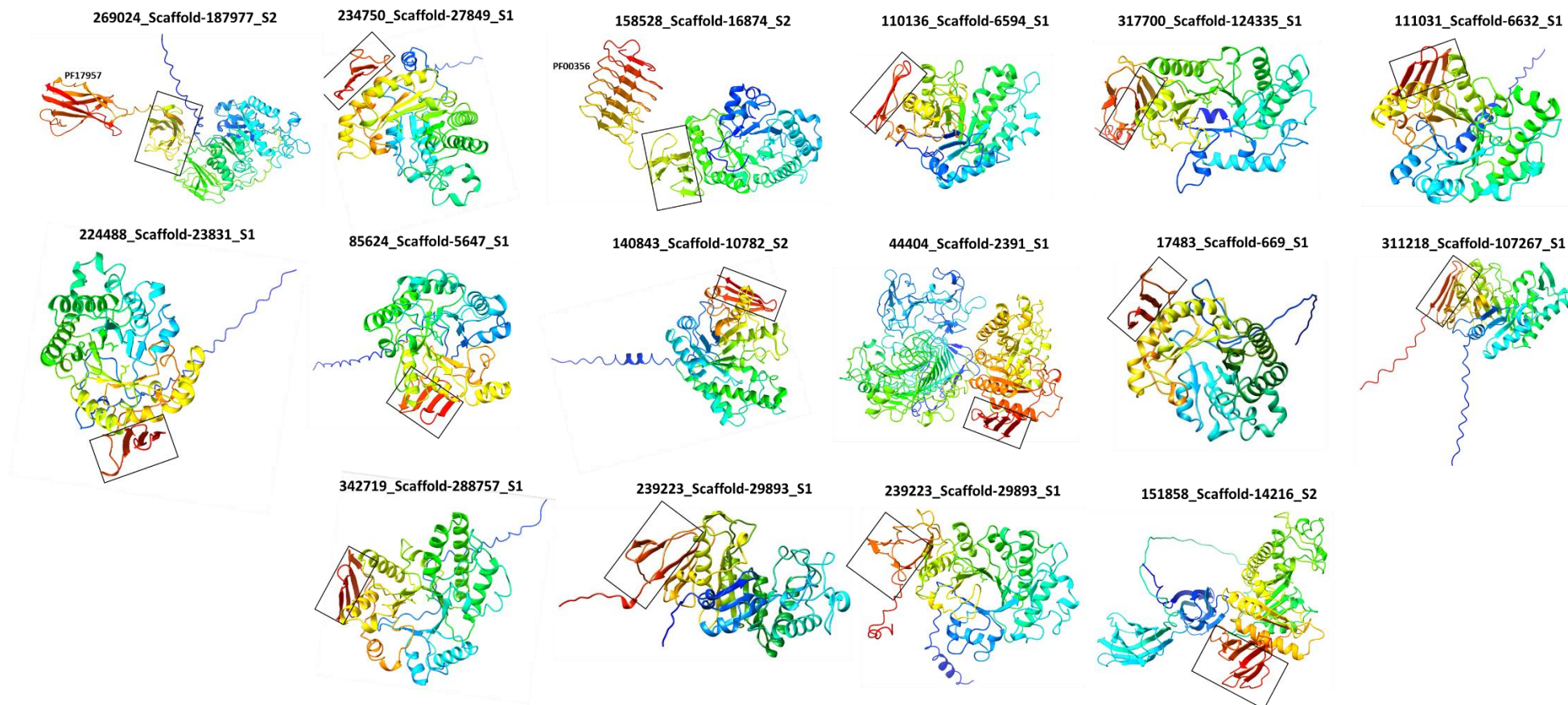


Figura 4.17. Modelado tridimensional mediante AlphaFold2 de las secuencias putativas a fucoidanasas de la familia GH168. Los modelos fueron visualizados en UCSF Chimera utilizando el modo rainbow (azul a rojo, N- a C-terminal). El rectángulo negro indica el dominio con un plegado de tipo lámina beta antiparalela en el extremo C-terminal ó próximo al mismo.

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidanasas

4.2.2.6. Determinación del contexto genómico de las secuencias GH168 putativas

A partir de la anotación funcional de las secuencias codificantes predichas en el *scaffold* que contiene a las secuencias putativas, se evaluó la presencia de genes potencialmente involucrados en el metabolismo y asimilación de los fucoidanos. Se identificaron genes relacionados en el contexto genómico de los *scaffolds* 6594, 6632, 669, 23831, 27849, 5674 y 10782 (Tabla 4.10.). La mayoría de los genes más lejanos a la secuencia putativa correspondieron a proteínas hipotéticas, mientras que los genes próximos correspondieron a genes que codificarían para enzimas sulfatasas o fucosidasas. Tal como se ha indicado anteriormente, el *scaffold* 10782 además de contener genes que codificarían para enzimas sulfatasas y fucosidasas, presenta secuencias putativas de enzimas fucoidanasas pertenecientes a ambas familias (GH107 y GH168).

Tabla 4.10. Genes relacionados al metabolismo de fucoidanos identificados próximos a la secuencia putativa de fucoidanasas de la familia GH168.

<i>Scaffold</i>	Sulfatasas	α -L-fucosidasas	Secuencia putativa GH168	Secuencia putativa GH107
<i>Scaffold</i> -6594_S1	3		1 (110136)	
<i>Scaffold</i> -6632_S1	1	2	3 (11028, 11029 y 11031)	
<i>Scaffold</i> -669_S1		1	1 (17483)	
<i>Scaffold</i> -23831_S1	1		1 (224488)	
<i>Scaffold</i> -27849_S1	1		1 (234750)	
<i>Scaffold</i> -107267_S1			1 (311218)	
<i>Scaffold</i> -288757_S1			1 (342719)	
<i>Scaffold</i> -2391_S1			1 (44404)	
<i>Scaffold</i> -5647_S1	1		1 (85624)	
<i>Scaffold</i> -10782_S2	5	1	1 (140843)	1 (140846)
<i>Scaffold</i> -16874_S2			3 (158527, 158527, 158531)	
<i>Scaffold</i> -124335_S1			1 (317700)	
<i>Scaffold</i> -187977_S2			1 (268024)	
<i>Scaffold</i> -14216_S2			1 (151858)	
<i>Scaffold</i> -29893_S1			1 (239223)	
<i>Scaffold</i> -32505_S1			1 (244362)	

4.2.2.7. Predicción de la solubilidad en *E. coli*

Las predicciones de solubilidad para las secuencias putativas a enzimas de la familia GH168 se indican en la Tabla 4.11. Las determinaciones fueron obtenidas a partir de tres servidores (Soluprot, CamSol y SOLpro). Nueve secuencias resultaron ser

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

potencialmente solubles en *E. coli* (en negrita, Tabla 4.11.), coincidiendo dicho resultado en los tres servidores aplicados. Para las restantes secuencias existieron discrepancias en los resultados obtenidos por lo que no se puede concluir acerca de su posible solubilidad.

Tabla 4.11. Predicción de solubilidad de las secuencias metagenómicas homólogas a fucoidasas de la familia GH168. Se utilizaron tres servidores para las predicciones de solubilidad. La determinación de proteína soluble se indica con (S). Las secuencias indicadas en negrita presentan alta probabilidad de ser solubles a ser expresadas en *E. coli*.

Secuencia	Soluprot	CamSol	SOLprot
110136_Scaffold-6594_S1	0,64 (S)	0,81 (S)	0,66 (S)
111031_Scaffold-6632_S1	0,50 (S)	0,56 (S)	0,76 (S)
17483_Scaffold-669_S1	0,36	0,45	0,55 (S)
224488_Scaffold-23831_S1	0,52 (S)	0,61 (S)	0,58 (S)
234750_Scaffold-27849_S1	0,37	0,47	0,53 (S)
311218_Scaffold-107267_S1	0,28	0,77 (S)	0,67 (S)
342719_Scaffold-288757_S1	0,28	1,06 (S)	0,58 (S)
44404_Scaffold-2391_S1	0,39	0,25	0,87 (S)
85624_Scaffold-5674_S1	0,70 (S)	0,83 (S)	0,67 (S)
140843_Scaffold-10782_S2	0,55 (S)	0,76 (S)	0,55 (S)
158528_Scaffold-16874_S2	0,53 (S)	1,44 (S)	0,55 (S)
158531_Scaffold-16874_S2	0,55 (S)	1,03 (S)	0,59 (S)
158527_Scaffold-16874_S2	0,42	1,23 (S)	0,58 (S)
317700_Scaffold-124335_S1	0,57 (S)	1,91 (S)	0,83 (S)
269024_Scaffold-187977_S2	0,53 (S)	1,12 (S)	0,64 (S)
151858_Scaffold-14216_S2	0,49	0,34	0,72 (S)
239223_Scaffold-29893_S1	0,44	0,86 (S)	0,57 (S)
244362_Scaffold-32505_S1	0,48	1,11 (S)	0,61 (S)

4.2.2.8. Selección de secuencias para su síntesis génica y expresión heteróloga

A diferencia de las secuencias identificadas a partir de enzimas de la familia GH107, cuyos genes fueron amplificados y clonados, en este caso las secuencias seleccionadas fueron sintetizadas para su posterior expresión heteróloga. Esto

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

constituye una línea de investigación a desarrollar a futuro. Para la selección de secuencias a sintetizar se tuvieron en cuenta diversos aspectos, entre ellos: secuencias completas con arquitectura multidominio simple, y que representen la diversidad encontrada. Además, se evaluaron evidencias de su posible actividad fucoidasa y su alta probabilidad de ser solubles en *E. coli*.

Las secuencias seleccionadas fueron 110136, 140843, 158528 y 317700 (indicadas con una flecha azul en la Figura 4.14.). Las mismas comparten bajos porcentajes de identidad (< 31 % a nivel de aminoácidos) con respecto a la enzima FunA y pertenecerían a *phyla* en los que no se han caracterizado enzimas fucoidasas (Planctomycetota y Actinomycetota).

Resulta de especial interés la secuencia 140843 y el *scaffold*-10782 que la contiene, dado que en su contexto genómico fueron identificadas secuencias putativas de enzimas fucoidasas de ambas familias (Figura 4.11.), como así también secuencias con potencial actividad relacionada al metabolismo de fucoanos, incluyendo α -L-fucosidasas (una secuencia) y sulfatasas (cinco secuencias).

4.3. DISCUSIÓN

Las enzimas fucoidasas son glicósido hidrolasas que catalizan la despolimerización de fucoanos mediante la escisión de enlaces internos α -(1→3)- ó α -(1→4)- de las moléculas de fucoanos (Tran *et al.*, 2022). En la actualidad, las enzimas endo- α -(1→4)-L-fucoidasas sólo han sido identificadas en miembros de la familia glicósido hidrolasa 107 (GH107), mientras que las endo- α -(1→3)-L-fucoidasas se encuentran dentro de las familias GH107, GH168 y GH174 (Lombard *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2023). A diferencia de la familia GH107 (Colin *et al.*, 2006), las familias GH168 y GH174 han sido recientemente descritas (Shen *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2023), siendo por ello que la búsqueda y análisis de secuencias homólogas a la familia GH168 pudo ser realizada a partir del año 2020, mientras que la identificación de homólogos a miembros de la familia GH174 no fue incluida en este trabajo de tesis doctoral dada su más reciente creación. Esta es una limitación en el uso del *set* de datos genómicos o metagenómicos para la identificación de secuencias, donde no es posible identificar familias completamente nuevas de enzimas, lo cual requiere de la utilización

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidanasas

de metodologías funcionales (Lozada y Dionisi, 2015). Las familias CAZy GH107 y GH168 contienen pocos miembros, cuando son comparadas con otras familias de GH, y aún no han sido estudiadas en detalle. Además, es poco lo que se conoce sobre los microorganismos marinos que contienen dichas enzimas, y las rutas que utilizan para la asimilación de estos compuestos.

Debido a la imposibilidad de cultivar la mayoría de los microorganismos marinos, resulta indispensable el uso de estrategias metagenómicas para acceder al potencial metabólico de los microorganismos aún no cultivables ó de difícil cultivo (Oulas *et al.*, 2015). En el laboratorio de Microbiología Ambiental, se construyó un *set* de datos metagenómicos, que consistió en el clonado de fragmentos de ADN proveniente de una muestra de sedimento intermareal de Bahía Ushuaia en fósidos (Loviso *et al.*, 2015; Giubert *et al.*, 2016). El *set* de datos fue generado a partir de la secuenciación al azar de los fósidos de la biblioteca metagenómica, eliminándose previo al ensamblado las lecturas que contenían secuencias del vector (Guibert *et al.*, 2012; Loviso *et al.*, 2015). Si bien la estrategia más comúnmente utilizada es la secuenciación al azar de ADN purificado de la muestra ambiental sin su previo clonado, esta biblioteca metagenómica había sido construída en el año 2010, previo al acceso de tecnologías de secuenciación en gran escala. Dada la gran diversidad de las comunidades microbianas que habitan en los sedimentos, consideradas similares a las de suelos, la secuenciación al azar directa resultó en fragmentos ensamblados de muy corto tamaño, con una mayoría de secuencias parciales (Espínola *et al.*, 2018). En cambio, al secuenciar la biblioteca metagenómica el ensamblado resultó en fragmentos de mayor tamaño con una mayoría de secuencias completas (Calderoli *et al.*, 2018; Dionisi *et al.*, 2023; Galván *et al.*, 2023). Es importante notar, sin embargo, que el clonado y posterior secuenciación de los fósidos de la biblioteca resultó en una pérdida de diversidad y probablemente ha introducido desvíos sobre la comunidad microbiana del sedimento muestreado.

A fin de identificar secuencias putativas de enzimas fucoidanasas en dicho *set* de datos, se utilizó una estrategia basada en la búsqueda de secuencias homólogas a miembros de las familias GH107 y GH168, incluyendo secuencias distantes por medio de la construcción de HMMs y la utilización de herramientas para la anotación de CAZymes (Zhang *et al.*, 2018; Barrett *et al.*, 2020). Se generaron alineamientos múltiples

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

a partir de las secuencias de enzimas fucoidasas pertenecientes a las familias CAZy mencionadas, los que subsecuentemente fueron usados para construir perfiles HMM. La construcción de perfiles HMM resulta una de las herramientas más utilizadas para la búsqueda de secuencias homólogas distantes (Byung-Jun, 2009). Este método permitió la identificación de secuencias putativas de fucoidasas a partir de esta comunidad microbiana, expuesta a condiciones extremas y a frecuentes depósitos de biomasa de algas pardas (Dionisi *et al.*, 2011; Lozada *et al.*, 2023). Esta estrategia permite utilizar *sets* de datos metagenómicos que han sido generados con otros fines. Sin embargo, las principales limitaciones se encuentran relacionadas a los pocos estudios existentes sobre enzimas fucoidasas y más aún al reducido número de enzimas caracterizadas (Cao *et al.*, 2018; Qiu *et al.*, 2022).

Es esperable que la calidad de un modelo HMM se encuentre significativamente influenciada por el alineamiento múltiple inicial, tal como se ha discutido anteriormente en otros trabajos (Sonnhammer *et al.*, 1998; Gacesa *et al.*, 2018; Kamble *et al.*, 2018), viéndose afectado en mayor grado cuando las secuencias utilizadas resultan muy divergentes. Una de las principales limitaciones es la necesidad de contar con una diversidad de secuencias de las familias analizadas que permita construir modelos estadísticos robustos a partir del alineamiento múltiple de las secuencias. En este contexto, ambos perfiles construidos pudieron haber resultado poco abarcativos debido al bajo número de secuencias que lo definieron, dando lugar a una subestimación de la diversidad real de secuencias homólogas presentes en el *set* de datos. El número de secuencias de enzimas fucoidasas para ambas familias resulta extremadamente bajo cuando se compara con el número de secuencias que contienen otras familias GH, donde la mayoría de ellas (aproximadamente un 70 %) contienen más de 500 secuencias (Drula *et al.*, 2022).

Se realizaron una serie de análisis *in silico*, tanto de las secuencias homólogas de enzimas fucoidasas identificadas en el *set* de datos metagenómico, como de los fragmentos ensamblados donde fueron identificadas. Uno de los análisis realizados fue la asignación taxonómica de las secuencias, a fin de obtener información sobre el posible grupo taxonómico al cual pertenecerían los microorganismos que contienen las secuencias identificadas. Las bacterias que degradan los polisacáridos de algas son

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

actores clave en el ciclo del carbono, en particular en los ambientes costeros, a partir del reciclaje del carbono fijado por las algas (Martin *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2020). Se ha reportado que parte de la biomasa generada por las macroalgas es enterrada en sedimentos (Arnosti, 2014; Krause-Jensen *et al.*, 2018), lo cual resulta en una importante fuente de carbono para los microorganismos allí presentes. En este contexto, resulta esperable que las enzimas fucoidasas sean abundantes en los microorganismos que habitan en los ambientes costeros con alta biomasa de algas pardas, en particular en los sedimentos. Los principales *phyla* bacterianos asociados a macroalgas son Bacteroidota, Pseudomonadota, seguido por Firmicutes, Actinomycetota, Verrucomicrobiota y Planctomycetota (Goecke *et al.* 2013, Sichert *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2023). Estos reportes son consistentes con aquellos obtenidos en el análisis de la estructura de la comunidad microbiana de la muestra OR07 a partir de la cual se construyó la biblioteca metagenómica, donde se obtuvieron las siguientes abundancias relativas en dichos grupos taxonómicos (basado en la secuenciación de fragmentos del gen ARNr 16S): 42,06 % Pseudomonadota, 19,02 % Bacteroidota, 14,55 % Actinomycetota, 10,13 % bacteria (sin asignar), 6,63 % Acidobacteriota, 4,23 % Planctomycetota y 1,80 % Verrucomicrobiota (Lozada, M. comunicación personal).

Los organismos pertenecientes a la familia Flavobacteriaceae (*phylum* Bacteroidota), son considerados especialistas en la degradación de distintos polisacáridos de algas, mediante el uso de diversas enzimas activas sobre carbohidratos complejos (Zhang *et al.*, 2019). Sin embargo, la mayoría de las secuencias identificadas en este trabajo de tesis pertenecerían a organismos del *phylum* Planctomycetota. Este *phylum* resulta de especial interés dado su rol clave en distintos procesos de los ciclos biogeoquímicos, tales como la oxidación anaeróbica de amonio, oxidación del metano y en la participación en el ciclo del carbono mediante la degradación de carbohidratos complejos presentes en sedimentos marinos (Glöckner *et al.*, 2003; Rusch, 2007). Estos organismos forman parte del *superphylum* PVC, que incluye a los *phyla* Planctomycetota, Verrucomicrobiota, Chlamydiota, Omnitrophota y Auribacterota entre otros (Wagner y Horn, 2006; Parks *et al.*, 2022). Hasta el momento no se ha reportado la caracterización de enzimas fucoidasas pertenecientes a organismos del *superphylum* PVC. Los resultados de este capítulo muestran que bacterias del *phylum*

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

Planctomycetota con el potencial para degradar fucoídos se encuentran presentes en los sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia, donde los fucoídos podrían representar una fuente de carbono y energía para dichos organismos. Por otro lado, parte de las secuencias homólogas a miembros de la familia GH168, fueron asignadas a bacterias del *phylum* Actinomycetota, grupo taxonómico en el que tampoco se han caracterizado enzimas fucoidasas.

Las asignaciones taxonómicas se realizaron a nivel de *phylum* dado que la calidad de la predicción depende directamente de la calidad de la base de datos utilizada, la cual suele estar sesgada a determinados grupos de microorganismos de más fácil cultivo o de interés médico. Por lo tanto, los genomas de especies novedosas ó aún no cultivadas, no estarían bien representados en las base de datos de referencia (Sharma *et al.*, 2012). Sin embargo, el incremento en la disponibilidad de genomas generados por métodos independientes del cultivo (por ejemplo MAGs: *metagenome-assembled genomes*) esta disminuyendo dicho sesgo. De igual manera, la base de datos CAZy esta incorporando secuencias de organismos no cultivados, si bien las mismas resultan minoritarias. Una situación similar ocurre en las anotaciones funcionales de los fragmentos genómicos que contienen a las secuencias identificadas, donde la asignación de la función de los genes se encuentra determinada por homología de secuencias con respecto a genes ya conocidos (Hunter *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013). Los genes novedosos podrían no presentar una anotación funcional correcta o bien, haber sido anotados como proteínas hipotéticas. Particularmente en el caso de los genes implicados en el metabolismo de los fucoídos, los *clusters* de genes involucrados no han sido completamente caracterizados, siendo probable que la mayoría de los genes aún sean desconocidos.

La identificación del péptido señal sugiere que la proteína es secretada al periplasma o al exterior de la célula, característica que resulta necesaria para la degradación de las moléculas de fucoído, constituyendo una evidencia de la posible actividad fucoidasa. Dado que no existen dominios específicos de enzimas fucoidasas definidos en base de datos como InterPro o CDD (*Conserved Domain Database* del NCBI), se realizó la identificación de los dominios presentes en la estructura primaria de las secuencias putativas y en su estructura tridimensional. Estos resultados, además de brindar evidencias de la posible función de las secuencias

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidanasas

putativas, también complementan la información obtenida a partir de las asignaciones taxonómicas. Por ejemplo, en dos secuencias putativas de enzimas GH107 se identificó el dominio SHD1, el cuál es similar al subdominio HSS que se encuentra frecuentemente en miembros del superphylum PVC (Ferrelli *et al.*, 2023). Por otro lado, en la secuencia putativa 163424 se predijó la presencia del módulo PSS, el cual constituye un sistema de secreción C-terminal característico de bacterias del phylum Bacteroidota (Zueva *et al.*, 2020; Vuillemin *et al.*, 2020). El mismo ha sido encontrado en dicha región en varias enzimas fucoidanasas de la familia GH107, entre ellos: Mef2, FcnA, FWf1, FWf2, Fwf3, Fwf4, Fhf1 y FFA2 (Zueva *et al.*, 2020) todas ellas pertenecientes a organismos del phylum Bacteroidota. Otro de los dominios identificados en la región C-terminal fue un posible CBM en la secuencia 289547. Los CBM se han encontrado en secuencias de enzimas fucoidanasas aunque no se considera que este implicado directamente con la actividad catalítica (Tran *et al.*, 2022).

Las secuencias homólogas a miembros de la familia GH168 con longitudes mayores a 500 aminoácidos también presentaron una arquitectura de multidominio. En las secuencias 158527, 158528 y 158531, todas contenidas dentro del scaffold 17864, se observaron entre 2 y 3 dominios de proteínas de adhesión celular dependientes de calcio (HemolysinCabind) cercanos la región C-terminal (Sanchez-Magraner *et al.*, 2007). Si bien, se han reportado dominios de unión al Ca^{2+} en enzimas de la familia GH107 (Vickers *et al.*, 2018; Schultz-Johansen *et al.*, 2018), no así en la única enzima caracterizada de la familia GH168 (Shen *et al.*, 2020). Por otro lado, se identificaron dominios que podrían estar relacionados al tipo de plegamiento $(\beta/\alpha)_8$ barril (AlphaFold2, A0A1B1Y779) que adoptan las enzimas de la familia GH168. El primero llamado *Beta_helix* forma parte de una superfamilia de proteínas que contienen una hélice beta (Jenkins *et al.*, 1998), mientras que el segundo, llamado *PPC* comúnmente encontrado en la región C-terminal, en la secuencia 151858 se observó próximo al extremo N-terminal y consiste en un dominio del tipo β sandwich (Huang *et al.*, 2017). El dominio *Big_7* (*Bacterial Ig domain*), identificado en la secuencia 269024 (probablemente perteneciente a un organismo del phylum Actinomycetota), representa un dominio similar a *Ig-like* presente en otras enzimas glicósido hidrolasas (Pfam: PF17957).

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

Los análisis filogenéticos, realizados bajo el principio de máxima verosimilitud considerando sólo la región correspondiente al módulo catalítico, revelaron una gran diversidad en las secuencias identificadas a pesar del bajo número de secuencias identificadas. Tanto en el caso de las enzimas fucoidasas putativas a la familia GH107 como GH168, se observó la presencia de secuencias en múltiples clados, lo cual muestra la diversidad existente dentro de las secuencias que conforman dichas familias (Zueva *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2021; Shen *et al.*, 2020). En el caso de la familia GH107, la mayoría de las secuencias identificadas estuvieron más cercanamente relacionadas con sólo tres secuencias de la familia. En el caso de la familia GH168, se identificó un mayor número de secuencias con distintos grados de distancia a las secuencias de referencia, por lo que fue necesario realizar un análisis estructural detallado para su inclusión como GH168 putativa. El análisis filogenético mostró que la diversidad de secuencias incluidas luego de este análisis excedió a la diversidad contenida en la familia CAZy.

A fin de aportar evidencias sobre la posible función de las secuencias homólogas a ambas familias identificadas en el *set* de datos metagenómico, se aplicó un enfoque *in silico* basado en el análisis de los fragmentos ensamblados a fin de identificar genes cercanos relacionados con la degradación de fucoidasas. Dada la estructura variable de los fucoidasas, se requiere de la acción de varias enzimas con diferentes especificidades durante el proceso de despolimerización (Zueva *et al.*, 2020). Además, es posible que los organismos contengan enzimas para la despolimerización de fucoidasas de distintas especies. Es por esto que resulta esperable que los microorganismos presenten un sistema especializado de degradación que incluya varias enzimas fucoidasas, fucosidasas y sulfatasas, y genes relacionados con el transporte de los productos resultantes de la degradación y su procesamiento dentro de la célula (Zhu *et al.*, 2021; Zueva *et al.*, 2020). Los genes que codifican para enzimas sulfatasas fueron abundantes en el contexto genómico de las secuencias putativas de fucoidasas en ambas familias. Sin embargo, no se observó un patrón de organización génica conservado entre los fragmentos genómicos que contienen las secuencias de fucoidasas putativas. Se observó que los genes putativos de enzimas sulfatasas se encontraban mayormente en fragmentos genómicos que pertenecerían a organismos del *phylum* Planctomycetota. Este resultado es consistente con los numerosos reportes sobre el alto número de

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

enzimas sulfatasas y su alta diversidad en el genoma de organismos del superphylum PVC (Vliet *et al.*, 2019). Un claro ejemplo es el del organismo marino *R. baltica* SH1, donde se han identificado 110 genes de enzimas sulfatasas (Glockner *et al.*, 2003). Recientemente se identificaron 284 enzimas putativas activas sobre fucoanos, incluidas cuatro secuencias que codificarían para enzimas fucoidasas de la familia GH107, en el genoma del microorganismo *Lentimonas* sp. CC4, perteneciente al phylum Verrucomicrobiota (Sichert *et al.*, 2020).

Las enzimas fucoidasas, al igual que otras enzimas glicósido hidrolasas que actúan mediante un mecanismo de retención, requieren de un residuo ácido/base (aceptor o donante de protones), y un residuo que actúe como nucleófilo para su actividad catalítica (Voung *et al.*, 2010). Estos residuos proporcionan grupos reactivos que promueven la catálisis (Holliday *et al.*, 2019). La histidina es el residuo catalítico con función ácido/base más común de esta clase, encontrándose en segundo lugar el aminoácido aspartato (Holliday *et al.*, 2019). En las enzimas fucoidasas pertenecientes a la familia GH107, se ha propuesto que el aminoácido histidina actúa como ácido/base mientras que el residuo de aspartato actúa como nucleófilo (Vickers *et al.*, 2018). En miembros de la familia GH168 aún no se han identificado los residuos que actuarían como nucleófilo y como ácido/base, si bien estudios de mutaciones puntuales realizados por Shen y colaboradores (2020) indicaron que los residuos de D206 y E264 en FunA son críticos para la actividad enzimática.

En enzimas de la familia GH107, la conservación de los cuatro residuos que conforman el subsitio -1 (implicados en el reconocimiento del sustrato), resulta aún complejo, dado que la diversidad identificada en uno de los residuos ha sido relacionada con la especificidad de enlace $\alpha(1\rightarrow3)$ - ó $\alpha(1\rightarrow4)$ - (Tran *et al.*, 2022), sin embargo dicha hipótesis aún carece de robustez debido al escaso conocimiento sobre la relación entre la estructura y la función en enzimas de esta familia.

El modelado de la estructura tridimensional de las secuencias identificadas también proporciona información sobre la posible función de dicha enzima, incluyendo la estructura del módulo catalítico compatible con la familia en estudio. Además, permite determinar el grado de conservación de los residuos catalíticos propuestos, de forma más precisa que el alineamiento de secuencias, donde la presencia de *gaps* en el

4. Identificación de secuencias putativas de fucoidasas

alineamiento puede afectar dicho análisis. La predicción de la estructura fue realizada mediante similitud de secuencias (ó modelado comparativo) con estructuras previamente conocidas y depositadas en la base de datos PDB ó en AlphaFold2. Este último realiza predicciones de la estructura tridimensional mediante algoritmos basados en *Deep learning* (Jumper *et al.*, 2021). El análisis de los modelos obtenidos indican una característica común, los mismos abarcaron la región correspondiente al módulo propuesto como catalítico, con una longitud promedio de 300 aminoácidos (Colin *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2018; Vickers *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2020; Zueva *et al.*, 2020). En dicha región fueron identificados los residuos propuestos como catalíticos y aquellos implicados en el reconocimiento del sustrato (en el caso de secuencias homólogas a miembros de la familia GH107). Este análisis permitió además identificar con mayor precisión la compleja arquitectura multidominio presente en algunas de las secuencias identificadas.

Los resultados obtenidos a partir de las distintas evidencias fueron considerados para la selección de secuencias a expresar de forma heteróloga, donde se priorizó la selección de secuencias que presenten bajo porcentaje de identidad con secuencias ya conocidas y que pertenezcan a organismos para los que no se han caracterizado enzimas fucoidasas, como así también que contengan en su contexto genómico genes asociados al metabolismo de los fucoidos y que sean potencialmente solubles en *E. coli*. En este contexto, cuatro secuencias homólogas a miembros de cada familia fueron seleccionadas para su expresión heteróloga. Dado que la familia GH168 constituye una familia de *CAZymes* de muy reciente formación, las secuencias seleccionadas serán analizadas en posteriores estudios no incluidos en esta tesis.

5. CLONADO, EXPRESIÓN HETERÓLOGA Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS FUCOIDANASAS

5. Clonado, expresión heteróloga y purificación

5.1. INTRODUCCIÓN

La expresión heteróloga de genes en *E. coli* a menudo constituye el primer paso para la caracterización de enzimas con potencial interés biotecnológico (Wolf y Ninnemann, 1995). La producción de una proteína recombinante requiere de una serie de pasos integrados que inician con la amplificación o síntesis del gen de interés, su clonado en un vector de expresión, la transformación del microorganismo huésped seleccionado con dicha construcción y la inducción de la expresión del gen para finalmente obtener el producto de interés mediante su purificación (Francis y Page, 2010). Por lo general, en dichas etapas suelen presentarse dificultades que pueden afectar tanto el nivel de expresión como el grado de solubilidad y actividad de la proteína expresada, por lo que resulta necesario una etapa de optimización de los pasos individuales del proceso (Kim *et al.*, 2020).

Bajo condiciones de sobre-expresión, la proteína recombinante puede producirse en forma soluble o encontrarse en la fracción insoluble (como cuerpos de inclusión). Durante la producción de la proteína puede ocurrir un incorrecto plegamiento provocando su agregación y acumulación, dificultando su posterior purificación (Pelliza *et al.*, 2018). Dentro de los factores que más influyen en el nivel de expresión y en la solubilidad es el uso de codones del organismo (Gustafsson *et al.*, 2004; Siddhartha Sankar *et al.*, 2016). Aunque el código genético es redundante, los codones sinónimos para el mismo aminoácido no se utilizan con la misma frecuencia en los distintos genomas. Esto puede minimizarse por medio de la selección de un huésped adecuado para la expresión de la proteína de interés, en donde no existan grandes discrepancias con respecto al uso de codones. Por otro lado, se han diseñado diversas cepas de *E. coli* para mejorar la expresión de proteínas que contienen codones poco frecuentes en el huésped (Fathi-Roudsari *et al.*, 2016). Dichas cepas han sido utilizadas para sobre-expresar enzimas fucoidanasas, favoreciendo el plegamiento y la solubilidad de las proteínas (Silchenko *et al.*, 2016). Alternativamente, el uso de codones del gen puede ser cambiado a través de su optimización y síntesis (Gustafsson *et al.*, 2004).

Dentro de las dificultades reportadas en el proceso de expresión heteróloga de enzimas fucoidanasas, además de la formación de cuerpos de inclusión (Schultz-Johansen *et al.*, 2018; Colin *et al.*, 2006), se encuentran: el bajo rendimiento de la

5. Clonado, expresión heteróloga y purificación

proteína de interés debido a degradaciones espontáneas (Cao *et al.*, 2018) y baja pureza de la proteína purificada (Cao *et al.*, 2018). Se han aplicado diversas estrategias para resolver estos problemas, entre ellas, el aumento de la estabilidad de la proteína heteróloga a partir del truncado de determinados dominios. Esta estrategia fue aplicada en las enzimas FcnA, Fda1 y Fda2, donde en la primera se eliminó la región C-terminal y en las dos restantes el dominio LamG, dado que no formaban parte del dominio catalítico GH107 (Cao *et al.*, 2018). Modificaciones en los parámetros de crecimiento e inducción y en las condiciones de lisis celular, son algunos de las otras condiciones que han sido optimizadas para favorecer la solubilidad de la proteína de interés y evitar la formación de cuerpos de inclusión. Sin embargo, dichas modificaciones no han sido efectivas en la expresión heteróloga de tres enzimas fucoidanasas, donde la estrategia aplicada se basó en el aislamiento y solubilización de los cuerpos de inclusión (Schultz-Johansen *et al.*, 2018). El proceso de obtención de una proteína activa a partir de cuerpos de inclusión suele ser laborioso y los rendimientos son a menudo muy bajos (Singh *et al.*, 2015). Es por esto, que prevenir esta etapa y optimizar todos los parámetros involucrados en el proceso de expresión resulta ser más conveniente.

En este capítulo se describen los resultados del clonado de genes que codificarían para enzimas fucoidanasas que fueron identificados en un *set* de datos metagenómico, como así también su expresión bajo diferentes estrategias a los efectos de obtener la mayor proporción de enzima soluble. A su vez, las enzimas expresadas bajo las condiciones previamente optimizadas, fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad, dializadas y concentradas.

5.2. RESULTADOS

5.2.1. Amplificación de genes putativos de fucoidanasas y clonado de los mismos en el plásmido de expresión

5.2.1.1. Diseño de cebadores y amplificación de los genes de interés

Los cuatro genes seleccionados, en base a los análisis *in silico* de sus secuencias deducidas de aminoácidos (Capítulo 4), fueron amplificados a partir de ADN fosmidico de los clones de la biblioteca metagenómica. Para ello, en primer lugar se eliminó la región correspondiente al péptido señal de cada secuencia nucleotídica, y a partir de las

5. Clonado, expresión heteróloga y purificación

secuencias obtenidas se diseñaron los cuatro pares de cebadores. Los criterios utilizados para el diseño de los cebadores se detallan en la sección 2.8.2. (Capítulo 2). Brevemente, se tuvieron en cuenta las restricciones recomendadas de longitud, temperatura de hibridación y estructura secundaria. Además, se adicionaron en el extremo 5' secuencias para el reconocimiento de las enzimas de restricción a utilizar para el clonado en el vector de expresión y un fragmento adicional de cuatro nucleótidos a fin de garantizar un corte eficiente de las endonucleasas. Las secuencias de los cebadores fueron comparadas contra el *set* de datos OR07 completo, a fin de evaluar si existiría en la biblioteca otras posibles secuencias blanco que podrían generar productos de amplificación inespecíficos, obteniéndose resultados negativos. Sin embargo, es importante notar que dicho *set* de datos no contiene las secuencias completas de todos los fósmidos de la biblioteca, por lo que aún podrían existir secuencias complementarias a los cebadores en la misma sin ser detectadas en este análisis.

Los oligonucleótidos diseñados fueron sintetizados y utilizados como cebadores en reacciones de amplificación por PCR. El templado utilizado consistió en ADN fosmidico proveniente de la biblioteca metagenómica la cual se encuentra constituida por 352 grupos de clones (con 100 clones aproximadamente cada grupo), los cuales fueron agrupados en dos mitades para su secuenciación y ensamblado de forma independiente (muestras S1 y S2). Para la amplificación, se contó con seis subgrupos de clones, tres conteniendo los clones de S1 y tres conteniendo los clones de S2. Las secuencias de interés fueron identificadas en los fragmentos ensamblados de S1 ó S2. De acuerdo a esta información, se seleccionaron los tres subgrupos de clones de la muestra correspondiente para ser evaluados como posibles templados, dado que no es posible conocer cuál de los tres subgrupos de la muestra contiene el gen. En consecuencia, cada reacción de amplificación utilizó como templado 1/6 de los clones de la biblioteca metagenómica, siendo aproximadamente 250.000 genes.

Solo uno de los subgrupos presentó un resultado positivo donde el tamaño obtenido de los productos amplificados se correspondió en cada caso con el esperado. El tamaño esperado fue de 1915 pb para la secuencia 163424, 1456 pb para 57307, 1153 pb para 113643 y 1031 pb para 277282 (Figura 5.1.). Si bien se observaron amplificaciones inespecíficas, estas bandas presentaban otros tamaños y eran mucho

5. Clonado, expresión heteróloga y purificación

menos abundantes en la mezcla de amplificación. En todos los casos la banda de interés fue extraída del gel y purificada para luego ser utilizada en la etapa de clonado.

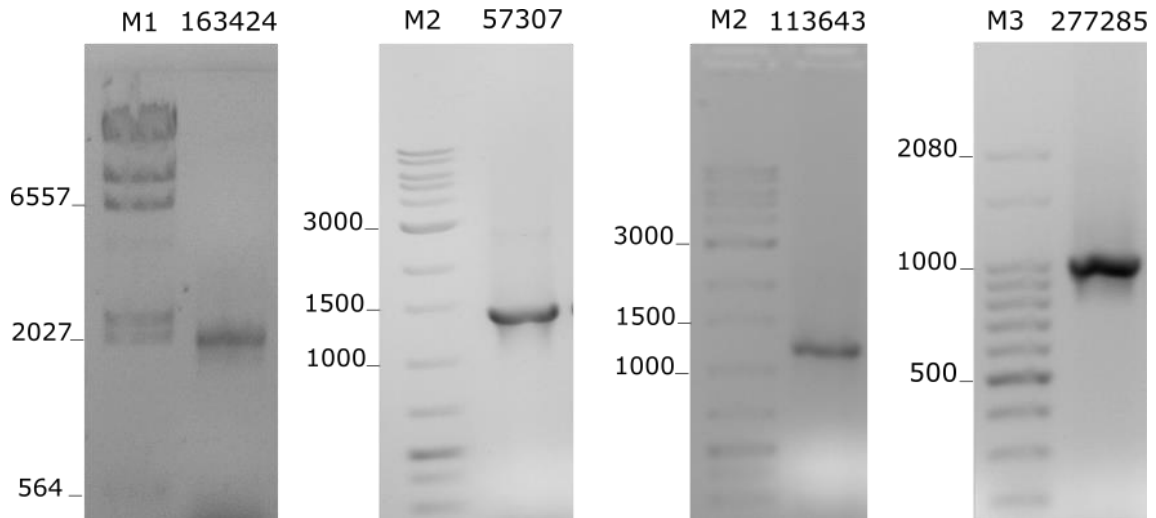


Figura 5.1. Electroforesis en gel de las secuencias amplificadas putativas de enzimas fucoidanasas. Los cuatro fragmentos amplificados fueron sembrados en un gel de agarosa 1 % (p/v) y visualizados mediante un transiluminador de luz UV a 255 nm. M1: marcador de peso molecular λ HindIII, M2: Marcador de peso molecular INBIO Highway 1 kpb, M3: Marcador de peso molecular 100 pb Plus PB-L. A la izquierda se indica la longitud de cada fragmento del marcador en pares de base (pb).

5.2.1.2. Clonado de los genes amplificados

Dos de los fragmentos amplificados (163424 y 57307) se clonaron directamente en el vector de expresión pET28-TEV (Novagen) mientras que los dos restantes fueron clonados primeramente en el plásmido pCRTM 4 TOPOTM (Invitrogen). Esto fue debido a que el clonado directo no resultó en clones positivos. Este paso adicional permitió una fácil selección de colonias conteniendo el gen luego de la transformación de células de *E. coli* TOP10. La identidad e integridad de las secuencias presentes en el vector de clonado fueron corroboradas por medio de la secuenciación del inserto utilizando los cebadores universales M13F y M13R-pUC(-40) cuya ubicación se encuentra indicada en la Figura 5.2. Una vez corroborada la direccionalidad del inserto, la presencia de los sitios de restricción y la secuencia del gen, se realizó el subclonado en el vector de expresión (pET28-TEV).

5. Clonado, expresión heteróloga y purificación

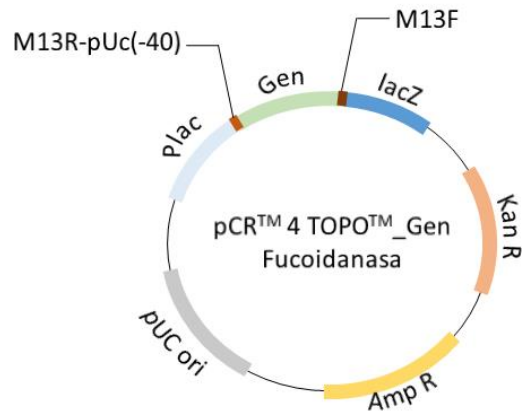


Figura 5.2. Mapa de restricción del vector de clonado pCR™ 4-TOPO™ con presencia del inserto. Las construcciones contienen dos genes de resistencia a antibióticos (Amp R y Kan R), un origen de replicación (pUC ori), un sitio de clonación (lacZ) y un promotor lactosa (Plac). Al inicio y al final del gen se encuentran las secuencias reconocidas por los cebadores utilizados en la etapa de secuenciación: M13R-pUc(-40) y M13F .

Los cuatro fragmentos amplificados (dos de ellos como productos de PCR y dos contenidos en el vector pCR™ 4-TOPO™) fueron escindidos utilizando las enzimas de restricción incluidas en la etapa de diseño de los oligonucleótidos. Las mismas endonucleasas de restricción se utilizaron para escindir el vector de expresión pET28-TEV, y luego de la ligación se obtuvieron cuatro construcciones con la configuración indicada en la Figura 5.3.

Dos clones de cada construcción fueron verificados por secuenciación corroborándose los siguientes elementos: a) la secuencia del promotor T7, b) la secuencia del sitio de unión al ribosoma (RBS), c) el condón de inicio de la traducción, d) la secuencia del gen, e) la etiqueta de seis histidinas (His-Tag) en el extremo N-terminal y f) el codón de terminación de traducción.

5. Clonado, expresión heteróloga y purificación

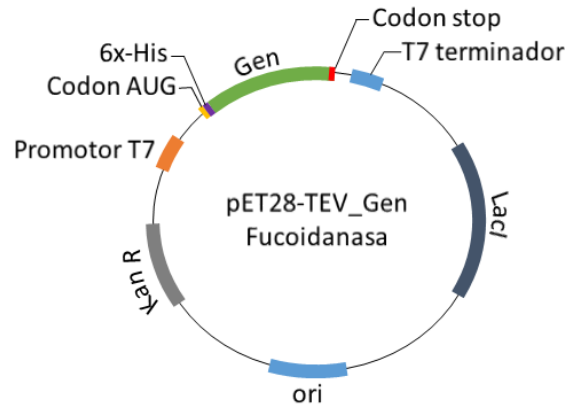


Figura 5.3. Mapa de restricción de las cuatro construcciones generadas en el vector de expresión pET28-TEV. Las construcciones se encuentran conformadas principalmente por los siguientes elementos: un operón lactosa (LacI), un origen de replicación (ori), un marcador de selección (Kan R), un promotor y terminador T7 (regiones reconocidas por los cebadores universales en la etapa de secuenciación), y el inserto correspondiente al gen que codifica para la enzima fucoidanasa con presencia de un His-tag en el extremo N-terminal.

5.2.1.3. Variantes identificadas del gen 277285

Al secuenciar los clones de la construcción pCR 4-TOPO-277285, se observaron dos variantes del gen. Una de las variantes (pCR 4-TOPO-277285_1), presente en tres de los cuatro clones secuenciados, contenía dos cambios de base con respecto a la secuencia identificada en el set de datos OR07. El clon restante (pCR 4-TOPO-277285_2) presentó la misma secuencia que aquella identificada en los análisis *in silico*. Este polimorfismo podría tratarse de un error ocurrido en forma temprana durante la amplificación. Sin embargo, también es posible que ambas variantes estén presentes en los clones de la biblioteca metagenómica, pero que sólo una de ellas, la menos abundante, fue secuenciada. Los dos polimorfismos identificados dieron lugar a cambios en residuos aminoacídicos. El primero de ellos contiene un aminoácido polar, una treonina, en lugar de una isoleucina (no polar alifático), mientras que el segundo presenta una asparagina (polar no cargado) en lugar de un aspartato (con carga negativa). Con la hipótesis de que las diferencias observadas en la secuencia de aminoácidos podrían influenciar la expresión de esta enzima, ambas variantes fueron clonadas y expresadas.

5. Clonado, expresión heteróloga y purificación

5.2.2. Expresión heteróloga de las enzimas fucoidanasas putativas

5.2.2.1. Optimización de la expresión heteróloga

Las construcciones obtenidas en el vector de expresión se emplearon para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3). Un clon de cada transformación fue seleccionado para evaluar la expresión de la proteína recombinante. Se evaluaron distintas condiciones de expresión a los fines de seleccionar aquella que resultara en una mayor proporción de proteína soluble. Las condiciones evaluadas incluyeron el medio de cultivo, la co-expresión con chaperones moleculares y la temperatura de crecimiento. Cabe destacar que tres de los genes seleccionados provendrían de miembros de *phylum* Plactomycetota, mientras que el cuarto gen sería de un organismo del *phylum* Bacteroidota.

5.2.2.1.1. Medio de cultivo y co-expresión con chaperones moleculares

Como primera aproximación, la sobreexpresión heteróloga se llevó a cabo con la construcción pET28-TEV-57307 utilizando 2 medios de cultivo: LB y 4xYT. La principal diferencia entre ambos medios de cultivo se encuentra en la concentración de triptona, donde el contenido en el medio 4xYT es tres veces más alta que la presente en el medio LB. Ambos medios fueron suplementados con glucosa durante la etapa del cultivo inicial con el fin de inhibir la transcripción basal de la proteína heteróloga que podría resultar tóxica. La temperatura de crecimiento e inducción del cultivo fue de 37 °C. La proteína codificada por el gen 57307 presenta un peso molecular esperado de 54 kDa. Fracciones provenientes del extracto total y del sobrenadante fueron sembradas en un SDS-PAGE, y se observó una banda que se corresponde con el peso molecular esperado de la proteína de interés (Figura 5.4., indicada con una flecha roja en las calles 57307 pET). El control utilizado consistió en *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el vector pET28-TEV sin inserto, y en las fracciones del control no se observó la banda que se correspondería con la proteína 57307 (calles pET, Figura 5.4.).

Se obtuvo una mayor proporción de enzima 57307 en el medio de cultivo 4xYT visualizándose la banda con una mayor intensidad (calles 57307 pET del sobrenadante, Figura 5.4.). Esto es debido a que el medio de cultivo 4xYT, al ser más rico que el medio LB, permitió alcanzar mayores densidades celulares finales ($DO_{600nm} = 10$), mientras que

5. Clonado, expresión heteróloga y purificación

la DO_{600nm} máxima fue de 5 en el medio LB. Por tanto, a partir del medio 4xYT se obtuvo una mayor densidad celular para la misma unidad de volumen. Sin embargo, al comparar las bandas de la proteína de interés en el extracto total y en el sobrenadante en ambos medios de cultivo, se puede observar que una gran proporción de la enzima resultó insoluble, pudiéndose encontrar bajo la forma de cuerpos de inclusión.

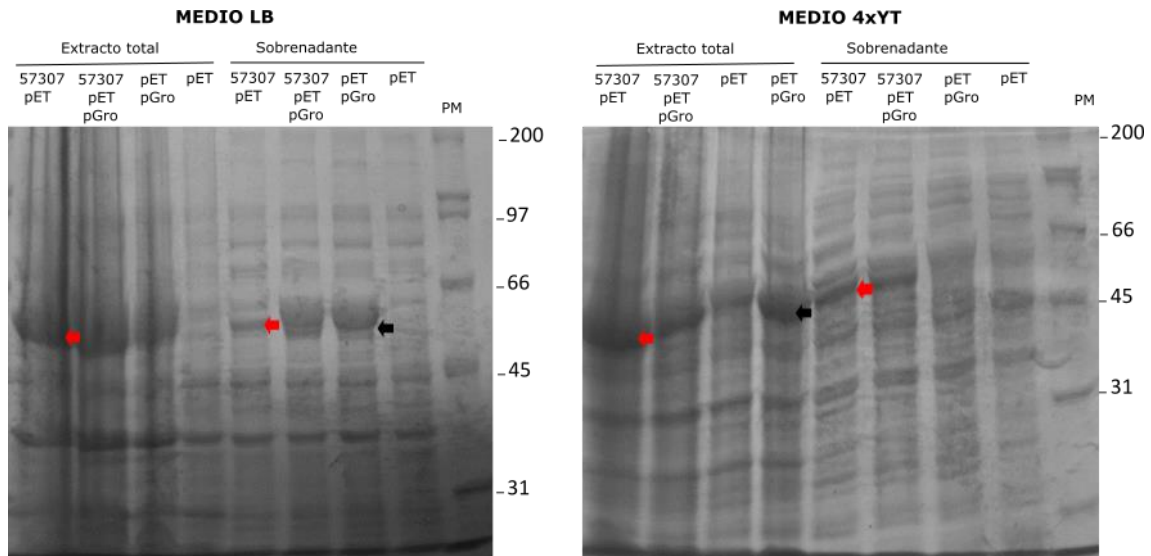


Figura 5.4. Electroforesis SDS-PAGE de la co-expresión de la construcción pET28-TEV-57307 y del vector pGro en diferentes medios de cultivo (LB y 4xYT). PM: marcador de peso molecular expresado en kilodalton (kDa), 57307 pET: vector de expresión recombinante, 57307 pET pGro: vector de expresión recombinante junto con el vector que codifica chaperones. Se incluyen dos controles uno con el vector de expresión solo (pET) y el otro junto con el vector pGro (pET pGro). La banda correspondiente a la proteína de interés se indica con una flecha roja (54 kDa) y la banda correspondiente a la expresión de la chaperona con una flecha negra (60 kDa). Se sembraron 10 μ L en cada calle. Los geles se tiñeron con 1 % (p/v) de azul de coomassie.

Por otro lado, se evaluó si la co-expresión con los chaperones moleculares GroEL/GroES de *E. coli* mejoraban la solubilidad de las proteínas de interés. La solubilidad de la fucoidanasa putativa 57307 expresada en *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo los plásmidos pET28-TEV-57307 y pGro, fue evaluada en ambos medios de cultivo a una temperatura de crecimiento e inducción de 37 °C (Figura 5.4.). Fracciones provenientes del extracto total y del sobrenadante fueron sembradas en un SDS-PAGE, y se observó una banda que se corresponde con el peso molecular esperado de la proteína de interés (indicada con una flecha roja en la Figura 5.4.), como así también una banda que indicaría expresión de la chaperona GroEL de 60 kDa (indicado con una flecha negra en la Figura 5.4.). La banda correspondiente a la chaperona GroES no se visualiza en el gel dado que el peso molecular que presenta es bajo (10 kDa). Se observó

5. Clonado, expresión heteróloga y purificación

sobreexpresión en la fracción soluble de la chaperona molecular pero no del gen de interés, por lo que el complejo de chaperones utilizado no favorecería la solubilidad de la fucoidanasa putativa 57307 en las condiciones evaluadas.

5.2.2.1.2. Temperatura

Se realizó la expresión de la fucoidanasa putativa 57307 en el medio de cultivo 4xYT a distintas temperaturas, a los fines de evaluar el efecto sobre el rendimiento de proteína soluble. Se evaluaron temperaturas de crecimiento e inducción de 12, 21, 30 y 37 °C. Al comparar las fracciones solubles mediante visualización en un SDS-PAGE, se observó que en todas las temperaturas evaluadas hubo expresión de la enzima putativa 57307, sin embargo, la solubilidad se vió incrementada con el descenso de la temperatura, obteniéndose una mayor proporción bajo la condición de crecimiento a 12 °C.

5.2.2.1.3. Protocolo de lisis celular

A continuación se evaluó el efecto del protocolo de lisis, incluyendo el *buffer* utilizado, sobre la estabilidad de las proteínas. Tanto la presencia de glicerol como de inhibidores de proteasas (PMSF), evitaba la pérdida de la proteína de interés que se evidenciaba al descongelar las muestras. Por lo tanto, la composición óptima del *buffer* de lisis consistió en 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol, 0,2 mM PMSF y 5 mM imidazol. Por otro lado, otros factores que favorecieron la estabilidad de la proteína evitando su agregación fueron: incubación en hielo luego del primer ciclo de lisis celular en Bead-Beater y el centrifugado posterior a 4 °C. Estas condiciones fueron utilizadas en el resto de los experimentos de expresión.

5.2.3. Condiciones optimizadas de expresión y de lisis celular

Las condiciones óptimas de expresión evaluadas utilizando la enzima putativa 57307 fueron: crecimiento en medio de cultivo 4xYT a 12 °C, inducción a la misma temperatura a una DO_{600nm} de 0,8 con 0,2 mM IPTG, y utilizando el *buffer* de lisis 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol, 0,2 mM PMSF y 5 mM Imidazol. Las condiciones anteriormente descritas permitieron obtener un elevado porcentaje de la proteína 57307 en la fracción soluble y fue aplicado para la expresión de las tres construcciones restantes. Las fracciones correspondientes al extracto total y al

5. Clonado, expresión heteróloga y purificación

sobrenadante fueron sembradas (25 µg de proteína en todas las calles) y visualizadas en geles SDS-PAGE (Figura 5.5.). Se observó la expresión soluble de las cuatro enzimas a partir de la presencia de bandas que se corresponden con el peso molecular esperado (señaladas con flecha negra en la Figura 5.5.) y que se encuentran ausentes en los controles (calles Gluc y pET).

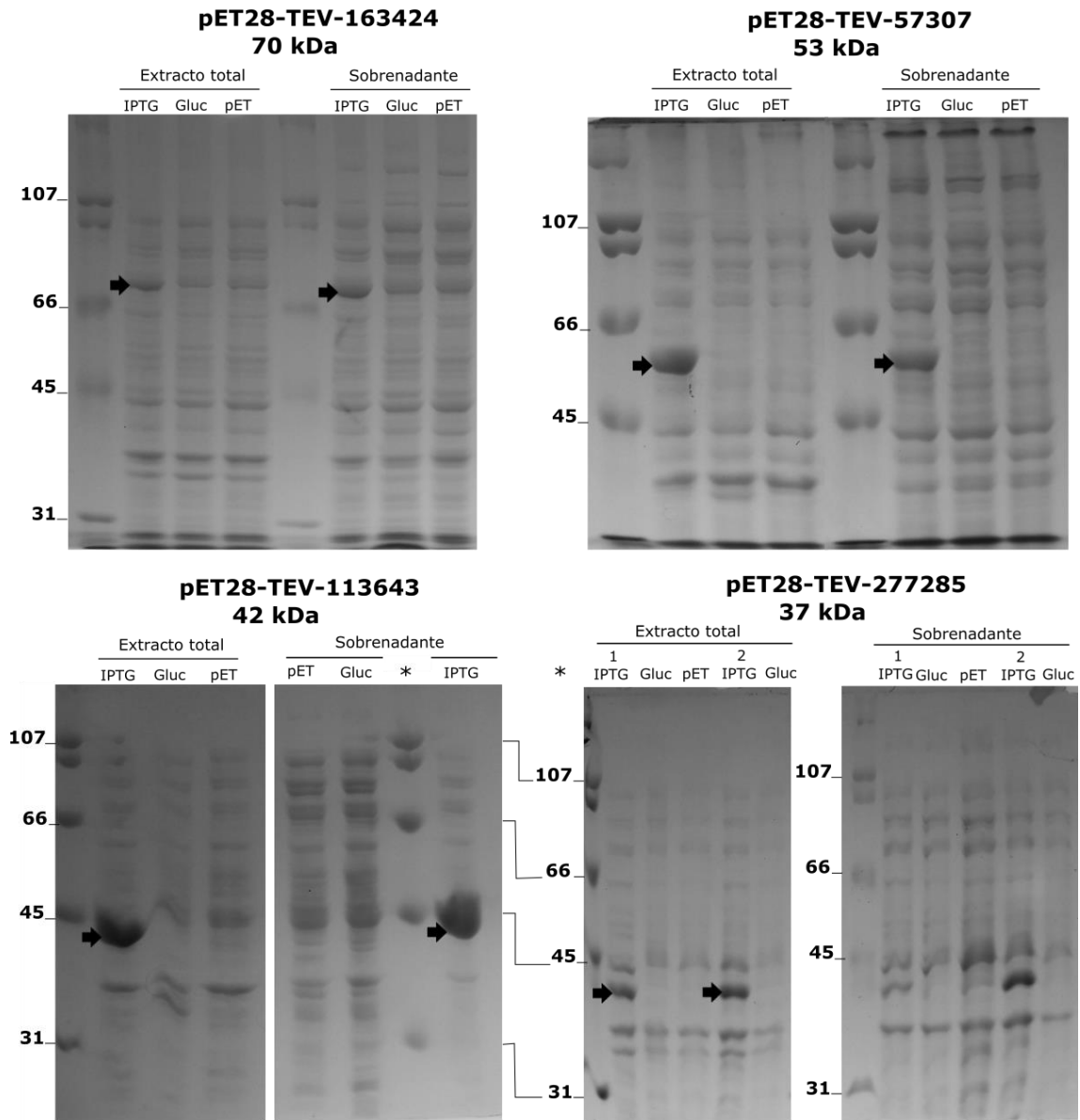


Figura 5.5. Expresión de las proteínas recombinantes analizada por SDS-PAGE. Se sembraron fracciones correspondientes al extracto total y al sobrenadante de los cuatro genes expresados. Para el gen 277285 se sembraron ambas fracciones para las dos variantes encontradas del gen 277285 (1 y 2). El asterisco (*) indica la calle en la que fue sembrado el marcador de peso molecular y los valores indicados se encuentran en kilodalton (kDa), IPTG: corresponde al clon que contiene el plásmido recombinante inducido con IPTG, Gluc: clon que contiene el plásmido recombinante en el que se añadió glucosa en lugar de inductor, pET: plásmido sin inserto. Se sembraron 25 µg de proteína en cada calle. Los geles se tiñeron con 1 % (p/v) de azul de coomassie.

5. Clonado, expresión heteróloga y purificación

Al comparar la expresión de las dos variantes del gen 277285, se observó que la variante 277285_1 (contiene dos cambios de aminoácidos) resultó ser mayormente insoluble (calle 1 IPTG, Figura 5.5.). Por el contrario, la expresión de la variante 277285_2 mostró una alta solubilidad (calle 2 IPTG, Figura 5.5.). La enzima codificada por la variante 2 del gen fue purificada junto con las tres enzimas restantes.

5.2.4. Purificación

Las proteínas fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad utilizando la resina Ni-NTA. Luego de la interacción de la resina con el sobrenadante proveniente de la lisis celular, se aplicaron tres lavados con el *buffer* 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol y 10 mM Imidazol, donde la presencia de Imidazol remueve uniones inespecíficas y/o débiles entre la serie de histidinas y los iones de níquel presentes en la resina. Posteriormente, las proteínas fueron eluidas con el *buffer* 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol y 300 mM Imidazol. Las fracciones eluidas fueron cuantificadas y la pureza de las proteínas fue analizada mediante la siembra (entre 3 y 0,5 µg) en un gel SDS-PAGE (Figura 5.6.). Las bandas con mayor intensidad observadas en las muestras de eluciones se corresponden con el peso molecular esperado para las cuatro enzimas. Se observó co-elución de otras proteínas de mayor peso molecular junto con la elución de la proteína 57307 y de menor peso molecular con la elución de la proteína 163424, si bien la concentración de las mismas resultó ser significativamente menor.

5. Clonado, expresión heteróloga y purificación

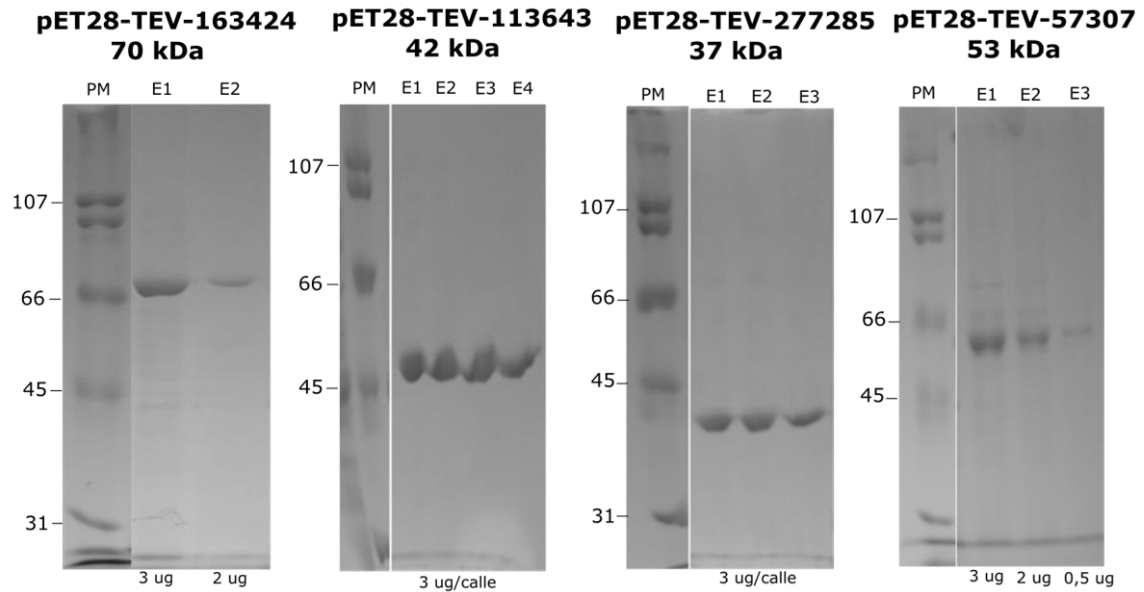


Figura 5.6. Purificación de las enzimas recombinantes mediante cromatografía por afinidad Ni-NTA. Se sembraron las fracciones correspondientes a las distintas eluciones (E1 - E4). Los números que se encuentran en el margen inferior corresponden a los μg sembrados en la calle. PM: marcador de peso molecular en kilodalton (kDa). Los geles se tiñeron con 1 % (p/v) de azul de coomassie.

En todos los casos, la mayor concentración de enzima purificada se observó en la primera elución (E1), obteniéndose una concentración máxima de $1,24 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ en la expresión de la construcción pET28-TEV-113643 y un valor mínimo de $0,67 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ para pET28-TEV-277285 (Tabla 5.1.). La enzima putativa de la construcción pET28-TEV-277285 se encontró en mayor proporción con respecto al total de proteínas expresadas por *E. coli* BL21, correspondiendo a un 40 %. La proporción relativa de las 3 proteínas restantes fue entre el 27-34 % con respecto al contenido proteico total.

Tabla 5.1. Proteína obtenida en las etapas de expresión, purificación y diálisis.

Enzima	Concentración proteína total ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ^a	Proteína total ^a (μg)	Proteína purificada ^b (μg)	Rendimiento post-diálisis (%)	Rendimiento final ($\mu\text{g}/0,2 \text{ L}$ de medio de cultivo)
57307	1,24	3100	1065	59	180
163424	1,06	2650	720	50	125
113643	1,48	5180	1480	53	780
277285	0,67	2345	940	89	630

^a Valores de proteína total expresada en la fracción soluble.

^b Eluciones combinadas de la proteína purificada.

5. Clonado, expresión heteróloga y purificación

Las eluciones que presentaron mayor concentración fueron combinadas (E1 + E2 para 163424 y 57307, y E1+E2+E3 para 113643 y 277285) y posteriormente dializadas. En todos los casos, se obtuvo una menor concentración de proteína luego de la etapa de diálisis, con porcentajes de recuperación entre 50 y 89 % (Tabla 5.1.). Estos porcentajes podrían indicar distintos grados de precipitación de las proteínas durante el proceso de diálisis. El rendimiento final resultó entre 125 y 780 μg de proteína expresada cada 200 mL de medio de cultivo. Luego de la etapa de concentrado por centrifugación se obtuvo un valor máximo de 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para la enzima 57307 y de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para las 3 enzimas restantes.

Aproximadamente un tercio del total de proteínas presentes en la fracción soluble (barras negras, Figura 5.7.) se correspondió con los valores de proteína purificada. La proteína 277285 exhibió un menor grado de agregación durante la etapa de diálisis, donde el rendimiento final constituyó un 89 % con respecto al valor de las eluciones combinadas. Los valores de rendimiento más bajo con respecto a la concentración obtenida en las proteínas purificadas se dieron en las enzimas 57307 y 163424.

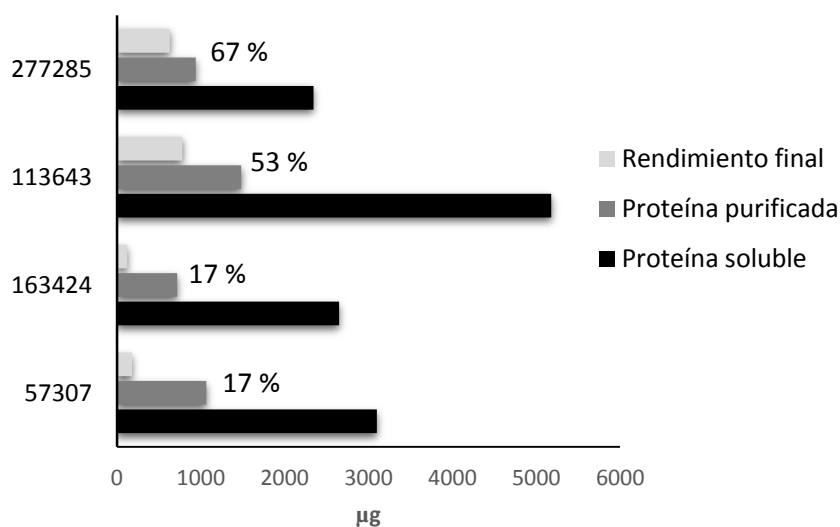


Figura 5.7. Concentración de proteínas (μg) en distintas etapas del proceso de expresión y purificación de las cuatro enzimas fucoidanasas. Los porcentajes indican la relación entre la concentración de la proteína post-diálisis (rendimiento final) con respecto a los valores de proteína purificada.

5. Clonado, expresión heteróloga y purificación

5.3. DISCUSIÓN

Cuatro genes de enzimas fucoidanasas putativas fueron clonados y expresados bajo condiciones previamente optimizadas, con el fin de generar una elevada producción de proteína soluble. La obtención de una proteína recombinante soluble resulta esencial para posteriores análisis tales como la caracterización bioquímica y estructural de una proteína (Francis *et al.*, 2010). La selección de un huésped óptimo es uno de los primeros parámetros a tener en cuenta en el proceso de expresión. Si la proteína sobre-expresada proviene de un organismo filogenéticamente distante al huésped, es probable que existan sesgos en el uso de codones. Estas diferencias pueden ser un obstáculo para la producción de la proteína pudiendo provocar que durante la síntesis ocurra un plegamiento incorrecto provocando su agregación y acumulación bajo la forma de cuerpos de inclusión insolubles (Pelliza *et al.*, 2018), influyendo significativamente en el rendimiento final (Francis y Page, 2010; Norkiene y Gedvilaite, 2011). Para evitar este problema existen diversas estrategias, entre ellas la construcción de un “gen sintético”, la utilización de cepas específicas de *E. coli* que porten genes de ARNt para los codones raros (Kaur *et al.*, 2018), o bien si dichas discrepancias no resultan ser mejoradas, la optimización de los diversos factores que afectan el nivel de expresión y purificación puede resultar en la obtención de una proteína soluble.

No siempre es posible establecer *a priori* la combinación óptima del vector de expresión y de la cepa huésped para la producción de una proteína heteróloga en *E. coli* debido a que muchas variables pueden afectar la producción y solubilidad de dicha proteína. En este trabajo se utilizó un sistema que generalmente resulta en altos niveles de expresión utilizando IPTG como agente inductor, como lo es el sistema pET, combinado la cepa *E. coli* BL21 (DE3) como huésped. Esta combinación permite obtener altos rendimientos de la proteína heteróloga pero también genera una alta carga metabólica para la célula huésped, lo que a menudo resulta en agregados de proteínas intracelulares (Singh *et al.*, 2015; Schwaighoder *et al.*, 2020). En este contexto, se modificaron diversos factores para maximizar el rendimiento y solubilidad de la proteína heteróloga. Dado que la sobre-expresión demanda una carga metabólica adicional para la célula huésped, dicho estrés puede contrarrestarse con la utilización de un medio de cultivo más rico (Kaur *et al.*, 2018). El medio de cultivo 4xYT permitió obtener el doble

5. Clonado, expresión heteróloga y purificación

de densidad celular final que el medio LB. La baja proporción de peptona y levadura que contiene el medio LB hace que el crecimiento celular se detenga a una densidad relativamente baja, situación que se ve favorecida cuando ambos componentes se encuentran en mayor proporción, tal como sucede en la composición del medio 4xYT. Por otro lado, la adición de glucosa en los cultivos iniciales evita la expresión basal de la proteína recombinante, la cual podría resultar tóxica (Kaur *et al.*, 2018). La glucosa es un represor catabólico del operón Lac, el cual se encuentra presente en la región lisógena de la cepa huésped utilizada (BL21).

La utilización del medio de cultivo más rico (4xYT) suplementado con glucosa para el crecimiento de los clones transformados con el vector de expresión, permitió obtener mayores densidades celulares que se correspondieron con una elevada producción de proteína, siendo gran parte insoluble. La transformación de dichos clones con el vector pGro (contiene genes que codifican para el complejo de chaperones moleculares GroEs/GroEL) y su posterior co-expresión, no evidenció una reducción significativa en la formación de proteína insoluble. Los chaperones moleculares actúan como catalizadores que evitan la agregación de los polipéptidos nacientes (Federov, 2022). Sin embargo, un determinado tipo chaperona reconoce determinadas proteínas, por lo que suele ser difícil seleccionar que chaperona resulta la adecuada para la proteína de interés, siendo común la determinación mediante métodos de prueba y error (Bothmann y Pluckthun, 2001; Kamna y Sahoo, 2012). Es probable que otros complejos de chaperonas puedan reconocer a la proteína de interés y favorecer de esta manera su solubilidad.

La temperatura es un factor importante en los procesos metabólicos, afectando la velocidad de los procesos de transcripción y traducción de proteínas (Martinez-Luaces *et al.*, 2006). Temperaturas de crecimiento e inducción elevadas favorece la formación de cuerpos de inclusión, debido a que intensifica las interacciones hidrofóbicas que determinan la formación de agregados insolubles (Kaur *et al.*, 2018; Francis y Rage, 2010). La solubilidad de la proteína 57307 sobre-expresada exhibió una evidente dependencia a la temperatura de crecimiento de cultivo y de inducción, en donde a menor temperatura (por ejemplo 12 °C), mayor era la proporción de enzima de forma soluble. Este resultado se corresponde con experimentos previos de expresión de otras

5. Clonado, expresión heteróloga y purificación

enzimas fucoidanasas, en donde se aplicaron temperaturas entre 16 y 20 °C (Silchenko *et al.*, 2017; Cao *et al.*, 2018; Schultz-Johansen *et al.*, 2018; Vickers *et al.*, 2018; Zueva *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2021). Sin embargo, en estos trabajos se utilizaron valores de temperatura diferenciales entre la aplicada durante crecimiento del cultivo y en la etapa de inducción. El uso de una temperatura inicial más elevada que la utilizada en la inducción, permite obtener un cultivo a inducir en menor tiempo pero el descenso de temperatura aplicado podría generar una respuesta de estrés en el cultivo.

Las proteínas recombinantes solubles son susceptibles a la proteólisis ya sea antes o después de la etapa de lisis celular. La utilización de cepas de *E. coli* deficientes en proteasa, tal como lo es la cepa BL21 (DE3) como así también el uso de inhibidores de proteasas, minimiza la degradación de proteínas heterólogas expresadas en la cepa (Wingfield, 2016). Esta observación fue corroborada en este trabajo en donde la no utilización del inhibidor de proteasa PMSF evidenció una pérdida considerable de proteína. Por otro lado, la presencia de imidazol en el *buffer* de lisis contribuyó a la obtención de eluciones más puras, tal como se ha aplicado en la purificación de otras enzimas fucoidanasas (Silchenko *et al.*, 2017; Cao *et al.*, 2018; Vuillemin *et al.*, 2020; Zueva *et al.*, 2020). El agregado de imidazol en la solución del *buffer* de lisis permite maximizar la eliminación de proteínas inespecíficas ricas en histidina la etapa de purificación, por lo que se requieren menos pasos de lavado para la obtención de proteínas puras (Hochuli *et al.*, 1988).

La optimización de los distintos parámetros permitieron obtener una mayor proporción de la proteína recombinante soluble, sin embargo, al comparar las fracciones correspondientes al extracto total y al sobrenadante sembradas en el SDS-PAGE para las cuatro expresiones, aún existía proteína expresada localizada en la fracción insoluble. En los casos donde existe una expresión en fase mixta (proteína heteróloga en fracción soluble e insoluble), se obtienen mejores rendimientos procesando el material soluble (descartando la fracción insoluble, "pellet") aunque constituya una proporción menor de la proteína total expresada (Wingfield, 2016).

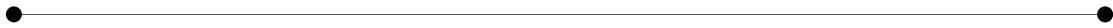
Características de la proteína heteróloga también influyen en el nivel de expresión, tal como la secuencia de aminoácidos, el peso molecular o la presencia de varios dominios. Las proteínas modulares o de gran tamaño (mayores a 100 kDa) no

5. Clonado, expresión heteróloga y purificación

suelen ser bien toleradas por *E. coli*, presentando una mayor tendencia a formar agregados insolubles y siendo propensas a la proteólisis (Vallejo y Rinas, 2004; Kaur *et al.*, 2018). Hasta el momento, las enzimas fucoidanasas que han sido expresadas de forma heteróloga se tratan de enzimas con tamaños entre 40 y 70 kDa. Las dificultades con respecto a la solubilidad han sido resueltas, en algunos casos, mediante la remoción de determinados dominios (Cao *et al.*, 2018). En este trabajo, las enzimas sobre-expresadas que resultaron ser más solubles y estables fueron aquellas con menor peso molecular (113643 con 42 kDa y 277285 con 37 kDa) con porcentajes de recuperación post-diálisis entre 67 y 53 % con respecto a la proteína total purificada. Por otro lado, variaciones menores en la secuencia de aminoácidos afectaron en gran medida la solubilidad de la proteína 277285. Clones con diferencias en dos nucleótidos que dieron lugar a cambios en los aminoácidos codificados por dichos codones, tuvieron comportamientos muy diferentes durante la expresión heteróloga. La secuencia deducida de aminoácidos detectada en el *set* de datos metagenómicos (con mayor solubilidad) codificaba para un aspartato (D) en la posición 323, mientras que la variante restante contenía una asparagina (N) en dicha posición. Esta diferencia resultó en una proteína menos soluble, lo cual podría estar relacionado con las características del aminoácido aspartato, el cual contribuye significativamente a la solubilidad de las proteínas (Trevino *et al.*, 2007). La solubilidad de una proteína está relacionada con la calidad del plegamiento, lo que influye directamente en la estructura y en la actividad de dicha proteína (Zhou *et al.*, 2012). Bajo esta observación, la variante 277285_1 pudo haber adquirido un plegamiento incorrecto generando su acumulación bajo la forma de cuerpos de inclusión.

Las estrategias utilizadas tanto para el clonado de genes putativos de fucoidanasas como para su expresión heteróloga, resultaron ser adecuadas para obtener las proteínas de interés solubles y con alto grado de pureza, que resulta esencial para la caracterización de las mismas.

6. CARACTERIZACIÓN DE LAS ENZIMAS EXPRESADAS Y PURIFICADAS



6. Caracterización de las enzimas purificadas

6.1. INTRODUCCIÓN

La caracterización enzimática implica la determinación de las propiedades físico-químicas que presenta una enzima, dentro de las cuales se incluyen sus propiedades catalíticas y las condiciones óptimas para la catálisis. Hasta el momento existe un reducido número de estudios publicados sobre enzimas fucoidanasas caracterizadas. Esto se debe, en parte, a que la determinación de la actividad fucoidanasa presenta una gran dificultad dada la falta de un método rápido y sensible para detectar y cuantificar dicha actividad (Kusaykin *et al.*, 2016). Es por esto que la determinación cuantitativa como así también, de los parámetros cinéticos constituyen un gran “cuello de botella” para su caracterización (Zhu *et al.*, 2021). A pesar de no existir un ensayo estándar, se han desarrollado diferentes métodos, tal como se describe en la sección 1.2.1.4.2. del Capítulo 1.

Otro aspecto que dificulta la determinación de la actividad fucoidanasa es la gran diversidad estructural que presentan sus sustratos, los fucoidanos. Las enzimas fucoidanasas caracterizadas hasta el momento han demostrado una alta especificidad, donde su actividad depende no solo del enlace glicosídico entre los residuos de fucosa que reconocen, sino también probablemente de los patrones de ramificación y del grado de sustitución de grupos sulfato u otros monosacáridos (Silchenko *et al.*, 2017; Cao *et al.*, 2018; Schultz-Johansen *et al.*, 2018; Vickers *et al.*, 2018; Vuillemin *et al.*, 2020; Zueva *et al.*, 2020). Dadas las dificultades encontradas para estas enzimas, las evaluaciones de especificidad han sido realizadas mediante el uso de distintos sustratos, los cuales pueden ser adquiridos de forma comercial, o bien extraídos a partir de distintas especies de algas pardas, implicando en este último caso, un extenso proceso (Florez-Fernandez *et al.*, 2020).

En este capítulo se describen los resultados obtenidos a partir de los ensayos de actividad fucoidanasa de las enzimas purificadas utilizando fucoidanos de ocho especies de algas pardas de la costa Patagónica argentina, como sustratos. Se describe la optimización de las condiciones para la catálisis, incluyendo el efecto de la temperatura, salinidad, pH y tiempo, como así también el análisis de la especificidad de sustrato. Por último, se detallan los análisis de la estructura de los oligosacáridos obtenidos en la reacción enzimática con los distintos parámetros de catálisis optimizados previamente.

6. Caracterización de las enzimas purificadas

6.2. RESULTADOS

6.2.1. Determinación de la actividad fucoidanasa

Se determinó la presencia de actividad enzimática de las enzimas expresadas frente a fucoidanos provenientes de distintas especies de algas pardas, a los fines de estudiar la especificidad de sustrato y posteriormente las condiciones óptimas para la catálisis.

6.2.1.1. Especificidad de sustrato

Dado que la estructura y composición de los fucoidanos varía con la especie, entre otros factores, se evaluó la actividad de las cuatro enzimas fucoidanasas putativas expresadas y purificadas, utilizando extractos de fucoidanos de ocho especies de algas pardas de la costa Patagónica. Dos de las especies, *M. pyrifera* y *U. pinnatifida*, pertenecen a diferentes familias dentro del orden Laminariales, mientras que el resto de las especies pertenecen a tres familias del orden Ectocarpales (Tabla 6.1.).

Tabla 6.1. Taxonomía correspondiente a las especies de algas pardas consideradas en este trabajo.

Especie	Taxonomía*
<i>Macrocystis pyrifera</i>	Phaeophyceae; Laminariales; Laminariaceae; <i>Macrocystis</i>
<i>Undaria pinnatifida</i>	Phaeophyceae; Laminariales; Alariaceae; <i>Undaria</i>
<i>Adenocystis utricularis</i>	Phaeophyceae; Ectocarpales; Adenocystaceae; <i>Adenocystis</i>
<i>Scytosiphon lomentaria</i>	Phaeophyceae; Ectocarpales; Scytosiphonaceae; <i>Scytosiphon</i>
<i>Colpomenia sinuosa</i>	Phaeophyceae; Ectocarpales; Scytosiphonaceae; <i>Colpomenia</i>
<i>Eudesme virescens</i>	Phaeophyceae; Ectocarpales; Chordariaceae; <i>Eudesme</i>
<i>Myriogloea major</i>	Phaeophyceae; Ectocarpales; Chordariaceae; <i>Myriogloea</i>
<i>Asperococcus ensiformis</i>	Phaeophyceae; Ectocarpales; Chordariaceae; <i>Asperococcus</i>

*NCBI Taxonomy (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>)

Las condiciones utilizadas para determinar la actividad fucoidanasa fueron descritas en la sección 2.11. de Materiales y Métodos. Los resultados revelaron presencia de actividad fucoidanasa de la enzima #113643 (calle 1 en Figura 6.1.) frente a los fucoidanos obtenidos a partir de flotadores (**EFLO**) de *M. pyrifera* en un *buffer* de reacción con 100 mM Tris-HCl pH 7,5 y 500 mM NaCl, a 25 °C y con una incubación de

6. Caracterización de las enzimas purificadas

25 min. Los oligosacáridos resultantes de la actividad enzimática se observaron como un perfil de bandas que se corresponde a una serie de productos con distintos pesos moleculares (polisacáridos y oligosacáridos de distintos tamaños). Bajo las mismas condiciones, ningún otro sustrato fue degradado utilizando la enzima #113643. Las enzimas #57307, #163424 y #277285 no mostraron actividad enzimática frente a ninguno de los sustratos evaluados (Figura 6.1.). Dado que no se cuenta con ningún control positivo para dichas enzimas, no es posible saber si las enzimas no se encuentran activas, o bien las estructuras de los sustratos evaluados no son específicos para las mismas.

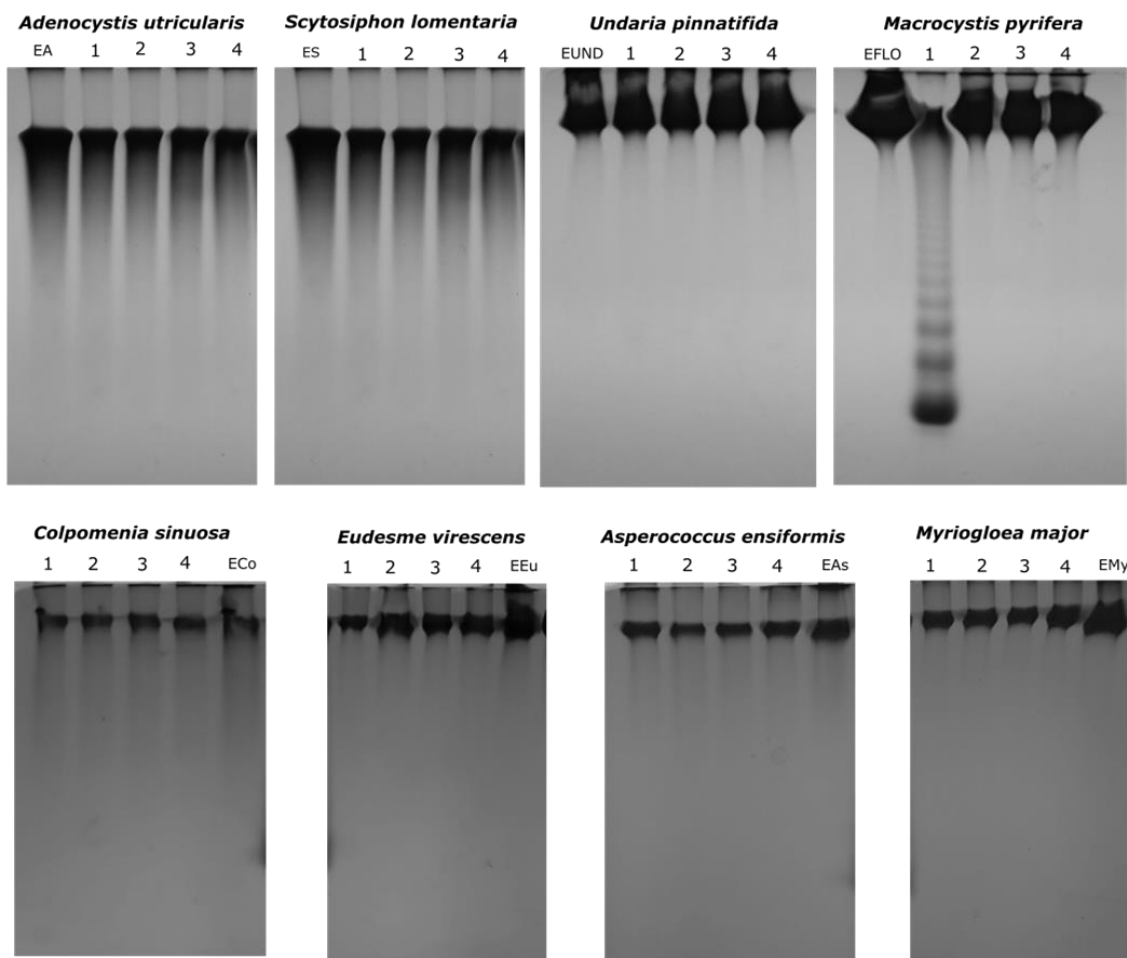


Figura 6.1. Determinación de la actividad fucoidanasa de las cuatro enzimas purificadas con fucoidanos provenientes de ocho especies de algas pardas. Los números superiores en cada gel indican las calles en las que se sembraron las distintas enzimas. Calle 1: enzima #113643, calle 2: enzima #57307, calle 3: enzima #277285, calle 4: enzima #163424. La primera calle de gels superiores y la última calle de los gels inferiores, corresponde a 150 µg de extracto de fucoidanos sin digerir. Los gels de color azul fueron teñidos con 0,03 % (p/v) Alcian Blue y los de color violeta con 0,1 % (p/v) de azul de toluidina. En el margen superior se indica el nombre de la especie a la que pertenece el sustrato utilizado.

6. Caracterización de las enzimas purificadas

Al evaluar la actividad de la enzima #113643 frente a los otros dos extractos de fucoïdanos obtenidos de *M. pyrifera*, provenientes de láminas (**ELAM**) y de cauloides (**ECAU**), se observó un perfil de digestión similar al obtenido para los fucoïdanos de flotadores de esta especie (Figura 6.2.). Es posible que a pesar de observarse el mismo patrón de bandas, las mismas podrían incluir polisacáridos y oligosacáridos con distintas estructuras y composiciones químicas pero con la misma migración electroforética. En este contexto, resulta necesario la realización de estudios estructurales más detallados. Por otro lado, se observó que en todas las calles existe una fracción de fucoïdanos resistente a la degradación enzimática, el cual se visualiza en el margen superior del gel.

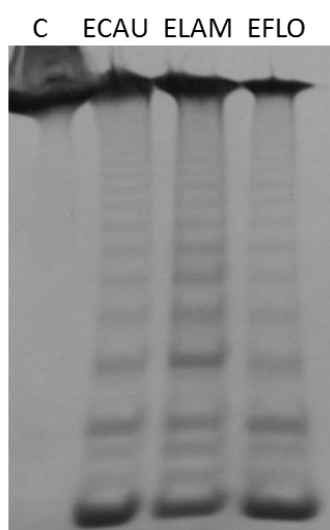


Figura 6.2. Determinación de la actividad fucoïdanasa de la enzima #113643 frente a los 3 fucoïdanos extraídos de la especie *M. pyrifera*. Las siglas indican el origen del fucoïdano utilizado como sustrato, ECAU: cauloide, ELAM: lámina y EFLO: flotador. El control (C) consistió en 150 µg de fucoïdano sin digerir. El gel fue teñido con 0,1 % (p/v) de azul de toluidina.

6.2.1.2. Determinación de las condiciones óptimas de catálisis

Las condiciones óptimas para la catálisis fueron evaluadas incubando la enzima #113643 con extracto de fucoïdanos provenientes de flotadores (**EFLO**) de *M. pyrifera*. En particular, se tuvieron en cuenta las condiciones ambientales presentes en el sitio de muestreo, y se aplicaron variaciones sobre las mismas, evaluándose cómo afectaban la actividad enzimática.

Tiempo

Se evaluó la actividad fucoïdanolítica alcanzada a distintos tiempos de incubación a 25 °C. La reacción se llevó a cabo en un *buffer* constituido por 100 mM Tris-HCl (pH 7,5)

6. Caracterización de las enzimas purificadas

y 500 mM NaCl, y se utilizó una concentración final de fucoidano de 0,4 % (p/v). Como en los experimentos anteriores, la actividad enzimática fue visualizada por la técnica de C-PAGE, mediante la presencia de un perfil de bandas que representan productos con distintos pesos moleculares. La enzima #113643 exhibió actividad fucanolítica detectable en los geles de poliacrilamida a partir de los 30 s de incubación (Figura 6.3.A). Al analizar el patrón de bandas obtenido en cada una de las condiciones, se observó que a medida que incrementa el tiempo de incubación, disminuye la intensidad de las bandas correspondientes a los fucoidanos de alto peso molecular. A su vez, las bandas correspondientes a los productos de degradación de bajo peso molecular incrementaron su intensidad en función del tiempo. El análisis por densitometría de la banda de menor peso molecular visualizada en el gel (señalada con flecha verde en Figura 6.3.A.) indicó un aumento progresivo de la intensidad a medida que aumenta el tiempo de incubación (Figura 6.3.B), hasta los 15 min de incubación, momento a partir del cual la actividad se estabilizaría.

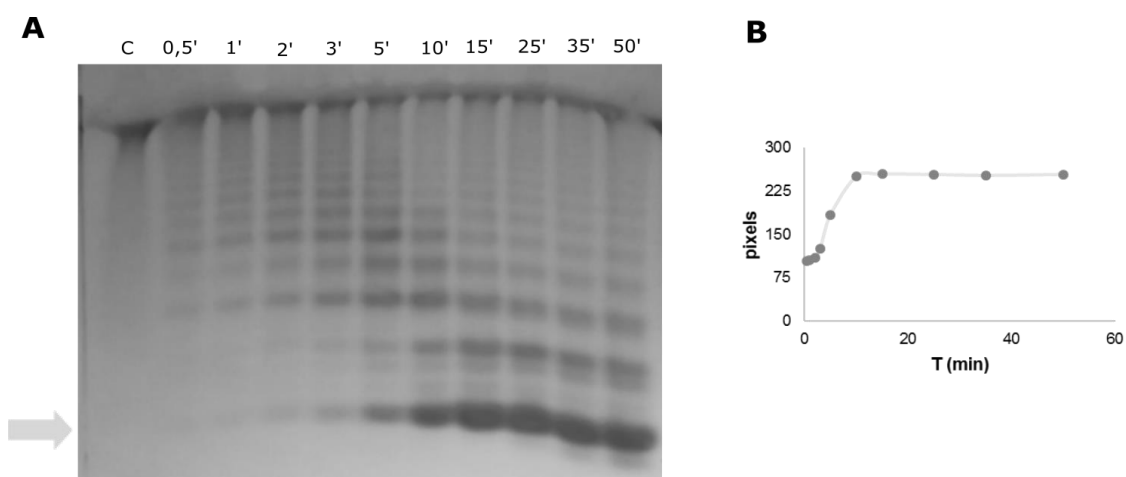


Figura 6.3. Determinación de la actividad fucoidanasa de la enzima #113643 con respecto al tiempo de reacción. A) C-PAGE de la siembra de las hidrólisis con distintos tiempos de incubación. El gel fue teñido con 0,03 % (p/v) de Alcian Blue. B) Análisis por densitometría de la banda de menor peso molecular obtenida en mayor proporción a medida que aumenta el tiempo (señalada con flecha verde).

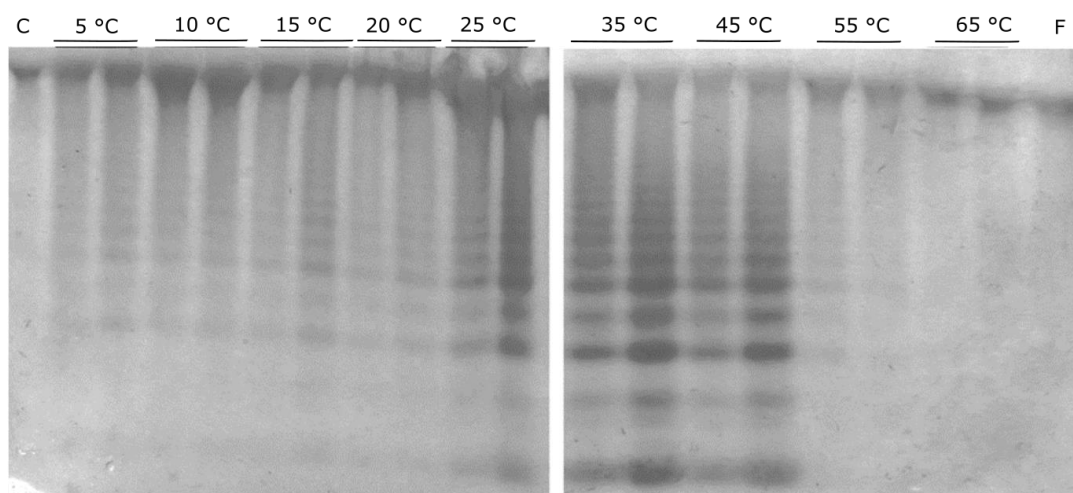
Temperatura

Se evaluó el efecto de la temperatura sobre la actividad fucanolítica durante breves períodos de tiempo (30 s y 1 min), a fin de minimizar el efecto de la temperatura sobre la desnaturalización de la enzima. El rango óptimo de actividad se encontró entre 25 y 45 °C (Figura 6.4. A y B). La enzima presentó actividad a la temperatura más baja

6. Caracterización de las enzimas purificadas

evaluada (5 °C), mientras que a temperaturas ≥ 55 °C se observó pérdida de la actividad, posiblemente como consecuencia de la desnaturalización de la enzima.

A



B

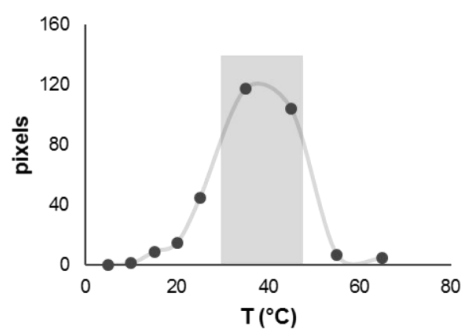


Figura 6.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad fucoidanasa de la enzima #113643. A) C-PAGE de las distintas reacciones. La calle a la izquierda de cada temperatura corresponde a un tiempo de incubación de 30 s mientras que la calle de la derecha es por 1 min. La calle C corresponde al control negativo (sin el agregado de la enzima, incubado 2 min), y la calle F corresponde a 150 μ g de fucoidano, sin incubación. El gel fue teñido con 0,03 % (p/v) de Alcian Blue. B) Análisis por densitometría de la banda de menor peso molecular visualizada en el gel. En sombreado se indica el rango óptimo de temperaturas (entre 25 – 45 °C).

pH

Al evaluar el patrón de bandas obtenido para los distintos valores de pH analizados, se observó que el rango óptimo en la actividad fucoidanasa se encuentra entre 6,5 y 8,5 (Figura 6.5.A) a una temperatura de reacción de 25 °C. En valores de pH por debajo de 4,5 y por encima de 9 no se observó degradación del sustrato **EFLO**. Mediante un análisis por densitometría de la banda de menor peso molecular obtenida, se visualiza claramente el efecto del pH en la escisión de los enlaces reconocidos por la

6. Caracterización de las enzimas purificadas

enzima para obtener en mayor proporción el oligosacárido con menor peso molecular (Figura 6.5.B).

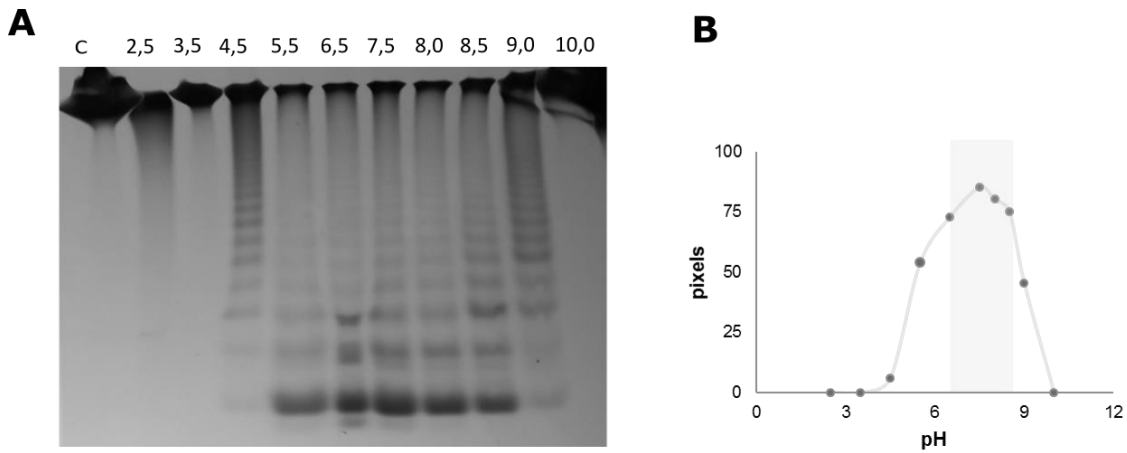


Figura 6.5. Efecto del pH en la actividad fucoidanasa de la enzima #113643 frente a fucoidanos de flotadores de *M. pyrifera*. A) C-PAGE de la siembra de las hidrólisis en los distintos pH. El gel fue teñido con 0,1 % (p/v) de azul de toluidina. B) Análisis por densitometría de la banda de menor peso molecular obtenida en mayor proporción. El sombreado indica el rango óptimo de pH (6,5 – 8,5).

Salinidad

Se evaluó la actividad enzimática en un amplio rango de salinidades y se observó que el rango óptimo en la actividad enzimática se encuentra entre 47,5 y 669,7 mM de NaCl (Figura 6.6. A y B) bajo condiciones de pH y temperatura de 7,5 y 25 °C, respectivamente. A la concentración de 861 mM, el grado de actividad fucoidanasa comienza a disminuir y a salinidades mayores la actividad se encuentra inhibida.

6. Caracterización de las enzimas purificadas

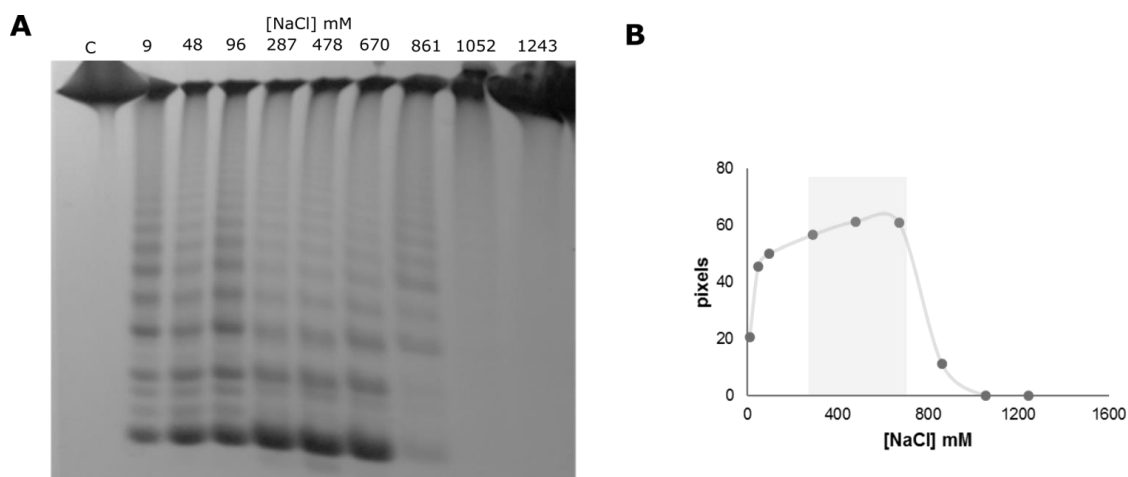


Figura 6.6. Efecto de la concentración de NaCl en la actividad fucoidanasa de la enzima #113643 frente a fucoidanos extraídos de flotadores de *M. pyrifera*. A) C-PAGE de la siembra de las hidrólisis con buffers de reacción con distintas concentraciones de NaCl. El gel fue teñido con 0,1 % (p/v) de azul de toluidina. B) Análisis por densitometría de la banda de menor peso molecular obtenida en mayor proporción. El sombreado indica el rango de salinidad óptimo para la actividad fucoidanasa (287 – 670 mM NaCl).

6.2.2. Obtención de productos de bajo peso molecular

Se realizó la incubación de la enzima #113643 frente a una fracción purificada de fucoidanos de flotadores de *M. pyrifera* (**F4FLO**) en el buffer de reacción 100 mM Tris-HCl (pH 7,5) y 500 mM NaCl. Los productos resultantes de dicha catálisis fueron tratados con etanol para precipitar oligosacáridos de mayor peso molecular, tal como se describe en la sección 2.11.5. de Materiales y Métodos. Aquellos productos de bajo peso molecular (LMWPs, de sus siglas *Low Molecular Weight Products*) que permanecieron solubles fueron recuperados. Dado el alto contenido de sales que inevitablemente acompañaba a los oligosacáridos (provenientes del buffer de reacción), el rendimiento no pudo ser calculado. Luego se efectuó la siembra de dicha mezcla en una columna de Bio-Gel P-6 a los fines de separar la mezcla en función de sus pesos moleculares, pero los bajos valores absorbancia dieron lugar a un perfil que no permitió obtener fracciones bien diferenciadas, revelando además un bajo rendimiento de la reacción.

En la segunda estrategia aplicada a gran escala, se incubó la enzima #113643 con mayor masa de fucoidanos provenientes del extracto de lámina de *M. pyrifera* (**ELAM**), utilizando un buffer de reacción con menor concentración de NaCl (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl), y agitación constante. La elección de **ELAM** como sustrato se debió a que no se disponía de cantidades suficientes de **F4FLO**, ni de su equivalente obtenido a partir de láminas (**F4LAM**), mientras que la reducción de la concentración de NaCl en

6. Caracterización de las enzimas purificadas

el *buffer* de reacción fue aplicada para disminuir el contenido de dicha sal en el producto final. Los productos de bajo peso molecular provenientes de la hidrólisis enzimática fueron sembrados en una columna Bio-Gel P-6. El perfil cromatográfico obtenido al medir azúcares totales en alícuotas de la solución eluída se indica en la Figura 6.7., en el cual se puede distinguir una fracción con productos que presentan mayores pesos moleculares y un pico bien definido correspondiente a una fracción de productos con menor peso molecular (sombreado en gris, Figura 6.7.).

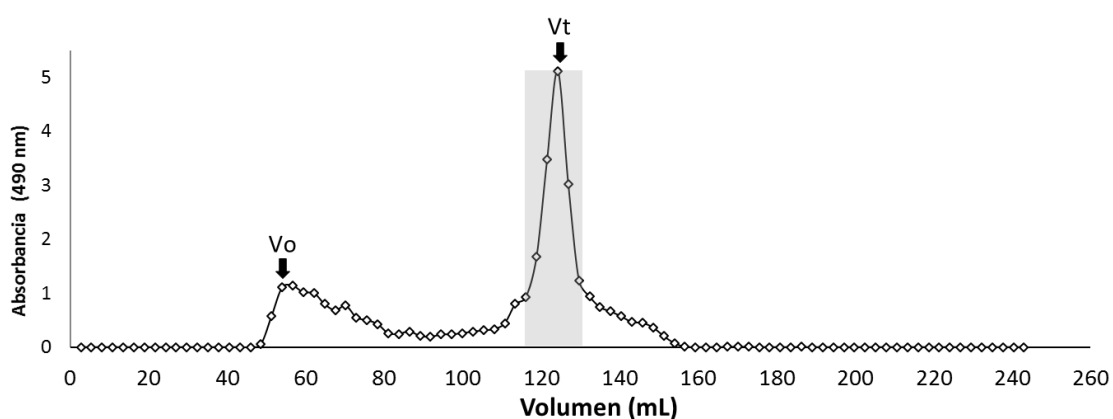


Figura 6.7. Perfil de cromatografía de exclusión por tamaño en columna de Bio-Gel P-6 de los productos de bajo peso molecular obtenidos tras hidrólisis de la enzima #113643 frente a fucoidanos del extracto ELAM de *M. pyrifera*. V₀: volumen muerto y V_t: volumen total. El sombreado indica la fracción correspondiente a los oligosacáridos de menor peso molecular obtenidos.

Con el objetivo de purificar los productos de bajo peso molecular, la fracción sombreada en la Figura 6.7. fue sembrada en una columna de Bio-Gel P-2. El perfil cromatográfico se obtuvo de la misma manera que para la columna anterior. Este perfil, el cual se puede observar en la Figura 6.8., mostró la presencia de un pico predominante seguido de una serie de picos de menor altura, los cuales contendrían oligosacáridos de menores pesos moleculares. Se realizó el ensayo de nitato de plata sobre alícuotas del volumen eluído, a los fines de poder visualizar la presencia de sales (NaCl) en las mezclas de oligosacáridos recuperadas a partir de la elución de la columna. La ausencia de ion Cl⁻ fue confirmada hasta los 73 mL, por lo cual los volúmenes correspondientes a los dos primeros picos del perfil fueron recuperados mediante evaporación al vacío, y denominados **F1-P2** y **F2-P2** (Figura 6.8.), cuyos rendimientos fueron 23,3 mg y 7,6 mg respectivamente.

6. Caracterización de las enzimas purificadas

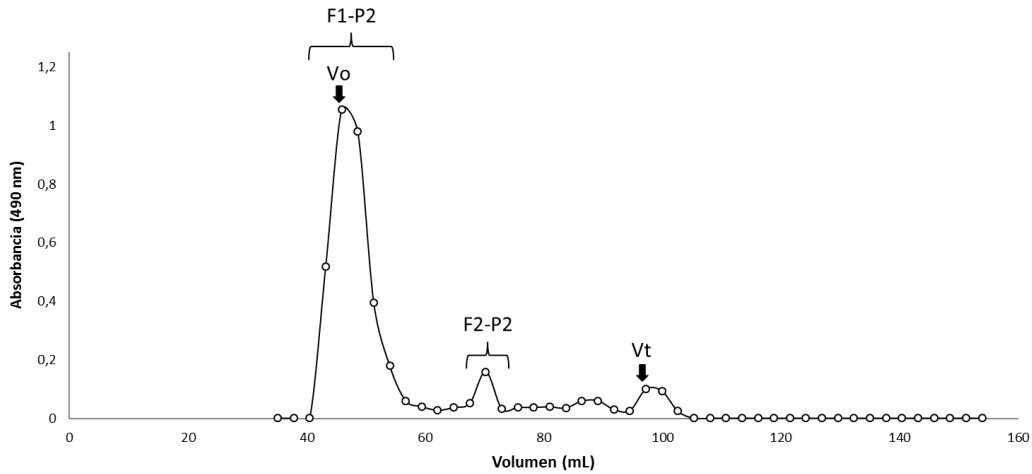


Figura 6.8. Perfil de cromatografía de exclusión por tamaño en columna de Bio-Gel P-2 de la fracción obtenida a partir de la columna de Bio-Gel P-6. V_0 : volumen muerto y V_t : volumen total.

El análisis de la composición de **F1-P2** mediante cromatografía gaseosa mostró a la fucosa como único componente, con un 46,7 % de éster sulfato. Ambas fracciones (**F1-P2** y **F2-P2**) fueron analizadas mediante GPC. El perfil cromatográfico de la fracción **F1-P2** mostró un pico principal y uno minoritario cuyos valores de tope de pico fueron 1828 Da y 721 Da respectivamente, mientras que los valores de \overline{M}_w fueron 1774 Da y 726 Da (Figura 6.9.a). En el caso de **F2-P2** también se observaron dos picos, uno mayoritario con un valor de tope de pico de 655 Da y el otro de menor altura con un valor de tope de pico de 381 Da (Figura 6.9.b). Los valores de \overline{M}_w en dicha fracción fueron 664 Da para el primer pico y 374 Da para el segundo.

6. Caracterización de las enzimas purificadas

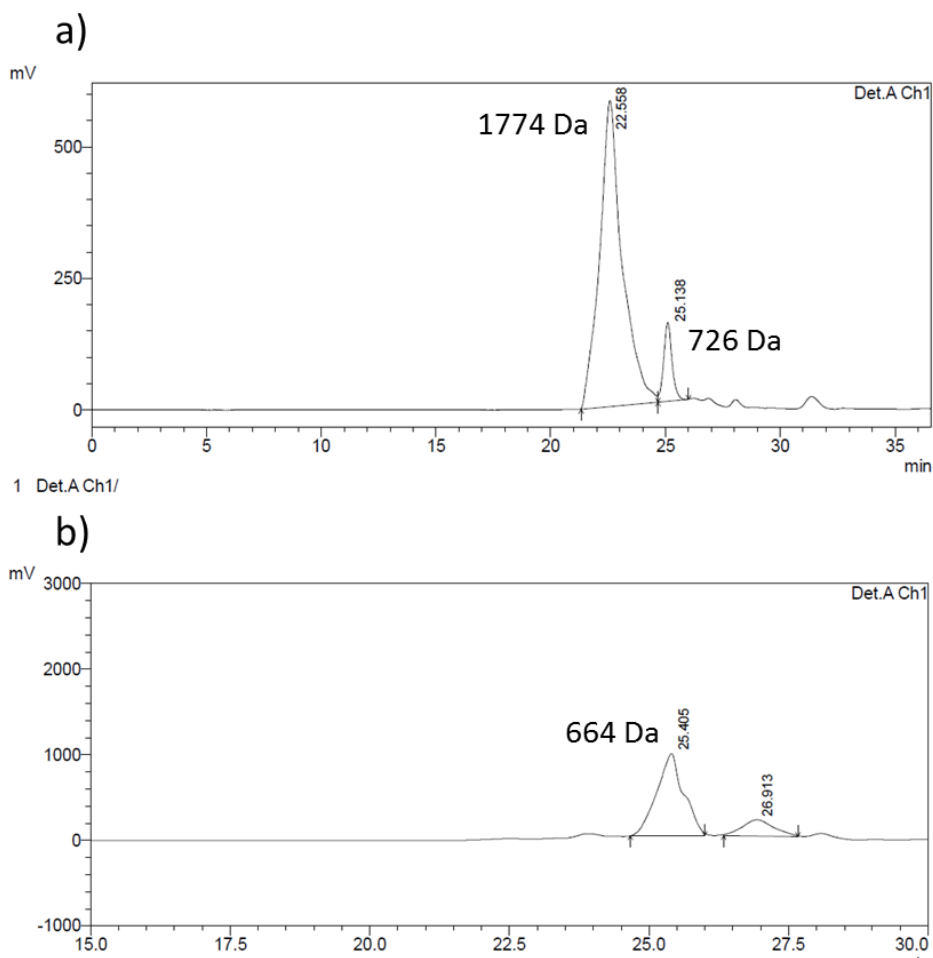


Figura 6.9. Perfil obtenido por cromatografía de permeación de geles (GPC) para la determinación del peso molecular de las fracciones a) F1-P2 y b) F2-P2. En ambos gráficos se indican los valores de \overline{M}_w (peso molecular promedio pesado).

Las fracciones F1-P2 y F2-P2, fueron además analizadas mediante RMN bidimensional (HSQC). Los espectros se presentan en la Figura 6.10. Los espectros de RMN de ambas fracciones mostraron señales correspondientes a residuos de α -L-Fucp constituyentes de oligosacáridos. Sin embargo, no resulta posible deducir una secuencia a partir de estos datos debido a que dichas fracciones, o por lo menos la fracción **F1-P2**, donde fue confirmado por espectrometría de masa, corresponde a una mezcla de oligosacáridos. **F1-P2** presentó una señal δ a 91,1/5,53 ppm correspondiente posiblemente al residuo extremo reductor α -(1 \rightarrow 3)-L-Fucp sulfatado en O-2 (Colin *et al.*, 2006; Silchenko *et al.*, 2013; Silchenko *et al.*, 2017), sin embargo, no se observó la señal del anómero β .

6. Caracterización de las enzimas purificadas

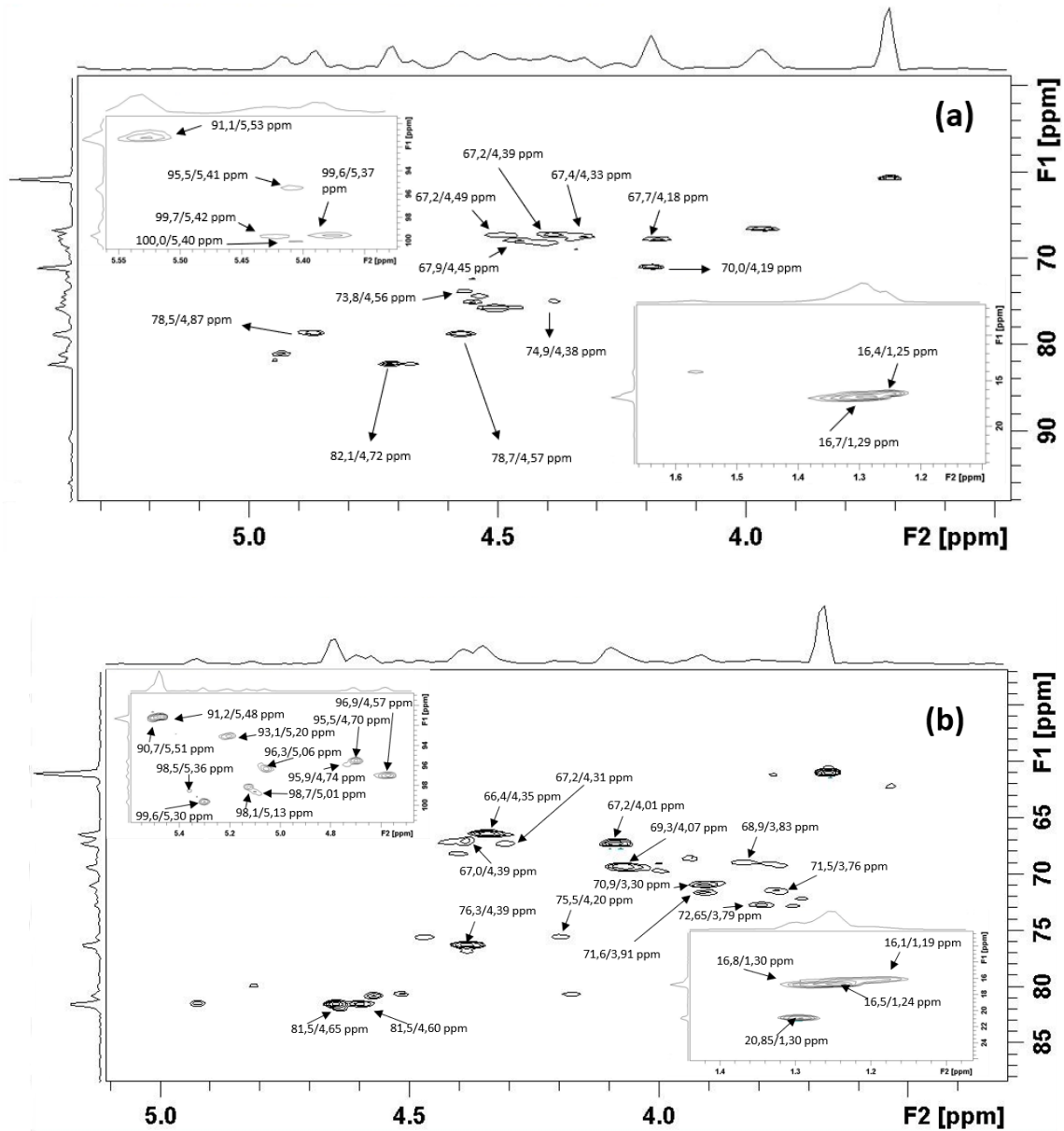


Figura 6.10. Espectros de RMN HSQC de las fracciones (a) F1-P2 y (b) F2-P2.

Las señales a 99,6/5,37 ppm y 100,0/5,40 ppm coincidieron con las informadas en bibliografía para $\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}2,4\text{SO}_3\text{-(1}\rightarrow$ y $\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}2\text{SO}_3\text{-(1}\rightarrow$, respectivamente (Silchenko, Rasin, Kusaykin *et al.*, 2018, Silchenko, Ustyuzhanina *et al.*, 2017, Trang *et al.*, 2022). Por otro lado, se observó también una señal a 95,5/5,41 ppm que según bibliografía, correspondería a unidades monosulfatadas enlazadas en posición 4: $\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}2\text{SO}_3\text{-(1}\rightarrow$ (Trang *et al.*, 2022). En el caso de la fracción **F2-P2** también pudieron observarse señales correspondientes a unidades de $\alpha\text{-L-Fucp}$. En este caso, se observaron ambas señales anoméricas para el extremo reductor (α/β) a 91,2/5,48 ppm correspondiente a la unidad $\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}2\text{SO}_3\text{-}$ y las señales a 95,5/4,70

6. Caracterización de las enzimas purificadas

ppm y 96,9/4,57 ppm asignadas según bibliografía al anómero β . La señal a 99,6/5,30 ppm indicó la presencia de $\rightarrow 3$)- α -L-Fucp2,4SO₃⁻-(1 \rightarrow), al igual que para **F1-P2**.

La fracción **F1-P2** fue analizada mediante espectrometría de masa ESI modo ion negativo. El espectro obtenido se presenta en la Figura 6.11. Los resultados son coincidentes con aquellos obtenidos en los análisis por GPC de dicha fracción. El espectro de la fracción mostró varias señales de iones, los cuales corresponderían a oligosacáridos de 3, 6 y 7 unidades de fucosa mono- y disulfatadas. Los iones de m/z 511,2925, 615,1726, 731,7430 y 934,0211 pudieron ser asignados a las posibles fórmulas [Fuc₃(SO₃Na)₆-2Na]²⁻, [Fuc₆(SO₃Na)₁₀-3Na]³⁻, [Fuc₇(SO₃Na)₁₂-3Na]³⁻ y [Fuc₆(SO₃Na)₁₀-2Na]²⁻ respectivamente.

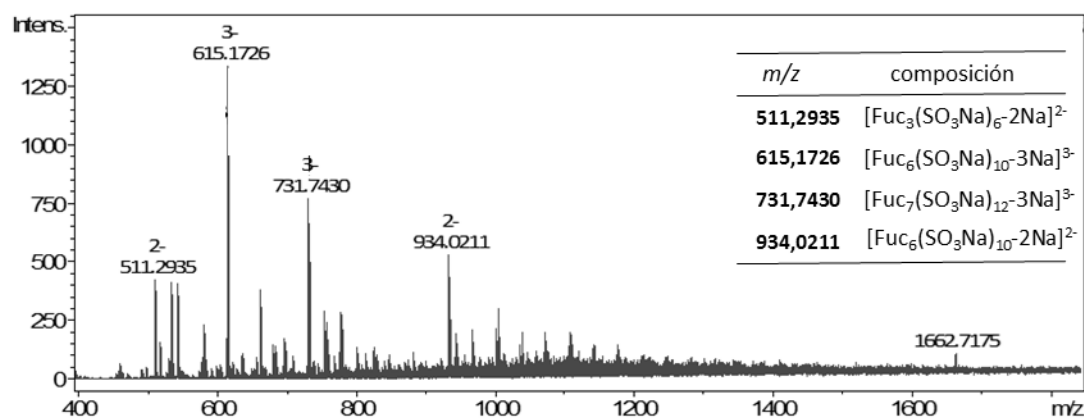


Figura 6.11. Espectro obtenido mediante espectrometría de masa ESI modo ión negativo de la fracción de oligosacáridos F1-P2, obtenida a partir de fucoidanos de *M. pyrifera* degradados por la enzima #113643.

6.3. DISCUSIÓN

Los fucoidanos de *M. pyrifera* y *U. pinnatifida* purificados durante el desarrollo de esta tesis, junto con aquellos provenientes de las especies *M. major*, *A. ensiformis*, *E. virescens*, *C. sinuosa*, *S. lomentaria* y de *A. utricularis*, fueron utilizados como sustratos en las determinaciones de actividad fucoidanasa de las enzimas anteriormente expresadas y purificadas.

La especie *M. pyrifera* domina la biomasa algal de Bahía Ushuaia, debido al tamaño que alcanza y por los grandes bosques submarinos que genera (Addami *et al.*, 1999). Las poblaciones de dicha especie pueden pasar por períodos de abundancia de biomasa y otros durante los cuales existe desprendimiento algal (Zaixso y Zaixso, 2015).

6. Caracterización de las enzimas purificadas

Es por ello que restos de esta alga comúnmente llegan a la zona intermareal como arribazones (Figura 6.12.A), depositándose o enterrándose en los sedimentos intermareales. En consecuencia, es de esperar que los microorganismos que habitan en los sedimentos utilizados para construir la biblioteca metagenómica se encuentren habitualmente expuestos a los fucoidanos de esta especie. Dada la falta de información acerca de la estructura de los fucoidanos de esta especie, como así también sobre posibles diferencias en la composición de los fucoidanos entre los distintos tejidos del alga, estos polisacáridos fueron extraídos como parte de este trabajo de Tesis a partir de tres partes del talo algal: flotadores, láminas y cauloides (Figura 6.12. B).



Figura 6.12. Especie *M. pyrifera*. A) Arribazón de *M. pyrifera* en sedimentos de Bahía Ushuaia (Foto: Hebe Dionisi); B) esquema de dicha especie donde se indican las distintas partes del talo algal: lámina, flotador y cauloides.

Al contrario de *M. pyrifera*, la especie *U. pinnatifida* se encuentra distribuida dentro y fuera del Golfo Nuevo, desde Mar del Plata (provincia de Buenos Aires) hasta Puerto Deseado (provincia de Santa Cruz) [Dellatorre *et al.*, 2014; Bunicontro *et al.*, 2018]. En consecuencia, las comunidades microbianas de los sedimentos de Bahía Ushuaia no se encuentran expuestas a esta especie, que además presenta fucoidanos de una estructura química particular (Zhao *et al.*, 2018). Sin embargo, el aprovechamiento comercial de la biomasa de *U. pinnatifida* resulta de particular interés dado que podría disminuir los efectos negativos de la invasión del alga en la región Patagónica, por lo que se utilizó como posible sustrato de las enzimas expresadas. Otras especies invasoras han sido consideradas como recurso para aplicaciones comerciales, como por ejemplo *Sargassum muticum* y *Asparagopsis armata* (Pinteus *et al.*, 2018).

6. Caracterización de las enzimas purificadas

Con respecto al resto de las especies de algas pardas cuyos fucoidanos fueron evaluados, *A. utricularis* es una pequeña alga parda que pertenece a la familia Adenocystaceae del orden Ectocarpales. Esta especie presenta una amplia distribución en el hemisferio sur, incluyendo ambientes subantárticos y antárticos (Gutkowski y Maleszewski, 1989; Luizzi *et al.*, 2011). De forma similar, *S. lomentaria* (Ectocarpales, Scytosiphonaceae) presenta una distribución mundial en ambientes fríos y templados-fríos, incluyendo a ambientes subantárticos de la Argentina (Luizzi *et al.*, 2011). Otra especie de amplia distribución y de hábito epifítico es *C. sinuosa* (Ectocarpales, Scytosiphonaceae), y los fucoidanos sintetizados por esta especie de estructura globosa han sido escasamente estudiados. Las especies *M. pyrifera*, *S. lomentaria*, *C. sinuosa* y *A. utricularis* podrían encontrarse en los sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia de acuerdo a la distribución geográfica reportada para estas especies (Boraso y Zaixso, 2008; Luizzi *et al.*, 2011; Asensi y Kupper, 2012). En este contexto, resulta esperable que determinadas poblaciones bacterianas que habitan en los sedimentos intermareales del sitio estudiado se encuentren adaptadas para la asimilación de los fucoidanos de estas especies nativas del sitio. Sin embargo, las mismas podrían utilizar enzimas de familias aún no descritas de fucoidanasas, no estar presentes en el sitio, o no estar representadas en el set de datos metagenómico utilizado. Las enzimas fucoidanasas suelen estar presentes en organismos altamente especializados en la utilización de fucoidanos como fuente de carbono y energía (Sichert *et al.*, 2020) formando parte de nichos ecológicos específicos (Schultz-Johansen *et al.*, 2018).

Las especies *M. major* y *A. ensiformis*, ambas pertenecientes al orden Ectocarpales y a la familia Chordariaceae, presentan una distribución geográfica más restringida, siendo el Golfo San Jorge la ubicación más al sur identificada desde el Golfo San Matías (Luizzi *et al.*, 2011). Por último, para la especie *E. virescens* existen escasos reportes sobre su distribución, no siendo claro el rango de latitudes en el cual se encuentra, pudiendo ser desde el Golfo Nuevo hasta la Ría Deseado, Provincia de Santa Cruz (Asensi y Kupper, 2012). La estructura química de los fucoidanos de estas tres especies de algas pardas aún es desconocida, dado que no existen trabajos publicados sobre los fucoidanos que producen. Sin embargo, Ezequiel Latour se encuentra estudiando los fucoidanos de las especies *M. major*, *A. ensiformis*, *E. virescens*, *C.*

6. Caracterización de las enzimas purificadas

sinuosa como parte de su tesis doctoral (Latour, 2022), por lo que se espera que exista más información sobre los fucoidanos de estas especies en el futuro.

El análisis de actividad enzimática demostró que la enzima #113643 cataliza la despolimerización de los fucoidanos extraídos a partir de flotadores, láminas y cauloides de *M. pyrifera*. Dichos extractos no presentaron diferencias significativas con respecto a su composición química aunque no es posible asegurar su similitud estructural, por lo que resulta necesario la realización de estudios estructurales más detallados de los extractos **EFLO** y **ECAU**.

Por otro lado, los fucoidanos de *U. pinnatifida*, *A. utricularis* y *S. lomentaria* presentan el tipo de unión α -(1→3)- en la cadena central, pero la enzima #113643 no presentó actividad frente a ninguno de estos sustratos. Las estructuras de los fucoidanos de las especies anteriormente mencionadas han sido publicadas anteriormente. La especie *A. utricularis* produce dos tipos diferentes de fucoidanos, un galactofucano y un uronofucoidano, de los cuales el primero presenta actividad antiviral y una estructura central de α -L-Fucp con uniones α -(1→3)- (Ponce *et al.*, 2003). De forma similar, *S. lomentaria* (Ectocarpales, Scytosiphonaceae) contiene diferentes tipos de fucoidanos, incluyendo un galactofucano con uniones α -(1→3)- con actividad antiherpética (Ponce *et al.*, 2019). Además, en los fucoidanos de ambas especies anteriormente mencionadas se observó la presencia de grupos acetilos (Ponce *et al.*, 2019; Syntsyra *et al.*, 2010; Vishchuk *et al.*, 2011) característica que no fue observada en los fucoidanos de *M. pyrifera* evaluados en este estudio. Dado que no existen reportes de la estructura química para los fucoidanos evaluados de las especies de algas pardas restantes, en estos casos la ausencia de actividad de la enzima #113643 posiblemente se deba a que el tipo de enlace no es reconocido, o bien por los patrones de sustituciones y/o ramificaciones que presentan.

La ausencia de actividad de las tres enzimas restantes frente a los sustratos evaluados podría deberse a que reconozcan un determinado patrón de enlaces y/o ramificaciones y sustituciones que no se encuentran presentes en los sustratos utilizados. Es posible que la presencia de determinadas sustituciones impida la actividad enzimática, situación que ha sido observada en la enzima fucoidanasa FFA2, la cual resultó activa frente a un sustrato al cual se le habían removido los grupos acetilo,

6. Caracterización de las enzimas purificadas

mientras que no presentó actividad frente al sustrato en su forma original (Silchenko *et al.*, 2013). Por otro lado, estudios realizados en otras enzimas fucoidanasas han demostrado dependencia en su actividad frente de determinados cationes divalentes (Vuillemin *et al.*, 2020; Zueva *et al.*, 2020; Trang *et al.*, 2022), o bien, un aumento en su actividad (Silchenko, Rasin *et al.*, 2017). El efecto de diversos cationes (p.ej. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}) sobre la actividad de dichas enzimas debe aún ser investigado.

Tanto la representación de bacterias con potencial para asimilar fucoidanos, como de la diversidad estructural de los fucoidanos de especies de macroalgas presente en Bahía Ushuaia incluídas en este trabajo, son parciales. Por ejemplo, en una revisión de Liuzzi y colaboradores (Liuzzi *et al.*, 2011), los autores reportan la presencia de al menos 26 especies de algas pardas a 54° de latitud sur, es decir, en las costas de Tierra del Fuego. Similarmente, el *set* de datos metagenómico analizado, debido a la presencia de miles de especies microbianas en la muestra, sólo representa parcialmente el potencial metabólico de los sedimentos. Por otra parte, debido al desconocimiento de la diversidad de secuencias de enzimas fucoidanasas, que probablemente incluya familias aún no descritas, dificulta la identificación de secuencias putativas en los *sets* de datos metagenómicos. En consecuencia, será necesario incrementar el análisis con respecto al número de secuencias analizadas, el número de *sets* de datos metagenómicos, el número de secuencias analizadas, el número de familias de glicósido hidrolasas con actividad fucoidanasa, como así también la diversidad estructural de los fucoidanos de especies de algas pardas de la región, a fin de identificar un mayor número de enzimas fucoidanasas y conocer su especificidad de sustrato.

Con respecto a la enzima #113643, utilizando los fucoidanos provenientes de flotadores de *M. pyrifera* como sustrato, la misma mostró actividad en un amplio rango de temperaturas, entre 5 y 45 °C. La capacidad para degradar el sustrato a bajas temperaturas difirió de otras enzimas fucoidanasas estudiadas hasta el momento, donde la temperatura más baja evaluada a la que presentaron actividad fue mayor a 15 °C (Sakai *et al.*, 2004; Silchenko, Ustyuzhanina *et al.*, 2017; Silchenko *et al.*, 2013). El rango de temperaturas que presentó la enzima #113643 se corresponde con características de enzimas provenientes de microorganismos psicrófilos (Collins y Gerday, 2017). Por otro lado, este resultado es concordante con las características del

6. Caracterización de las enzimas purificadas

sitio del cual proviene la muestra ambiental, en donde la temperatura media anual del agua de mar superficial es de 7 °C (valor extraído del Centro Argentino de Datos Oceanográficos, Servicio de Hidrografía Naval, Argentina, <http://www.hidro.gob.ar/ceado/Ef/Inventar.asp>).

Bahía Ushuaia, con una superficie aproximada de 24 km², recibe aportes estacionales de agua dulce producto del deshielo, como así también la descarga de ríos y arroyos, lo cual genera variaciones en la salinidad (Dionisi *et al.*, 2011; Amin *et al.*, 2010), pudiendo ser inferior a la concentración habitual del agua de mar. El rango de salinidad presente en Bahía Ushuaia oscila entre 15 y 32 ups (unidades prácticas de salinidad) en primavera y en verano respectivamente (Amin *et al.*, 2010). Además de las variaciones estacionales, las comunidades microbianas presentes en los sedimentos intermareles están expuestas a cambios en las condiciones físico-químicas debido a los ciclos de marea, donde pueden ocurrir variaciones drásticas en la salinidad (Okamoto *et al.*, 2022). Estas variaciones podrían estar relacionadas con la capacidad de la enzima para actuar en condiciones de salinidad relativamente bajas (9,5 mM) pudiendo tolerar hasta casi el doble de los valores de salinidad obtenidos para dicho ambiente (861 mM). Esta es una propiedad catalítica de gran utilidad dado que permite su uso industrial bajo diversas condiciones (Margesin y Schinner, 2001). El efecto de las concentraciones de NaCl sobre la actividad enzimática no ha sido estudiado en profundidad para la mayoría de las enzimas fucoidanasas, aunque algunas de ellas mostraron concentraciones óptimas de NaCl por debajo de los valores de salinidad del agua de mar, entre ellas Fhf2 de *F. haliotis* (Trang *et al.*, 2022) y las enzimas Fda1 y Fda2 de *Alteromonas* sp. SN-1009 (Sakai *et al.*, 2004).

La enzima fucoidanasa #113643 identificada en el metagenoma de Bahía Ushuaia presentó una alta actividad frente a los fucoidanos de *M. pyrifera* aún utilizando cortos períodos de incubación, mientras que las enzimas descritas hasta el momento presentan niveles de actividad enzimática más bajos, y como consecuencia, dichas reacciones enzimáticas debieron ser realizadas en períodos de tiempo prolongados, donde el tiempo mínimo al que se observó gran parte del fucoidano degradado fue mayor a 60 minutos (Colin *et al.*, 2006; Descamps *et al.*, 2005; Silchenko *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2022; Trang *et al.*, 2022). En este trabajo el menor tiempo de actividad

6. Caracterización de las enzimas purificadas

evaluado donde la enzima exhibió actividad fue de 30 s, observándose un alto grado de degradación a partir de los 10 min. Esta característica junto con la actividad en un amplio rango de pH (4,5 - 9), salinidad (9,5 – 861 mM) y temperatura (5 – 45 °C), hacen de la enzima #113643 una enzima activa en un amplio rango de condiciones, y por ende con gran potencial para la producción de fuco-oligosacáridos a partir de fucooidanos de *M. pyrifera*.

Los productos de bajo peso molecular obtenidos a partir de la hidrólisis de la enzima #113643 consistían en oligosacáridos altamente sulfatados, de 3, 6 ó 7 unidades de fucosa mono- y disulfatadas. Es posible que el oligosacárido con tres monómeros sea el tamaño del producto mínimo resultante de la hidrólisis enzimática de #113643, sin embargo, resulta necesario su comprobación mediante la incubación de dicha enzima con el trisacárido obtenido, tal como se ha aplicado en la enzima FFA1 frente al tetrasacárido obtenido luego de su degradación (Silchenko *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos a partir del análisis de los productos de bajo peso molecular obtenidos, complementaron la información obtenida sobre la estructura del fucoidano nativo proveniente de láminas (**ELAM**), donde se observó que la presencia de unidades de fucosa enlazadas en uniones α -(1→3)- y α -(1→4)-. Sin embargo, no fue posible establecer una secuencia de monosacáridos para el fucoidano, por lo que hay detalles de la especificidad de la enzima #113643 que no pudieron ser determinados, tal como el tipo de enlace que reconocería.

Los resultados obtenidos señalan que la despolimerización de fucooidanos utilizando la enzima #113643 constituye una herramienta de suma utilidad para la producción de fuco-oligosacáridos altamente sulfatados con potenciales aplicaciones biomédicas, a partir de la biomasa de *M. pyrifera*, como así también una herramienta valiosa en los análisis de elucidación de la compleja estructura de los fucooidanos potencialmente bioactivos aislados de dicha especie.

7. DISCUSIÓN GENERAL



7. Discusión general

En el presente trabajo de Tesis, la hipótesis establecía que la bioprospección de enzimas fucoidanasas en un ambiente costero con gran diversidad y abundancia de algas pardas, tal como lo es Bahía Ushuaia, contendrá una alta abundancia de organismos capaces de degradar fucoidanos, facilitando el estudio de dichos microorganismos. Por un lado, los *sets* de datos metagenómicos de ambientes diversos como sedimentos costeros no representan el potencial metabólico completo de la comunidad microbiana y suelen tener una baja cobertura de análisis, representando mayormente poblaciones microbianas más abundantes en la comunidad (Loviso *et al.*, 2015; Guibert *et al.*, 2016; Matos *et al.*, 2016). Por otro lado, se ha reportado que la capacidad para degradar fucoidanos no está siendo muy extendida en las comunidades microbianas de ambientes marinos, siendo poco frecuente su detección en muestras ambientales (Giljan *et al.*, 2023). En este contexto, es de esperar que esta capacidad no se encuentre muy extendida dentro de la comunidad. Por lo tanto, al utilizar un *set* de datos metagenómicos de una comunidad microbiana que debería estar naturalmente enriquecida para dicha capacidad aumenta la probabilidad de identificar secuencias de interés. De hecho, aún con un alto porcentaje de secuencias completas y casi 700.000 secuencias codificantes, los genes homólogos a la única familia definida de fucoidanasas hasta el año 2020 resultó ser poco abundante en el *set* de datos.

Recientemente, en el laboratorio se realizaron experimentos de enriquecimientos de sedimentos de Bahía Ushuaia con láminas de *M. pyrifera*, reportándose cambios importantes en las características físico-químicas y en la estructura de la comunidad microbiana del sedimento (Lozada *et al.*, 2023). El estudio del metagenoma de la comunidad enriquecida mostró una alta abundancia de secuencias putativas de fucoidanasas de las familias analizadas en esta tesis, provenientes mayormente a organismos de más rápido crecimiento, como miembros de los *phyla* Bacteroidota y Pseudomonadota, con pocas secuencias asignadas al *phylum* Plantomycetota.

En Bahía Ushuaia, las comunidades microbianas se encuentran expuestas a condiciones extremas, siendo probable que contengan un alto grado de plasticidad genética, característica que hace a dichas comunidades, una fuente de enzimas novedosas, activas y estables en una amplia gama de condiciones (Kamble y Vavilala,

7. Discusión general

2018). En la Figura 1.7. se resumen las distintas etapas de la estrategia de bioprospección aplicada.

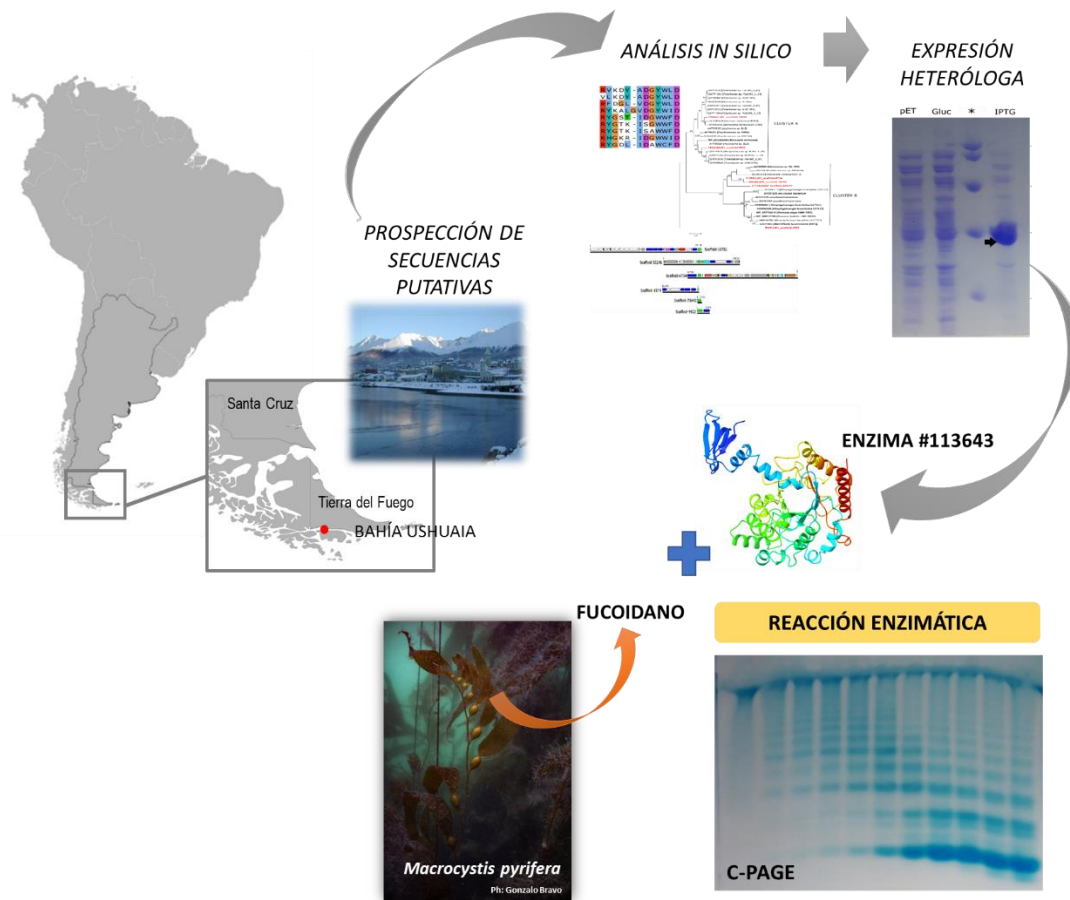


Figura 7.1. Pasos implicados en la prospección de secuencias de enzimas fucoidanasas, su expresión heteróloga y caracterización, como así también el aislamiento y purificación de fucoidanos y oligofucoidanos provenientes de *M. pyrifera*.

Las características ambientales de Bahía Ushuaia, sitio del cual proviene la muestra de sedimento a partir del cual se generó el set de datos metagenómico, se caracteriza por presentar un clima húmedo templado-frío, altos niveles de radiación UV-B e importantes y variables aportes de agua dulce desde el continente, lo cual repercute en las características fisicoquímicas (Diaz *et al.*, 2006; Amin *et al.*, 2010; Dionisi *et al.*, 2011). Todas estas características ambientales resultan en una presión de selección para las poblaciones microbianas allí presentes, las cuales deben adaptarse a las fluctuaciones del lugar dado que repercuten directamente en su metabolismo. Los cambios en la temperatura y/o salinidad resultan más marcados en los sedimentos intermareales debido a los ciclos de marea, por lo que dichas poblaciones estarían expuestas a cambios aún más extremos. Se ha reportado además la presencia de

7. Discusión general

contaminantes en Bahía Ushuaia, tanto en lo que se refiere a hidrocarburos como a altas concentraciones de nutrientes debido a la presencia de efluentes domésticos e industriales no tratados (Diodato *et al.*, 2020).

Dado que solo un pequeño porcentaje de las bacterias marinas pueden ser cultivadas en el laboratorio (Rodrigues *et al.*, 2022), la estrategia metagenómica utilizada permitió evaluar el potencial para degradar fucoïdanos de las comunidades microbianas en estudio, sin una etapa de cultivo previa. Los resultados de prospección de secuencias homólogas a enzimas fucoïdanas mediante HMMs sugieren la presencia de una amplia diversidad de organismos con potencial degradador de fucoïdanos pertenecientes a varios *phyla*. Una limitación importante de este enfoque se encuentra relacionada con la escasez de enzimas fucoïdanasas que conforman familias GH107 y GH168, y más aún el reducido número de enzimas caracterizadas bioquímicamente (33,3 % para enzimas GH107 y 1,9 % para GH168; Qiu *et al.*, 2022) y estructuralmente (5,5 % para enzimas GH107 y 1,9 % para GH168). El bajo número de secuencias de referencia afecta directamente la calidad de los perfiles que se construyen a partir de ellas, por lo que resulta probable que los HMMs utilizados para la bioprospección no hayan resultado lo suficientemente abarcativos. A pesar de dichas limitaciones, los resultados de este trabajo indicarían la existencia de miembros de la comunidad microbiana con potencial para metabolizar fucoïdanos, particularmente la presencia de un microorganismo que pertenecería al *phylum* Planctomycetota con capacidad para degradar fucoïdanos de *M. pyrifer*.

Estudios realizados por Sichert y colaboradores (Sichert *et al.*, 2020), sugieren que la degradación microbiana de los fucoïdanos es más lenta que la de otros polisacáridos, por lo que dichos polisacáridos actúan como secuestradores de carbono a largo plazo en los ambientes marinos. Particularmente para los sedimentos marinos, se ha encontrado que los fucoïdanos pueden persistir durante siglos (Salmeán *et al.*, 2022; Vidal-Melgosa *et al.*, 2022). Esto probablemente se deba a la complejidad estructural característica de dichos polisacáridos, la cual requeriría de la acción de múltiples enzimas para su degradación a monómeros de fucosa, incluyendo enzimas que catalizan la ruptura de enlaces de la cadena central y enzimas con función desramificante (Silchenko *et al.*, 2022). Los mismos investigadores reportaron que el

7. Discusión general

organismo *Lentimonas* sp. CC4 (Verrucomicrobiota), utiliza alrededor de 100 enzimas para degradar las moléculas de fucoidanos, demostrándose la expresión de tres enzimas fucoidanasas. En cambio, se ha reportado que para la degradación de otros polisacáridos presentes en algas pardas, tal como laminarano (polisacárido de reserva) se requiere la acción de solo tres enzimas para su degradación completa en cuestión de horas (Kappelmann *et al.*, 2019; Becker *et al.*, 2020; Kruger *et al.*, 2019). Por lo tanto, los fucoidanos pueden ser degradados por microorganismos altamente especializados en el uso de dichos polisacáridos como fuente de carbono (Buck-Wiese *et al.*, 2022), o bien, podría involucrar múltiples enzimas producidas por distintos organismos de una comunidad microbiana. Hasta el momento existen muy pocos microorganismos aislados que puedan degradar por completo los fucoidanos, y las enzimas identificadas en general exhiben baja actividad (Kusaykin *et al.*, 2018; Nagao *et al.*, 2018; Qiu *et al.*, 2022; Shen *et al.*, 2020). Los microorganismos aislados solo pueden producir fucoligosacáridos con una degradación de alrededor del 60 % (Sakai *et al.*, 2003; Barbeyron *et al.*, 2008; Silchenko *et al.*, 2013; Sichert, 2019; Schultz-Johansen *et al.*, 2018; van Vliet *et al.*, 2019). Por otro lado, existen muy pocos estudios sobre las enzimas que actúan sobre los enlaces internos de los fucoidanos. Esto posiblemente se deba a la falta de un método cuantitativo para la determinación de la actividad como así también al bajo número de sustratos caracterizados estructuralmente (Imbs *et al.*, 2018).

Los microorganismos con capacidad para degradar fucoidanos cuya actividad fucoidanasa ha sido corroborada y caracterizada bioquímicamente, pertenecen a los *phyla* Bacteroidota y Pseudomonadota. La mayoría de las secuencias de fucoidanasas putativas identificadas en el metagenoma de Bahía Ushuaia para ambas familias GH pertenecerían a organismos del *phylum* Planctomycetota, constituyendo el grupo taxonómico principal con potencial degradador de fucoidanos en sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia. Específicamente en el caso de la enzima #113643, pertenecería a un organismo del *phylum* Planctomycetota, presentando un elevado porcentaje de identidad a nivel de nucleótidos (84,46 %) y de cobertura (98 %) con la secuencia más cercana presente en las base de datos, la cual pertenece a la especie *P. bacterium* CA13 (No. acceso TWT80423). La especie *P. bacterium* CA13 fue identificada en una muestra de biofilm proveniente de *M. pyrifera* presente en la Bahía de

7. Discusión general

Monterrey (California, EEUU, Wiegand *et al.*, 2020). Son numerosos los trabajos que resaltan el gran potencial degradador de polisacáridos sulfatados de macroalgas que presentan microorganismos pertenecientes al superphylum PVC, lo cual se debe a su alta abundancia de enzimas sulfatasas (Martin *et al.*, 2015; Gobet *et al.*, 2018; Van vliet *et al.*, 2019). Las enzimas sulfatasas parecerían desempeñar un papel clave en la degradación de los fucoidanos, lo cual se ve respaldado en los resultados del análisis del contexto genómico donde se identificó un gran número de secuencias putativas de enzimas sulfatasas próximas a las fucoidanasas putativas. Ambas enzimas fucoidanasas y sulfatasas se expresan en algunas bacterias, tal como en *Lentimonas sp.*, *F. algae* y *M. eckloniae* (Sichert *et al.*, 2020; Silchenko, Rasin *et al.*, 2017; Tran *et al.*, 2022). En este contexto, la presencia de genes putativos de enzimas sulfatasas sugiere un cierto grado de especialización en el uso de fucoidanos como fuente de carbono de dichos microorganismos aún no cultivados de este ambiente.

El alga parda *M. pyrifera* es la especie de macroalga más grande reportada y con una elevada tasa de crecimiento (Ravanal *et al.*, 2017), generando densos bosques característicos de Tierra del Fuego (Plana *et al.*, 2007). Sin embargo, la diversidad y la capacidad metabólica de bacterias que ciclan el carbono de la biomasa generada por dicha especie es poco conocido (Lozada *et al.*, 2023). El análisis estructural de la fracción purificada **F4LAM** sugiere que los fucoidanos contendrían residuos de fucosa unidos por medio de enlaces α -(1→3)- y α -(1→4)- con predominancia del primer tipo de enlace. Especies pertenecientes al orden Laminariales generalmente contienen fucoidanos con el tipo de enlace α -(1→3)- (Zvyagintseva *et al.*, 2021), mientras que en los fucoidanos de especies pertenecientes al orden Fucales se encuentran los enlaces α -(1→3)- y α -(1→4)- (Mazéas *et al.*, 2023). Los resultados de este trabajo sugieren que la especie *M. pyrifera* contendría fucoidanos con estructura semejante al de especies del orden Fucales. Se han publicado numerosas excepciones a dicha asociación (Usoltseva *et al.*, 2016; Usoltseva *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2020; Jayawardena *et al.*, 2022), por lo que la categorización y predicción de la posible estructura en función del orden taxonómico resulta muy poco claro. Por otro lado, se ha reportado que en especies del orden Laminariales, la concentración y la estructura de los fucoidanos puede variar por factores ambientales, estaciones, etapa del ciclo de vida y del tejido implicado (Bruhn *et*

7. Discusión general

al., 2017). Recientemente ha sido publicado un trabajo con la estructura de los fucoidanos de *M. pyrifera* (Zou *et al.*, 2021), sin embargo el mismo posee importantes errores en la asignación de las señales de RMN, sugiriendo la presencia de enlaces β -L-Fucosa, además de α -L-fucosa en la cadena principal.

La mayoría de las enzimas fucoidanasas caracterizadas catalizan la hidrólisis de enlaces α -(1 \rightarrow 4)-, mientras que las enzimas que reconocen enlaces α -(1 \rightarrow 3)- se encuentran aún poco representadas. Se ha sugerido que las variaciones encontradas en uno de los residuos propuestos como catalíticos que conforman el subsitio -1, podría estar relacionado con el reconocimiento de enlaces α -(1 \rightarrow 3)- ó α -(1 \rightarrow 4)- (Tran *et al.*, 2021). En el caso de la enzima #113643, presentó todos los residuos catalíticos conservados a excepción del residuo en la posición 186, en donde se ubica el residuo alanina. La enzima fucoidanasa que presentó dicho aminoácido en el subsitio -1 es Fda2 perteneciente a *Alteromonas* sp. SA-1009 (Sakai *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2021), siendo una de los dos únicos miembros de la familia GH107 conocidos con especificidad de enlace α -(1 \rightarrow 3)-. El restante miembro es la enzima Mef2 de *M. eckloniae* (Tran *et al.*, 2022), sin embargo dicha enzima presenta una tercer variante en dicha posición (S), mientras que las fucoidanasas con especificidad de enlace α -(1 \rightarrow 4)- presentan el aminoácido asparagina (N) en dicha posición. En este contexto, la contribución del residuo ubicado en esta posición aún no resulta del todo claro dado el reducido número de enzimas que presentan dichas variaciones.

El análisis estructural preliminar de los productos resultantes de la catálisis de la enzima #116343 respaldan los resultados obtenidos a partir de la caracterización del polisacárido de que los fucoidanos de *M. pyrifera* estarían conformados por ambos tipos de uniones glicosídicas α -(1 \rightarrow 3)- y α -(1 \rightarrow 4)-, sin embargo al no haberse podido obtener información acerca de la secuencia de los residuos de fucosa, el tipo de enlace reconocido por la enzima no pudo ser determinado. Los productos de bajo peso molecular que conformaron la fracción **F1-P2** resultaron ser significativamente más sulfatados (46,7 %, Tabla 7.1.) en comparación con el extracto de fucoidanos nativo sin digerir (29,4 %), sugiriendo que la enzima presenta preferencia de enlaces entre unidades de fucosas sulfatadas (Tabla 7.1.).

7. Discusión general

Tabla 7.1. Características químicas de fucoïdanos del extracto de lámina (ELAM) y de la fracción purificada de oligosacáridos (F1-P2) proveniente de la degradación enzimática de dicho extracto de *M. pyrifera*.

Muestra	Peso molecular (kDa)*	Rendimiento (%)	Sulfato (% SO ₃ Na)	Fucosa (mol %)
ELAM	864,12	6,0	29,4	83,4
F1-P2	1,82	11,6	46,7	100,0

* Se indica el valor del tope de pico del pico principal obtenido por GPC.

Como resultado de la hidrólisis, se obtuvieron productos con diferentes grados de polimerización, con unidades de fucosa con una o dos posiciones sustituidas por ésteres sulfato. Estas variaciones en el grado de polimerización de los oligosacáridos resultantes de la catálisis, fue observado en otras enzimas fucoïdanasas (Colin *et al.*, 2006; Silchenko, Rasin *et al.*, 2017; Cao *et al.*, 2018; Vuillemin *et al.*, 2020; Trang *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2023), pudiendo estar relacionado con la selectividad catalítica que presentan. El producto dominante de la degradación enzimática de #113643 de bajo peso molecular, presentó una relación m/z de 615,17 correspondiendo a un hexasacárido con unidades de fucosa mono- y disulfatadas y con la posible composición [Fuc₆(SO₃Na)₁₀-3Na]³⁻. Los rendimientos de los LMWPs obtenidos fueron 11,65 % para la fracción **F1-P2** y 3,35 % para **F2-P2**. Los bajos porcentajes obtenidos podrían deberse a que pudo haber pérdida de masa durante la etapa de desalinización, situación que ha sido evitada en otros trabajos mediante el uso de un *buffer* constituido por bicarbonato de amonio (Ropartz *et al.*, 2022), el cual al ser volátil resulta compatible con estudios de espectrometría de masa. En este contexto, podrían evaluarse otras composiciones del *buffer* de reacción para la obtención de un mayor rendimiento de LMWPs, por ejemplo: un *buffer* con contenido de fosfato o bicarbonato, y que a su vez presente baja concentración de NaCl, considerando que la enzima #113643 resultó activa aún en bajas concentraciones de dicha sal.

Las restantes tres enzimas expresadas y purificadas no evidenciaron actividad enzimática en los distintos sustratos evaluados. La ausencia de actividad enzimática frente a la diversidad de sustratos evaluados pudo deberse a varios motivos. Uno de ellos podría estar relacionado con la obtención de proteínas solubles pero inactivas luego de su expresión heteróloga y purificación. Es común que secuencias expresadas

7. Discusión general

en *E. coli* resulten en proteínas mal plegadas y por lo tanto inactivas (Gabor *et al.*, 2004; Ko *et al.*, 2021). La generación de proteínas trucas, donde se han eliminando dominios no implicados en la actividad fucoidanasa podría ser una posible estrategia a evaluar a futuro. Dicha situación se observó en la expresión de las enzimas fucoidanasas Fp273, Fp277 y Fp279 (Schultz-Johansen *et al.*, 2018), donde la obtención de una proteína activa se logró mediante la remoción de módulos no implicados en la catálisis. También podría deberse a que los sustratos no puedan ser reconocidos por las enzimas, como consecuencia de sus patrones de sustitución y ramificación, los cuales representan una barrera estructural para que la enzima actúe (Labourel *et al.*, 2016). La estructura química de los sustratos podría simplificarse, mediante la remoción de sustituciones, y ser evaluados nuevamente por las mismas enzimas. Esta situación se observó en las enzimas FFA2 y Swfct, donde la remoción de grupos acetilo del fucoidano (de *F. evanescens* y de *C. okamuranus* respectivamente) aumentó de manera considerable la actividad enzimática y por ende el rendimiento de los oligosacáridos resultantes (Silchenko *et al.*, 2013; Arai *et al.*, 2022). Se ha reportado en algunas enzimas fucoidanasas de la familia GH107 el incremento en actividad ante el agregado de iones calcio para su actividad, y la pérdida de la misma ante el agregado de un quelante (Vuillemin *et al.*, 2020), por lo que el efecto de distintos iones debe ser evaluado. Una de las enzimas fucoidanasas en donde se identificaron sitios de unión al calcio es en P5AFcnA de *Psychromonas* sp. SW5A (*phylum* Pseudomonadota, Vickers *et al.*, 2018). Dicha enzima pesentó, al igual que la enzima #113643, actividad frente a fucoidanos de *M. pyriferá*, como así también frente a otros sustratos que contienen ambos tipos de uniones (α -(1 \rightarrow 3)- y α -(1 \rightarrow 4)- provenientes de *Saccharina japonica* (Vickers *et al.*, 2018) y de *Laminaria hyperborea* (Kopplin *et al.*, 2018). A pesar de que las enzimas #113643 y P5AFcnA reconocerían el fucoidano de *M. pyriferá*, comparten un bajo porcentaje de identidad (24 % de identidad a nivel de aminoácidos), no así a nivel de estructura tridimensional, donde la comparación de la estructura y el modelo de la secuencia metagenómica en el servidor DALI determinó un valor de Z de 36,6 y un RMSD de 2,1 Å (lali 301).

Las características particulares de Bahía Ushuaia, con condiciones ambientales extremas y variables, como así también una gran diversidad microbiana y alto potencial

7. Discusión general

metabólico en los sedimentos, constituyeron la base para la prospección de enzimas fucoidanasas. Las características biocatalíticas de la enzima #116343 le otorgan un gran potencial biotecnológico, principalmente la presencia de actividad en un amplio rango de temperatura, salinidad y pH. Su alta actividad a baja temperatura permitiría reducir el consumo de energía durante el proceso biocatalítico y el riesgo de contaminación microbiana, como así también reducir la inestabilidad de los reactivos (Trincone, 2011).

Este trabajo de Tesis Doctoral ha permitido incrementar nuestro conocimiento sobre las poblaciones microbianas con potencial para degradar fucoidanos presentes en sedimentos de Bahía Ushuaia. Se identificaron secuencias que codificarían para enzimas fucoidanasas de las familias GH107 y GH168, y se corroboró la actividad en la enzima #113643 frente a fucoidanos de *M. pyrifera*. No obstante, dada la alta especificidad de las enzimas fucoidanasas y la gran heterogeneidad estructural de los fucoidanos, resulta necesario continuar con los estudios de la especificidad de sustrato de las enzimas putativas identificadas, como así también de las propiedades biológicas de los fucoligosacáridos generados.

8. CONCLUSIONES

8. Conclusiones

1. La metodología de extracción de fucoïdanos aplicada a las especies *M. pyrifera* y *U. pinnatifida* permitió obtener fucoïdanos con alto contenido de fucosa y de ésteres sulfato, siendo estos últimos de gran relevancia en la actividad biológica de los fucoïdanos.
2. El fucoïdano de *U. pinnatifida* presentó características de un galactofucano sulfatado, es decir, una composición basada principalmente en los azúcares fucosa y galactosa, y a su vez, con presencia de sustituciones de grupos sulfatos. Los fucoïdanos de la especie *M. pyrifera* extra dos en este trabajo de Tesis estarían conformados principalmente por fucosa (80 - 86 %) e importantes porcentajes de grupos sulfato (23 – 28 %). Los análisis estructurales de la fracción **F4LAM** sugieren que los fucoïdanos contienen principalmente α -L-fucosas con enlaces α -(1→3)- con unidades 4-O-sulfatadas y disulfatadas en posiciones 2 y 4; y regiones con residuos de fucosa enlazados en posición 4 dentro de un sistema alternante 1,3/1,4.
3. La búsqueda de secuencias homólogas a las familias CAZy GH107 y GH168 mediante HMMs en un *set* de datos metagenómicos proveniente de un ambiente con una alta diversidad microbiana, los sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia, permitió la identificación de una gran diversidad de secuencias a partir de esta comunidad microbiana, expuesta a condiciones extremas. La presencia de cantidades significativas de biomasa de algas pardas en los sedimentos podría favorecer la selección de organismos con la capacidad para asimilar fucoïdanos.
4. Las secuencias identificadas pertenecerían en su mayoría a organismos del *phylum* Planctomycetota, seguido de Actinomycetota para secuencias homólogas a miembros de la familia GH168. Hasta el momento no se ha reportado la expresión y caracterización de enzimas fucoïdanasas provenientes de miembros de estos grupos taxonómicos. Los resultados de este trabajo de tesis doctoral indican que existirían miembros de la comunidad microbiana con capacidad de degradar fucoïdanos, que podrían ser de gran relevancia en los sedimentos marinos de Bahía Ushuaia.
5. Los genes que codificarían para enzimas sulfatasas fueron abundantes en el contexto genómico de las secuencias putativas a fucoïdanasas en ambas familias,

8. Conclusiones

principalmente en aquellos fragmentos genómicos que pertenecerían a organismos del *phylum* Planctomycetota.

6. La expresión heteróloga de las cuatro secuencias seleccionadas a bajas temperaturas resultó clave en la obtención de una alta producción de proteína soluble.
7. La enzima #113643 identificada en el metagenoma de Bahía Ushuaia presentó una alta actividad fucoidanasa frente a los fucoidanos purificados a partir de distintas partes del talo de *M. pyrifera*, exhibiendo actividad en un amplio rango de temperaturas, salinidad y pH en breves períodos de incubación.
8. Los análisis estructurales de los oligosacáridos de bajo peso molecular obtenidos de la actividad de #113643 frente a fucoidanos de *M. pyrifera* indicaron que los productos de bajo peso molecular son oligo-fucoidanos de 3, 6 y 7 unidades de fucosa mono- y disulfatadas. Sin embargo, los análisis estructurales no resultaron concluyentes para definir que tipo de enlace glicosídico sería el blanco de acción de esta enzima, u otra característica estructural relativa a su especificidad.
9. La enzima fucoidanasa #113643 presenta un alto potencial biotecnológico, pudiendo ser aplicada para la generación de oligosacáridos con potenciales aplicaciones biomédicas como así también como una herramienta para la elucidación de la estructura fina del sustrato.

9. BIBLIOGRAFÍA

9. Bibliografía

- Adami ML, Gordillo S. 1999. Structure and dynamics of the biota associated with *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta) from the Beagle Channel, Tierra del Fuego. *Sci Mar* 63:183–191.
- Adhikari U, Mateu CG, Chattopadhyay K, Pujol CA, Damonte EB, Ray B. 2006. Structure and antiviral activity of sulfated fucans from *Stoechospermum marginatum*. *Phytochem* 67:2474–2482.
- Ahola V, Aittokallio T, Uusipaikka E, Vihinen M. 2003. Efficient estimation of emission probabilities in profile hidden Markov models. *Bioinformatics* 19:2359–2368.
- Akondi KB, Lakshmi VV. 2013. Emerging Trends in Genomic Approaches for Microbial Bioprospecting. *OMICS* 17:61–70.
- Albersheim P, Nevins DJ, English PD, Karr A. 1967. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr Res* 5:340–345.
- Ale MT, Mikkelsen JD, Meyer AS. 2011. Important Determinants for Fucoidan Bioactivity: A Critical Review of Structure-Function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds. *Mar Drugs* 9:2106–2130.
- Allison SD. 2005. Cheaters, diffusion and nutrients constrain decomposition by microbial enzymes in spatially structured environments: Constraints on enzymatic decomposition. *Ecol Letters* 8:626–635.
- Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2019. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol* 37:420–423.
- Altshul SF, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman DJ. 1990. Basic Local Alignment Tool. *J Mol Biol* 215:403–410.
- Amin O, Comoglio L, Spetter C, Duarte C, Asteasuain R, Freije RH, Marcovecchio J. 2011. Assessment of land influence on a high-latitude marine coastal system: Tierra del Fuego, southernmost Argentina. *Environ Monit Assess* 175:63–73.
- Arai Y, Shingu Y, Yagi H, Suzuki H, Ohshiro T. 2022. Occurrence of different fucoidanase genes in *Flavobacterium* sp. SW and enzyme characterization. *J Biosci Bioeng* 134:187–194.
- Arnosti C. 2014. Patterns of Microbially Driven Carbon Cycling in the Ocean: Links between Extracellular Enzymes and Microbial Communities. *Adv Oceanogr* 2014:1–12.
- Asensi AO, Küpper FC. 2012. Seasonal periodicity and reproduction of brown algae (Phaeophyceae) at Puerto Deseado (Patagonia). *Botanica Marina* 55:217–228.

9. Bibliografía

- Balquinta ML, Dellatorre FG, Andrés SC, Lorenzo G. 2022. Effect of pH and seaweed (*Undaria pinnatifida*) meal level on rheological and antioxidant properties of model aqueous systems. *Algal Res* 62:102629.
- Barrett K, Hunt CJ, Lange L, Meyer AS. 2020. Conserved unique peptide patterns (CUPP) online platform: peptide-based functional annotation of carbohydrate active enzymes. *Nucleic Acids Res* 48:W110-W115.
- Bartlett GJ, Porter CT, Borkakoti N, Thornton JM. 2002. Analysis of catalytic residues in enzyme active sites. *J Mol Biol* 324:105-121.
- Becker S, Tebben J, Coffinet S, Wiltshire K, Iversen MH, Harder T, Hinrich KU, Hehemann JH. 2020. Laminarin is a major molecule in the marine carbon cycle. *PNAS* 117: 6599-6607.
- Benkert P, Biasini M, Schwede T. 2011. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* 27:343–350.
- Berteau O. 2003. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology* 13:29R – 40.
- Berteau O, McCort I, Goasdoué N, Tissot B, Daniel R. Characterization of a new α -L-fucosidase isolated from the marine mollusk *Pecten maximus* that catalyzes the hydrolysis of α -L-fucose from algal fucoidan (*Ascophyllum nodosum*). *Glycobiology* 12:273-282.
- Betton J-M. 2004. High throughput cloning and expression strategies for protein production. *Biochimie* 86:601–605.
- Bilan MI, Grachev AA, Ustuzhanina NE, Shashkov AS, Nifantiev NE, Usov AI. 2002. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag. *Carbohydr Res* 337:719-730.
- Bilan MI, Grachev AA, Shashkov AS, Kelly M, Sanderson CJ, Nifantiev NE, Usov AI. 2010. Further studies on the composition and structure of a fucoidan preparation from the brown alga *Saccharina latissima*. *Carbohydr Res* 345:2038–2047.
- Bilan MI, Usov AI. 2008. Structural Analysis of Fucoidans. *Nat Prod Commun* 3:1934578X0800301.
- Bilan MI, Vinogradova EV, Tsvetkova EA, Grachev AA, Shashkov AS, Nifantiev NE, Usov AI. 2008. A sulfated glucuronofucan containing both fucofuranose and fucopyranose residues from the brown alga *Chordaria flagelliformis*. *Carbohydr Res* 343:2605–2612.
- Black WAP, Dewar ET, Woodward FN. 1952. Manufacture of algal chemicals. IV— Laboratory-scale isolation of fucoidin from brown marine algae. *J Sci Food Agric* 3:122–129.

9. Bibliografía

- Bodet P-E, Salard I, Przybylski C, Gonnet F, Gomila C, Ausseil J, Daniel R. 2017. Efficient recovery of glycosaminoglycan oligosaccharides from polyacrylamide gel electrophoresis combined with mass spectrometry analysis. *Anal Bioanal Chem* 409:1257–1269.
- Boraso AL, Ciancia M, Cerezo A, Piriz ML, Casa GN, Eyras MC. 2015. Utilización de las macroalgas marinas de la costa argentina y sus hidrocoloides. Editorial Universitaria de la Patagonia.
- Bringloe TT, Starko S, Wade RM, Vieira C, Kawai H, De Clerck O, Cock JM, Coelho SM, Destombe C, Valero M, Neiva J, Pearson GA, Faugeron S, Serrão EA, Verbruggen H. 2020. Phylogeny and Evolution of the Brown Algae. *Crit Rev Plant Sci* 39:281–321.
- Bruhn A, Janicek T, Manns D, Nielsen MM, Balsby TJS, Meyer AS, Rasmussen MB, Hou X, Saake B, Göke C, Bjerre AB. 2017. Crude fucoidan content in two North Atlantic kelp species, *Saccharina latissima* and *Laminaria digitata*—seasonal variation and impact of environmental factors. *J Appl Phycol* 29:3121–3137.
- Buck-Wiese H, Andskog MA, Nguyen NP, Bligh M, Asmala E, Vidal-Melgosa S, Liebeke M, Gustafsson C, Hehemann JH. 2023. Fucoid brown algae inject fucoidan carbon into the ocean. *PNAS* 120: e2210561119.
- Bunicontro MP, Marcomini SC, Casas GN. 2019. Environmental Impacts of an Alien Kelp Species (*Undaria pinnatifida*, Laminariales) Along the Patagonian Coasts, p. 373–396. *In* Makowski, C, Finkl, CW (eds.), *Impacts of Invasive Species on Coastal Environments*. Springer International Publishing, Cham.
- Burgess-Brown NA. 2017. *Heterologous Gene Expression in E. coli: Methods and Protocols*. 2017. Springer New York, New York, NY.
- Calderoli PA, Espínola FJ, Dionisi HM, Gil MN, Jansson JK, Lozada M. 2018. Predominance and high diversity of genes associated to denitrification in metagenomes of subantarctic coastal sediments exposed to urban pollution. *PLoS ONE* 13:e0207606.
- Conesa AL, Dellatorre FG, Latour E, Ponce NMA, Stortz CA, Scolaro LA, Álvarez VA, Lasalle VL, Ayala-Peña VB. 2023. Potential of fucoidan from *Myriogloea major asensi* as antiviral against herpes simplex type 1 and 2 and bovine coronavirus. *Res Square* <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2947896/v1>
- Cao H, Mikkelsen M, Lezyk M, Bui L, Tran V, Silchenko A, Kusaykin M, Pham T, Truong B, Holck J, Meyer A. 2018. Novel Enzyme Actions for Sulphated Galactofucan Depolymerisation and a New Engineering Strategy for Molecular Stabilisation of Fucoidan Degrading Enzymes. *Mar Drugs* 16:422.
- Cao HTT. 2018. Enzyme discovery for brown seaweed fucoidan modification. Kgs. Lyngby. Technical University of Denmark (DTU).

9. Bibliografía

- Casas G, Scrosati R, Luz Piriz M. 2004. The Invasive Kelp *Undaria Pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) Reduces Native Seaweed Diversity in Nuevo Gulf (Patagonia, Argentina). *Biol Invasions* 6:411–416.
- Celie PH, Parret AH, Perrakis A. 2016. Recombinant cloning strategies for protein expression. *Curr Opin Struct Biol* 38:145–154.
- Chandía NP, Matsuhira B. 2008. Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties. *Int J Biol Macromol* 42:235–240.
- Charrier B, Le Bail A, de Reviers B. 2012. Plant Proteus: brown algal morphological plasticity and underlying developmental mechanisms. *Trends Plant Sci* 17:468–477.
- Chizhov AO, Dell A, Morris HR, Haslam SM, McDowell RA, Shashkov AS, Nifant'ev NE, Khatuntseva EA, Usov AI. 1999. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydr Res* 320:108–119.
- Colin S, Deniaud E, Jam M, Descamps V, Chevolut Y, Kervarec N, Yvin J-C, Barbeyron T, Michel G, Kloareg B. 2006. Cloning and biochemical characterization of the fucanase FcnA: definition of a novel glycoside hydrolase family specific for sulfated fucans. *Glycobiology* 16:1021–1032.
- Collins T, Gerday C. 2017. Enzyme catalysis in psychrophiles. *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*. 209-235.
- Davis TA, Volesky B, Mucci A. 2003. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Res* 37:4311–4330.
- de Pascale D, De Santi C, Fu J, Landfald B. 2012. The microbial diversity of Polar environments is a fertile ground for bioprospecting. *Mar Genomics* 8:15–22.
- Delwiche CF. 2007. Algae in the warp and weave of life: bound by plastids. *Syst Assoc Special vol* 75:7.
- Dellatorre F, Amoroso R, Saravia J, Orensanz L. 2014. Rapid expansion and potential range of the invasive kelp *Undaria pinnatifida* in the Southwest Atlantic. *Aquat Invasions* 9:467–478.
- Deniaud-Bouët E, Kervarec N, Michel G, Tonon T, Kloareg B, Hervé C. 2014. Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae. *Ann Bot* 114:1203–1216.
- Descamps V, Colin S, Lahaye M, Jam M, Richard C, Potin P, Barbeyron T, Yvin J-C, Kloareg B. 2006. Isolation and Culture of a Marine Bacterium Degrading the Sulfated Fucans from Marine Brown Algae. *Mar Biotechnol* 8:27–39.

9. Bibliografía

- Diaz, S, Camilión C, Deferrari G, Fuenzalida H, Armstrong R, Booth C, Paladini A, Cabrera S, Casiccia C, Lovengreen C, Pedroni J, Rosales A, Zagarese H, Vernet M. 2006. Ozone and UV Radiation over Southern South America: Climatology and Anomalies. *Photochem Photobiol* 82:834.
- Diodato S, Gonzalez Garraza G, Mansilla R, Moretto A, Escobar J, Méndez-López M, Gómez-Armesto A, Marcovecchio J, Nóvoa-Muñoz JC. 2020. Quality changes of fluvial sediments impated by urban effluents in Ushuaia, Tierra del Fuego, southernmost Patagonia. *Environm Earth Sci* 79:481.
- Dionisi HM, Lozada M, Campos, E. 2023. Diversity of GH51 α -L-arabinofuranosidase homolog sequences from subantarctic intertidal sediments. *Biol*, 1-20.
- Dionisi HM, Lozada M, Marcos MS, Di Marzio WD, Loviso CL. 2011. Aromatic Hydrocarbon Degradation Genes from Chronically Polluted Subantarctic Marine Sediments, p. 461–473. *In* de Bruijn, FJ (ed.), *Handbook of Molecular Microbial Ecology II*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Dobrinčić A, Balbino S, Zorić Z, Pedisić S, Bursać Kovačević D, Elez Garofulić I, Dragović-Uzelac V. 2020. Advanced technologies for the extraction of marine brown algal polysaccharides. *Mar drugs* 18(3), 168.
- Drula E, Garron M-L, Dogan S, Lombard V, Henrissat B, Terrapon N. 2022. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Res* 50:D571–D577.
- Duarte MER, Cardoso MA, Nosedá MD, Cerezo AS. 2001. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydr Res* 333:281–293.
- El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy SR, Luciani A, Potter SC, Qureshi M, Richardson LJ, Salazar GA, Smart A, Sonnhammer ELL, Hirsh L, Paladin L, Piovesan D, Tosatto SCE, Finn RD. 2019. The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res* 47:D427–D432.
- Ermakova S, Kusaykin M, Trincone A, Tatiana Z. 2015. Are multifunctional marine polysaccharides a myth or reality?. *Front Chem* 3:39.
- Espínola F, Dionisi HM, Borglin S, Brislawn CJ, Jansson JK, Mac Cormack WP, Carroll J, Sjöling S, Lozada M. 2018. Metagenomic Analysis of Subtidal Sediments from Polar and Subpolar Coastal Environments Highlights the Relevance of Anaerobic Hydrocarbon Degradation Processes. *Microb Ecol* 75:123–139.
- Fathi-Roudsari M, Akhavian-Tehrani A, Maghsoudi N. 2016. Comparison of Three *Escherichia coli* Strains in Recombinant Production of Reteplase. *Avicenna J Med Biotech* 8:16-22.

9. Bibliografía

Federov AN. 2022. Biosynthetic protein folding and molecular chaperons. *Biochem* 87:S128-S145.

Ferrelli ML, Pidre ML, García-Domínguez R, Alberca LN, del Saz-Navarro DM, Santana-Molina C, Devos PD. 2023. Prokaryotic membrane coat – like proteins: An update. *J Struct Biol* 107987.

Ferrés I, Amarelle V, Noya F, Fabiano E. 2015. Identification of Antarctic culturable bacteria able to produce diverse enzymes of potential biotechnological interest. *Adv Polar Sci* 26:71-79.

Finn RD, Clements J, Eddy SR. 2011. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res* 39:W29–W37.

Fitton J, Stringer D, Karpiniec S. 2015. Therapies from Fucoïdan: An Update. *Mar Drugs* 13:5920–5946.

Fletcher HR, Biller P, Ross AB, Adams JMM. 2017. The seasonal variation of fucoïdan within three species of brown macroalgae. *Algal Res* 22:79–86.

Flórez-Fernández N, Balboa EM, Domínguez H. 2020. Extraction and Purification of Fucoïdan from Marine Sources, p. 1093–1125. *In* Kim, S (ed.), *Encyclopedia of Marine Biotechnology*, 1st ed. Wiley.

Foxman B. 2012. A Primer of Molecular Biology, p. 53–78. *In* *Molecular Tools and Infectious Disease Epidemiology*. Elsevier.

Francis DM, Page R. 2010. Strategies to Optimize Protein Expression in *E. coli*. *Current protocols in protein science* 61:5-24.

Frank JA, Pan Y, Tooming-Klunderud A, Eijsink VGH, McHardy AC, Nederbragt AJ, Pope PB. 2016. Improved metagenome assemblies and taxonomic binning using long-read circular consensus sequence data. *Sci Rep* 6:25373.

Gacesa R, Baranasic D, Starcevic A, Diminic J, Korlevic M, Mirjana N, Blazina M, Orsolich D, Kolesaric D, Long, PF, Cullum J, Hranuelli D, Orlic S, Zucko J. 2018. Bioprospecting for Genes Encoding Hydrocarbon-Degrading Enzymes from Metagenomic Samples Isolated from Northern Adriatic Sea Sediments. *Food Technol Biotechnol* 56:270-277.

Gabor EM, Alkema WBL, Janssen DB. 2004. Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. *Environ Microbiol* 6:879–886.

Gilbert JA, Dupont CL. 2011. Microbial Metagenomics: Beyond the Genome. *Annu Rev Mar Sci* 3:347–371.

Giljan G, Brown S, Lloyd CC, Ghobrial S, Amann R, Arnosti C. 2023. Selfish bacteria are active throughout the water column of the ocean. *ISME Commun* 4:3-11.

9. Bibliografía

- Girão M, Ribeiro I, Ribeiro T, Azevedo IC, Pereira F, Urbatzka R, Leão PN, Carvalho MF. 2019. Actinobacteria Isolated from *Laminaria ochroleuca*: A Source of New Bioactive Compounds. *Front Microbiol* 10:683.
- Glöckner FO, Kube M, Bauer M, Teeling H, Lombardot T, Ludwig W, Gade D, Beck A, Borzym K, Heitmann K, Rabus R, Schlesner H, Amann R, Reinhardt R. 2003. Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8298–8303.
- Gobet A, Barbeyron T, Matard-Mann M, Magdelenat G, Vallenet D, Duchaud E, Michel G. 2018. Evolutionary Evidence of Algal Polysaccharide Degradation Acquisition by *Pseudoalteromonas carrageenovora* 9T to Adapt to Macroalgal Niches. *Front Microbiol* 9:2740.
- Goodsell DS, Zardecki C, Di Costanzo L, Duarte JM, Hudson BP, Persikova I, Segura J, Shao C, Voigt M, Westbrook JD, Young JY, Burley SK. 2020. RCSB Protein Data Bank: Enabling biomedical research and drug discovery. *Protein Sci* 29:52–65.
- Gopal GJ, Kumar A. 2013. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. *Protein J* 32:419–425.
- Guazzaroni M-E, Beloqui A, Golyshin PN, Ferrer M. 2009. Metagenomics as a new technological tool to gain scientific knowledge. *World J Microbiol Biotechnol* 25:945–954.
- Guibert LM. Biodegradación de Hidrocarburos Alifáticos en Sedimentos Marinos Subantárticos: Estudios Poblacionales y Metagenómicos. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Rosario.
- Guiry MD. 2012. How many species of algae are there? *Journal of Phycology* 48:1057–1063.
- Guiry MD, Guiry GM. 2017. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway.
- Gupta SK, Shukla P. 2016. Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. *Crit Rev Biotechnol* 36:1089–1098.
- Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* 22:346–353.
- Gutkowski R, Maleszewski S. 1989. Seasonal changes of the photosynthetic capacity of the Antarctic macroalga *Adenocystis utricularis* (Bory) Skottsberg. *Polar Biol* 10:145-148.
- Hakim MM, Patel IC. 2020. A review on phytoconstituents of marine brown algae. *Futur J Pharm Sci* 6:129.

9. Bibliografía

- Hamid B, Bashir Z, Yattoo AM, Nohiddib F, Majeed N, Bansal M, Poczai P, Almaki WH, Sayyed RZ, Shati AA, Alfaifi Y. 2022. Cold-Active Enzyme and Their Potential Industrial Applications-A review. *Mol* 27:5885.
- Handelsman J, Liles M, Mann D, Riesenfeld C, Goodman RM. 2002. Cloning the metagenome: Culture-independent access to the diversity and functions of the uncultivated microbial world, p. 241–255. *In* *Methods in Microbiology*. Elsevier.
- Hardison AK, Canuel EA, Anderson IC, Veuger B. 2010. Fate of macroalgae in benthic systems: carbon and nitrogen cycling within the microbial community. *Mar Ecol Prog Ser* 414:41-55.
- Helbert W. 2017. Marine Polysaccharide Sulfatases. *Front Mar Sci* 4:6.
- Hentati F, Delattre C, Ursu AV, Desbrières J, Le Cerf D, Gardarin C, Abdelkafi S, Michaud P, Pierre G. 2018. Structural characterization and antioxidant activity of water-soluble polysaccharides from the Tunisian brown seaweed *Cystoseira compressa*. *Carbohydr Pol* 198:589–600.
- Hentati F, Tounsi L, Djomdi D, Pierre G, Delattre C, Ursu AV, Fendri I, Abdelkafi S, Michaud P. 2020. Bioactive Polysaccharides from Seaweeds. *Molecules* 25:3152.
- Heylen K, Hoefman S, Vekeman B, Peiren J, De Vos P. 2012. Safeguarding bacterial resources promotes biotechnological innovation. *Appl Microbiol Biotechnol* 94:565–574.
- Hidari KIPJ, Takahashi N, Arihara M, Nagaoka M, Morita K, Suzuki T. 2008. Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. *Biochem Biophys Res Commun* 376:91–95.
- Hiller K, Grote A, Scheer M, Munch R, Jahn D. 2004. PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions. *Nucleic Acids Res* 32:W375–W379.
- Holliday GL, Mitchell JBO, Thornton JM. 2009. Understanding the Functional Roles of Amino Acid Residues in Enzyme Catalysis. *J Mol Biol* 390:560–577.
- Holm L. 2022. Dali server: structural unification of protein families. *Nucleic Acids Res* 50:W210-W215.
- Hon J, Marusiak M, Martinek T, Kunka A, Zendulka J, Bednar D, Damborsky J. 2021. SoluProt: prediction of soluble protein expression in *Escherichia coli*. *Bioinformatics* 37:23–28.
- Honya M, Mori H, Anzai M, Araki Y, Nisizawa K. 1999. Monthly changes in the content of fucans, their constituent sugars and sulphate in cultured *Laminaria japonica*, p. 411–416. *In* Kain, JM, Brown, MT, Lahaye, M (eds.), *Sixteenth International Seaweed Symposium*. Springer Netherlands, Dordrecht.

9. Bibliografía

- Hosseini H, Al-Jabri HM, Moheimani NR, Siddiqui SA, Saadaoui I. 2022. Marine microbial bioprospecting: Exploitation of marine biodiversity towards biotechnological applications—a review. *J Basic Microbiol* 62:1030–1043.
- Howe AC, Jansson JK, Malfatti SA, Tringe SG, Tiedje JM, Brown CT. 2014. Tackling soil diversity with the assembly of large, complex metagenomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:4904–4909.
- Hreggviðsson GÓ, Nordberg-Karlsson EM, Tøndervik A, Aachmann FL, Dobruchowska JM, Linares-Pastén J, Daugbjerg-Christensen M, Moenaert A, Kristjansdóttir T, Sletta H, Fridjonsson OH, Aasen IM. 2020. Biocatalytic refining of polysaccharides from brown seaweeds, p. 447–504. *In Sustainable Seaweed Technologies*. Elsevier.
- Hsu H, Hwang P. 2019. Clinical applications of fucoidan in translational medicine for adjuvant cancer therapy. *Clin Trans Med* 8:15.
- Hu T, Liu D, Chen Y, Wu J, Wang S. 2010. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Undaria pinnatifida* in vitro. *Int J Biol Macromol* 46:193–198.
- Huang J, Wu D, Liu D, Yang X, Wu R, Zhang J, Ma C, He H. 2017. C-terminal domains of bacterial proteases: structure, function and the biotechnological applications. *J Appl Microbiol* 122:12-22.
- Huson DH, Auch AF, Qi J, Schuster SC. 2007. MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Res* 17:377–386.
- Gomes AR, Byregowda SM, Veeregowda BM, Balamurugan V. 2016. An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins. *Adv Anim Vet Sci* 4:346–356.
- Hochuli E, Dannwarth W, Dobeli Hm Gents R, Stuber D. 1988. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Bio Technol* 6:1321-1325.
- Holtkamp AD. 2009. Isolation, characterisation, modification and application of fucoidan from *Fucus vesiculosus*. Doctoral dissertation, Braunschweig, Techn. Univ., Diss.
- Irigoyen AJ, Eyra C, Parma AM. 2011. Alien algae *Undaria pinnatifida* causes habitat loss for rocky reef fishes in north Patagonia. *Biol Invasions* 13:17–24.
- Jagtap AS, Manohar CS. 2021. Overview on Microbial Enzymatic Production of Algal Oligosaccharides for Nutraceutical Applications. *Mar Biotechnol* 23:159–176.
- Jayawardena TU, Nagahawatta DP, Fernando IPS, Kim Y-T, Kim J-S, Kim W-S, Lee JS, Jeon Y-J. 2022. A Review on fucoidan structure, extraction techniques, and its role as an immunomodulatory agent. *Mar drus* 20:755.

9. Bibliografía

Jenkins J, Mayans O, Pickersgill R. 1998. Structure and evolution of parallel β -Helix proteins. *J Struct Biol* 122:236-246.

Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Zidek A, Potapenko A, Bridgland A, Meter C, Kohl AAS, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D. 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596 (7873):583-589.

Kadam SU, Tiwari BK, O'Donnell CP. 2013. Application of Novel Extraction Technologies for Bioactives from Marine Algae. *J Agric Food Chem* 61:4667-4675.

Kamble A, Srinivasan S, Singh H. 2019. In-Silico Bioprospecting: Finding Better Enzymes. *Mol Biotechnol* 61:53-59.

Kamble P, Vavilala SL. 2018. Discovering novel enzymes from marine ecosystems: a metagenomic approach. *Botanica Marina* 61:161-175.

Kappelmann L, Krüger K, Hehemann JH, Harder J, Markert S, Unfried F, Becher D, Shapiro N, Schweder T, Amann RI, Teeling H. 2019. Polysaccharide utilization loci of North Sea Flavobacteria as basis for using SusC/D-protein expression for predicting major phytoplankton glycans. *The ISME journal* 13:76-91.

Karaiyan P, Chang CCH, Chan E-S, Tey BT, Ramanan RN, Ooi CW. 2022. In silico screening and heterologous expression of soluble dimethyl sulfide monooxygenases of microbial origin in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 106:4523-4537.

Kaur J, Kumar A, Kaur J. 2018. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *Int J Biol Macromol* 106:803-822.

Kim K, Choe D, Lee D-H, Cho B-K. 2020. Engineering Biology to Construct Microbial Chassis for the Production of Difficult-to-Express Proteins. *IJMS* 21:990.

Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Meth* 58:169-188.

Kiselevskiy MV, Anisimova NYu, Bilan MI, Usov AI, Ustyuzhanina NE, Petkevich AA, Shubina IZh, Morozovich GE, Nifantiev NE. 2022. Prospects for the Use of Marine Sulfated Fucose-Rich Polysaccharides in Treatment and Prevention of COVID-19 and Post-COVID-19 Syndrome. *Russ J Bioorg Chem* 48:1109-1122.

Ko H, Kang M, Kim M-J, Yi J, Kang J, Bae J-H, Sohn J-H, Sung BH. 2021. A novel protein fusion partner, carbohydrate-binding module family 66, to enhance heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 20:232.

9. Bibliografía

- Koh HSA, Lu J, Zhou W. 2019. Structure characterization and antioxidant activity of fucoidan isolated from *Undaria pinnatifida* grown in New Zealand. *Carbohydr Polym* 212:178–185.
- Kolender AA, Matulewicz MC. 2002. Sulfated polysaccharides from the red seaweed *Georgiella confluens*. *Carbohydr Res* 337:57–68.
- Kopplin G, Rokstad AN, Mérida H, Bulone V, Skjak-Braek G, Aachmann FL. 2018. Structural characterization of fucoidan from *Laminaria hyperborea*: assessment of coagulation and inflammatory properties and their structure-function relationship. *ACS Appl Bio Mater* 1:1880-1892.
- Krause-Jensen D, Lavery P, Serrano O, Marbà N, Masque P, Duarte CM. 2018. Sequestration of macroalgal carbon: the elephant in the Blue Carbon room. *Biol Lett* 14:20180236.
- Krüger K, Chafee M, Ben Francis T, Glavina del Rio T, Becher D, Schweder T, Amann RI, Teeling H. 2019. In marine Bacteroidetes the bulk of glycan degradation during algae blooms is mediated by few clades using a restricted set of genes. *ISME J* 13:2800-2816
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874.
- Kusaykin M, Bakunina I, Sova V, Ermakova S, Kuznetsova T, Besednova N, Zaporozhets T, Zvyagintseva T. 2008. Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoidans from the brown seaweeds. *Biotechnol J* 3:904–915.
- Kusaykin MI, Silchenko AS, Zakharenko AM, Zvyagintseva TN. 2015. Fucoidanases. *Glycobiol* 26:3-12.
- Labourel A, Crouch LI, Brás JLA, Jackson A, Rogowski A, Gray J, Yadav MP, Henrissat B, Fontes CMGA, Gilbert HJ, Najmudin S, Baslé A, Cuskin F. 2016. The Mechanism by Which Arabinoxylanases Can Recognize Highly Decorated Xylans. *J Biol Chem* 291:22149–22159.
- Latour E. 2022. Cuantificación y caracterización de fucoidanos de distintas algas pardas del Golfo Nuevo, Chubut, Argentina. *AJEA*.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948.
- Lee J-B, Takeshita A, Hayashi K, Hayashi T. 2011. Structures and antiviral activities of polysaccharides from *Sargassum trichophyllum*. *Carbohydr Polym* 86:995–999.

9. Bibliografía

- Lee OK, Lee EY. 2016. Sustainable production of bioethanol from renewable brown algae biomass. *Biomass Bioenergy* 92:70–75.
- Lever M. 1972. A New Reaction for Colorimetric Determination of Carbohydrates. *Anal Biochem* 47:273-279.
- Levy S, Rogers Y-H. 2010. DNA Sequencing for the Detection of Human Genome Variation, p. 27–37. *In* *Essentials of Genomic and Personalized Medicine*. Elsevier.
- Li B, Lu F, Wei X, Zhao R. 2008. Fucoidan: Structure and Bioactivity. *Molecules* 13:1671–1695.
- Lim SJ, Aida WMW. 2017. Extraction of Sulfated Polysaccharides (Fucoidan) From Brown Seaweed. *In* *Seaweed polysaccharides* (pp. 27-46). Elsevier
- Liu G, Shen J, Chang Y, Mei X, Chen G, Zhang Y, Xue C. 2023. Characterization of an endo-1,3-fucanase from marine bacterium *Wenylingzhuangia aestuarii*: The first member of a novel glycoside hydrolase family GH174. *Carbohydr Polym* 306:120591.
- Liu J, Wu S-Y, Chen L, Li Q-J, Shen Y-Z, Jin L, Zhang X, Chen P-C, Wu M-J, Choi J, Tong H-B. 2020. Different extraction methods bring about distinct physicochemical properties and antioxidant activities of *Sargassum fusiforme* fucoidans. *Int J Biol Macromol* 155:1385–1392.
- Liuzzi MG, López Gappa J, Piriz ML. 2011. Latitudinal gradients in macroalgal biodiversity in the Southwest Atlantic between 36 and 55°S. *Hydrobiol* 673:205–214.
- Lu D-C, Wang F-Q, Amann RI, Teeling H, Du Z-J. 2023. Epiphytic common core bacteria in the microbiomes of co-located green (*Ulva*), brown (*Saccharina*) and red (*Grateloupia*, *Gelidium*) macroalgae. *Microbiom* 11:26.
- Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 42:D490–D495.
- López-Hortas L, Flórez-Fernández N, Torres MD, Ferreira-Anta T, Casas MP, Balboa EM, Falqué E, Domínguez H. 2021. Applying Seaweed Compounds in Cosmetics, Cosmeceuticals and Nutricosmetics. *Mar Drugs* 19:552.
- Lorbeer AJ, Charoensiddhi S, Lahnstein J, Lars C, Franco CMM, Bulone V, Zhang W. 2017. Sequential extraction and characterization of fucoidans and alginates from *Ecklonia radiata*, *Macrocystis pyrifera*, *Durvillaea potatorum*, and *Seirococcus axillaris*. *J Appl Phycol* 29:1515–1526.
- Lorenz P, Eck J. 2005. Metagenomics and industrial applications. *Nat Rev Microbiol* 3:510–516.

9. Bibliografía

Loviso CL, Lozada M, Guibert LM, Musumeci MA, Sarango Cardenas S, Kuin RV, Marcos MS, Dionisi HM. 2015. Metagenomics reveals the high polycyclic aromatic hydrocarbon-degradation potential of abundant uncultured bacteria from chronically polluted subantarctic and temperate coastal marine environments. *J Appl Microbiol* 119:411–424.

Loviso CL. 2015. Análisis metagenómico de la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos marinos subantárticos. Tesis Doctoral en Ciencias Exactas, área Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de La Plata.

Lozada M, Dionisi HM. 2015. Microbial Bioprospecting in Marine Environments. *Springer Handbook of Marine Biotechnology*, 307-326.

Lozada M, Diéguez MC, García PE, Dionisi HM. 2023. Microbial communities associated with kelp detritus in temperate and subantarctic intertidal sediments. *Sci Total Environ* 857, 159392.

Lu J, Shi K, Chen S, Wang J, Hassouna A, White L, Merien F, Xie M, Kong Q, Li J, Ying T, White W, Nie S. 2018. Fucoïdan Extracted from the New Zealand *Undaria pinnatifida*—Physicochemical Comparison against Five Other Fucoïdians: Unique Low Molecular Weight Fraction Bioactivity in Breast Cancer Cell Lines. *Mar Drugs* 16:461.

Lu S, Wang J, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Yang M, Zhang D, Zheng C, Lanczycki CJ, Marchler-Bauer A. 2020. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Res* 48:D265–D268.

Mabate B, Daub CD, Malgas S, Edkins AL, Pletschke BI. 2021. Fucoïdan Structure and Its Impact on Glucose Metabolism: Implications for Diabetes and Cancer Therapy. *Mar Drugs* 19:30.

Mabeau S, Kloareg B, Joseleau J-P. 1990. Fractionation and analysis of fucans from brown algae. *Phytochemistry* 29:2441–2445.

Macaya EC, Gonzalez Garraza G, Navarro NP, Ramirez ME, Albornoz W, Bagur M, Basualdo JP, Bessega F, Caceres-Ccaccya D, Jeldres R, Kaminsky J, López E, Marcangeli M, Matula C, Monachesi R, Novoa L, Perez-Alania M, Reyes-Gómez V, Poblet CT, Bentivoglio E, Salas J, Silva MR. 2019. Guía Fotográfica: Macroalgas Marinas de Ushuaia. Primera Edición. Concepción, Chile. 72 pp.

Magnan CN, Randall A, Baldi P. 2009. SOLpro: accurate sequence-based prediction of protein solubility. *Bioinformatics* 25:2200–2207.

Mak W, Hamid N, Liu T, Lu J, White WL. 2013. Fucoïdan from New Zealand *Undaria pinnatifida*: Monthly variations and determination of antioxidant activities. *Carbohydr Polym* 95:606–614.

9. Bibliografía

- Mak W, Wang SK, Liu T, Hamid N, Li Y, Lu J, White WL. 2014. Anti-Proliferation Potential and Content of Fucoidan Extracted from Sporophyll of New Zealand *Undaria pinnatifida*. *Front Nutr* 1:9.
- Marcos MS, Lozada M, Dionisi HM. 2009. Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted Subantarctic marine sediments. *Lett Appl Microbiol* 49:602–608.
- Marcos MS. 2012. Estudio de la Capacidad de Biodegradación de Hidrocarburos en los Sedimentos Marinos de la Costa Patagónica. Tesis de Doctor en Biología. Universidad Nacional del Sur.
- Margesin R, Schinner F. 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 5:73-83.
- Martin M, Barbeyron T, Martin R, Portetelle D, Michel G, Vandenbol M. 2015. The Cultivable Surface Microbiota of the Brown Alga *Ascophyllum nodosum* is Enriched in Macroalgal-Polysaccharide-Degrading Bacteria. *Front Microbiol* 6:1487.
- Matos MN, Lozada M, Anselmino LE, Musumeci MA, Henrissat B, Jansson JK, Mac Cormack WP, Carroll J, Sjöling S, Lundgren L, Dionisi HM. 2016. Metagenomics unveils the attributes of the alginolytic guilds of sediments from four distant cold coastal environments: Alginolytic guilds from cold sediments. *Environ Microbiol* 18:4471–4484.
- Mendoza ML, Nizovoy A. 2000. Géneros de Macroalgas Marinas de la Argentina, fundamentalmente de Tierra del Fuego. Centro Austral de Investigaciones Científicas, Occasional Publication.
- Michel G, Nyval-Collen P, Barbeyron T, Czjzek M, Helbert W. 2006. Bioconversion of red seaweed galactans: a focus on bacterial agarases and carrageenases. *Appl Microbiol Biotechnol* 71:23–33.
- Mitchell AL, Attwood TK, Babbitt PC, Blum M, Bork P, Bridge A, Brown SD, Chang H-Y, El-Gebali S, Fraser MI, Gough J, Haft DR, Huang H, Letunic I, Lopez R, Luciani A, Madeira F, Marchler-Bauer A, Mi H, Natale DA, Necci M, Nuka G, Orengo C, Pandurangan AP, Paysan-Lafosse T, Pesseat S, Potter SC, Qureshi MA, Rawlings ND, Redaschi N, Richardson LJ, Rivoire C, Salazar GA, Sangrador-Vegas A, Sigrist CJA, Sillitoe I, Sutton GG, Thanki N, Thomas PD, Tosatto SCE, Yong S-Y, Finn RD. 2019. InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Res* 47:D351–D360.
- Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL, Saludes JP. 2009. Drug development from marine natural products. *Nat Rev Drug Discov* 8:69–85.
- Mongin M, Baird ME, Hadley S, Lenton A. 2016. Optimising reef-scale CO₂ removal by seaweed to buffer ocean acidification. *Environ Res Lett* 11:034023.

9. Bibliografía

- Morya VK, Kim J, Kim E-K. 2012. Algal fucoidan: structural and size-dependent bioactivities and their perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:71–82.
- Mullan Crain C, Bertness MD. 2006. Ecosystem Engineering across Environmental Gradients: Implications for Conservation and Management. *BioScience* 56:211.
- Musat N, Werner U, Knittel K, Kolb S, Dodenhof T, van Beusekom JEE, de Beer D, Dubilier N, Amann R. 2006. Microbial community structure of sandy intertidal sediments in the North Sea, Sylt-Rømø Basin, Wadden Sea. *Syst Appl Microbiol* 29:333–348.
- Musumeci MA, Loviso CL, Lozada M, Ferreira FV, Dionisi HM. 2019. Substrate specificities of aromatic ring-hydroxylating oxygenases of an uncultured gammaproteobacterium from chronically-polluted subantarctic sediments. *International Biodeterior Biodegradation* 137:127–136.
- Nagao T, Arai Y, Yamaoka M, Komatsu F, Yagi H, Suzuki H, Ohshiro T. 2018. Identification and characterization of the fucoidanase gene from *Luteolibacter algae* H18. *J Biosci Bioeng* 126:567–572.
- Nagao T, Kumabe A, Komatsu F, Yagi H, Suzuki H, Ohshiro T. 2017. Gene identification and characterization of fucoidan deacetylase for potential application to fucoidan degradation and diversification. *J Biosci Bioeng* 124:277–282.
- Najmudin S, Pinheiro BA, Prates JAM, Gilbert HJ, Romao MJ, Fontes CMGA. 2010. Putting and N-terminal end to the *Clostridium thermocellum* xylanase Xyn10B story: Crystal structure of the CMB22-1-GH10 modules complexed with xylohexaose. *J Struct Biol* 172:353-362.
- Najmudin S, Guerreiro CI, Carvalho AL, Prates JA, Correia MA, Alves VD, Ferreira LMA, Romao MJ, Gilbert HJ, Bolan DN, Fontes CMGA. 2006. Xyloglucan is recognized by carbohydrate-binding modules that interact with β -glucan chains. *J Biol Chem* 281:8815-8828.
- Navarro DA, Flores ML, Stortz CA. 2007. Microwave-assisted desulfation of sulfated polysaccharides. *Carbohydr Polym* 69:742–747.
- New England Biolabs. Subcloning Competent E.coli Transformation Protocol (C2988)| NEB. <https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/subcloning-competent-ecoli-transformation-protocol>
- Nieto CA, Forero NB, Ramirez MH. 2017. Diseño y producción de diversas proteínas fusión de la nicotinamida/nicotinato mononucleotido adenilil transferasa (NMNAT) de *Plasmodium falciparum*. *Rev. Colomb. Quim.* 46:5-10.
- Novagen. 2006. pET System Manual. 10th Edition Rev. B 0403. www.novagen.com

9. Bibliografía

Okamoto N, Keeling PJ, Leander BS, Tai V. 2022. Microbial communities in sandy beaches from the three domains of life differ by microhabitat and intertidal location. *Mol Ecol* 31:3210-3227.

Oliver S. 2000. Guilt-by-association goes global. *Nature* 403:601-603.

Orphan VJ, Taylor LT, Hafenbradl D, Delong EF. 2000. Culture-Dependent and Culture-Independent Characterization of Microbial Assemblages Associated with High-Temperature Petroleum Reservoirs. *Appl Environ Microbiol* 66:700–711.

Oulas A, Pavludi C, Polymenakou P, Pavlopoulos GA, Papanikolaou N, Kotoulas G, Arvanitidis C, Iliopoulos Ioannis. 2015. Metagenomics: Tools and Insights for Analyzing Next-Generation Sequencing Data Derived from Biodiversity Studies. *Bioinform Biol Insights* 9:BBI.S12462.

Parks HD, Chuvochina M, Rinke C, Mussig AJ, Chaumeil P-A, Hugenholtz P. 2022. GTDB: and ongoing census of bacterial and archeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy. *Nucleic Acids Res* D785-D794.

Pellizza L, Smal C, Rodrigo G, Arán M. 2018. Codon usage clusters correlation: towards protein solubility prediction in heterologous expression systems in *E. coli*. *Sci Rep* 8:10618.

Pham TD, Menshova RV, Anastyuk SD, Ly BM, Zvyagintseva TN. 2013. Structural characteristics and anticancer activity of fucoidan from the brown alga *Sargassum mcclurei*. *Mar Drugs* 11:1456-1476.

Pinteus S, Lemos MFL, Alves C, Neugebauer A, Silva J, Thomas OP, Botana LM, Gaspar H, Pedrosa R. 2018. Marine invasive macroalgae: Turning a real threat into a major opportunity - the biotechnological potential of *Sargassum muticum* and *Asparagopsis armata*. *Algal Res* 34:217–234.

Plana J, Mansilla A, Palacios M, Navarro NP. 2007. Estudio Poblacional de *Macrocystis pyrifera* (L.) c. agardh (laminariales: phaeophyta) en Ambientes Protegido y Expuesto al Oleaje en Tierra del Fuego. *Gayana (Concepc)* 71.

Ponce NMA. 2006. Estudio del sistema de polisacáridos de *Adenocytis utricularis*, un alga parda de las costas patagónicas argentinas de posible utilización farmacológica e industrial. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

Ponce NMA, Stortz CA. 2020. A Comprehensive and Comparative Analysis of the Fucoidan Compositional Data Across the Phaeophyceae. *Front Plant Sci* 11:556312.

Ponce NMA, Flores ML, Pujol CA, Becerra MB, Navarro DA, Córdoba O, Damonte EB, Stortz CA. 2019. Fucoidans from the phaeophyta *Scytosiphon lomentaria*: Chemical analysis and antiviral activity of the galactofucan component. *Carbohydr Res* 478:18–24.

9. Bibliografía

Ponce NMA, Pujol CA, Damonte EB, Flores ML, Stortz CA. 2003. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydr Res* 338:153–165.

Prayogo FA, Budiharjo A, Kusumaningrum HP, Wijanarka W, Suprihadi A, Nurhayati N. 2020. Metagenomic applications in exploration and development of novel enzymes from nature: a review. *J Genet Eng Biotechnol* 18:39.

Ptak SH, Sanchez L, Fretté X, Kurouski D. 2021. Complementarity of Raman and Infrared spectroscopy for rapid characterization of fucoidan extracts. *Plant Methods* 17:130.

Qian B, Goldstein RA. 2003. Detecting distant homologs using phylogenetic tree-based HMMs. *Proteins* 52:446–453.

Qiu Y, Jiang H, Dong Y, Wang Y, Hamouda HI, Balah MA, Mao X. 2022. Expression and Biochemical Characterization of a Novel Fucoidanase from *Flavobacterium algicola* with the Principal Product of Fucoidan-Derived Disaccharide. *Foods* 11:1025.

Raffo MP, Dellatorre F, Ciancia M. 2022. Seaweed resources of Argentina (S W Atlantic): production, bio-ecological, applied research and challenges for sustainable development. *Appl Phycol* 3:383–421.

Ravanel MC, Sharma S, Gimpel J, Reveco-Urzuza FE, Øverland M, Horn SJ, Lienqueo ME. 2017. The role of alginate lyases in the enzymatic saccharification of brown macroalgae, *Macrocystis pyrifera* and *Saccharina latissima*. *Algal Res* 26:287–293.

Rioux LE, Turgeon SL. 2015. Seaweed carbohydrates. In *Seaweed sustainability*. Academic Press. P. 141-192.

Rodrigues CJC, de Carvalho CCCR. 2022. Marine Bioprospecting, Biocatalysis and Process Development. *Microorganisms* 10:1965.

Rodrigues PA, Ferrari RG, Conte-Junior CA. 2018. Application of molecular tools to elucidate the microbiota of seafood. *J Appl Microbiol* 124:1347–1365.

Ropartz D, Marion L, Fanuel M, Nikolic J, Jam M, Larocque R, Ficko-Blean E, Michel G, Rogniaux H. 2022. In-depth structural characterization of oligosaccharides released by GH107 endofucanase *Mf FcnA* reveals enzyme subsite specificity and sulfated fucan substructural features. *Glycobiol* 32:276–288.

Rousseau F, Draisma S, de Reviers B. 2007. Classification of the Phaeophyceae from past to present and current challenges, p. 267–284. In Brodie, J, Lewis, J (eds.), *Unravelling the algae*. CRC Press.

Rusch DB, Halpern AL, Sutton G, Heidelberg KB, Williamson S, Yooseph S, Wu D, Eisen JA, Hoffman JM, Remington K, Beeson K, Tran B, Smith H, Baden-Tillson H, Stewart C, Thorpe J, Freeman J, Andrews-Pfannkoch C, Venter JE, Li K, Kravitz S, Heidelberg JF, Utterback T, Rogers Y-H, Falcón LI, Souza V, Bonilla-Rosso G, Eguarte LE, Karl DM,

9. Bibliografía

- Sathyendranath S, Platt T, Bermingham E, Gallardo V, Tamayo-Castillo G, Ferrari MR, Strausberg RL, Neelson K, Friedman R, Frazier M, Venter JC. 2007. The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. *PLoS Biol* 5:e77.
- Sakai T, Ishizuka K, Kojima K, Shimanaka K, Ikai K, Kato I. 2006. U.S. Patent No. 7,125,984. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Sakai T, Kawai T, Kato I. 2004. Isolation and Characterization of a Fucoidan-Degrading Marine Bacterial Strain and Its Fucoidanase. *Mar Biotechnol* 6:335–346.
- Salmeán AA, Willats WGT, Ribeiro S, Andersen TJ, Ellegaard M. 2022. Over 100-year preservation and temporal fluctuations of cell wall polysaccharides in marine sediments. *Front. Plant Sci.* 13.
- Sánchez-Magraner L, Viguera AR, García-Pacios M, Garcillán MP, Arrondo J-LR, de la Cruz D, Goñi FM, Ostolaza H. 2007. The Calcium-binding C-terminal Domain of *Escherichia coli* α -Hemolysin is a major determinant in the Surface-active properties of the protein. *J Biol Chem* 11827-11835.
- Sasaki Y, Yoshikuni Y. 2022. Metabolic engineering for valorization of macroalgae biomass. *Metabolic Engineering* 71:42–61.
- Satapathy SS, Powdel BR, Buragohain AK, Ray SK. 2016. Discrepancy among the synonymous codons with respect to their selection as optimal codon in bacteria. *DNA Res* 23:441–449.
- Schultz-Johansen M, Cueff M, Hardouin K, Jam M, Larocque R, Glaring MA, Hervé C, Czjzek M, Stougaard P. 2018. Discovery and screening of novel metagenome-derived GH107 enzymes targeting sulfated fucans from brown algae. *FEBS J* 285:4281–4295.
- Schwaighofer A, Ablasser S, Lux L, Kopp J, Herwig C, Spadiut O, Lendl B, Slouka C. 2020. Production of Active Recombinant Hyaluronidase Inclusion Bodies from *Apis mellifera* in *E. coli* BL21(DE3) and characterization by FT-IR Spectroscopy. *IJMS* 21:3881.
- Schweiger RG. 1962. Methanolysis of Fucoidan. II. The presence of Sugar Other than L-Fucosa. *J Org Chem*, 27:4270-4272.
- Senthilkumar K, Manivasagan P, Venkatesan J, Kim S-K. 2013. Brown seaweed fucoidan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *Int J Biol Macromol* 60:366–374.
- Shanthi N, Arumugam P, Murugan M, Sudhakar MP, Arunkumar K. 2021. Extraction of Fucoidan from *Turbinaria decurrens* and the Synthesis of Fucoidan-Coated AgNPs for Anticoagulant Application. *ACS Omega* 6:30998–31008.
- Sharma VK, Kumar N, Prakash T, Taylor TD. 2012. Fast and Accurate Taxonomic Assignments of Metagenomic Sequences Using MetaBin. *PLoS ONE* 7:e34030.

9. Bibliografía

Shea EM, Carpita NC. 1988. Separation of partially methylated alditol acetates on SP-2330 and HP-1 vitreous silica capillary columns. *J Chromatogr A* 445:424–428.

Shen J, Chang Y, Zhang Y, Mei X, Xue C. 2020. Discovery and Characterization of an Endo-1,3-Fucanase From Marine Bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica*: A Novel Glycoside Hydrolase Family. *Front Microbiol* 11:1674.

Shimuzu J, Wada-Funada U, Mano U, Matahira Y, Kawaguchi M, Wada M. 2005. Proportion of murine cytotoxic T cells is increased by high molecular-weight fucoidan extracted from Okinawa mozuku (*Cladosiphon okamuranus*). *J Health Sci* 51:394-397.

Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, Hajibabaei M. 2012. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol* 21:1794–1805.

Sichert A. 2019. Fucoidan degradation by marine bacteria. PhD Thesis. Universität Bremen.

Sichert A, Corzett CH, Schechter MS, Unfried F, Markert S, Becher D, Fernandez-Guerra A, Liebeke M, Schweder T, Polz MF, Hehemann J-H. 2020. Verrucomicrobia use hundreds of enzymes to digest the algal polysaccharide fucoidan. *Nat Microbiol* 5:1026–1039.

Sichert A, Le Gall S, Klau LJ, Laillet B, Rogniaux H, Aachmann FL, Hehemann J-H. 2021. Ion-exchange purification and structural characterization of five sulfated fucoidans from brown algae. *Glycobiol* 31:352-357.

Silchenko A, Kusaykin M, Kurilenko V, Zakharenko A, Isakov V, Zaporozhets T, Gazha A, Zvyagintseva T. 2013. Hydrolysis of Fucoidan by Fucoidanase Isolated from the Marine Bacterium, *Formosa algae*. *Mar Drugs* 11:2413–2430.

Silchenko AS, Khanh HHN, Hang CTT, Kurilenko VV, Zakharenko AM, Zueva AO, Ly BM, Kusaykin MI. 2015. A Simple Plate Method for the Screening and Detection of Fucoidanases. *Achiev Life Sci* 9:104–106.

Silchenko AS, Ustyuzhanina NE, Kusaykin MI, Krylov VB, Shashkov AS, Dmitrenok AS, Usoltseva RV, Zueva AO, Nifantiev NE, Zvyagintseva TN. 2017. Expression and biochemical characterization and substrate specificity of the fucoidanase from *Formosa algae*. *Glycobiol* cww138v3.

Silchenko AS, Rasin AB, Kusaykin MI, Kalinovsky AI, Miansong Z, Changheng L, Malyarenko O, Zueva AO, Zvyagintseva TN, Ermakova SP. 2017. Structure, enzymatic transformation, anticancer activity of fucoidan and sulphated fucooligosaccharides from *Sargassum horneri*. *Carbohydr Polym* 175:654–660.

Silchenko AS, Rasin AB, Zueva AO, Kusaykin MI, Zvyagintseva TN, Kalinovsky AI, Kurilenko VV, Ermakova SP. 2018. Fucoidan Sulfatases from Marine Bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127T. *Biomolecules* 8:98.

9. Bibliografía

- Silchenko AS, Rasin AB, Kusaykin MI, Malyarenko OS, Shevchenko NM, Zueva AO, Kalinovsky AI, Zvyagintseva TN, Ermakova SP. 2018. Modification of native fucoidan from *Fucus evanescens* by recombinant fucoidanase from marine bacteria *Formosa algae*. Carbohydr Polym 189:195.
- Silchenko AS, Rubtsov NK, Zueva AO, Kusaykin MI, Rasin AB, Ermakova SP. 2022. Fucoidan-active α -L-fucosidases of the GH29 and GH95 families from a fucoidan degrading cluster of the marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica*. Arch Biochem Biophys 728:109373.
- Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK, Singh SM, Panda AK. 2015. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. Microb Cell Fact 14:41.
- Singh BK. 2010. Exploring microbial diversity for biotechnology: the way forward. Trends Biotechnol 28:111–116.
- Skriptsova AV. 2015. Fucoidans of brown algae: Biosynthesis, localization, and physiological role in thallus. Russ J Mar Biol 41:145–156.
- Skriptsova AV, Shevchenko NM, Zvyagintseva TN, Imbs TI. 2010. Monthly changes in the content and monosaccharide composition of fucoidan from *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta). J Appl Phycol 22:79–86.
- Soeda S, Kozako T, Iwata K, Shimeno H. 2000. Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: its possible mechanism of action. Biochim Biophys Acta Biomembr 127-134.
- Song J, Tan H, Boyd SE, Shen H, Mahmood K, Webb GI, Akutsu T, Whisstock JC, Pike RN. 2011. Bioinformatic Approaches for Predicting Substrates of Proteases. J Bioinform Comput Biol 09:149–178.
- Sonnhammer E. 1998. Pfam: multiple sequence alignments and HMM-profiles of protein domains. Nucleic Acids Res 26:320–322.
- Soto-Vásquez MR, Alvarado-García PAA, Youssef FS, Ashour ML, Bogari HA, Elhady SS. 2022. FTIR Characterization of Sulfated Polysaccharides Obtained from *Macrocystis integrifolia* Algae and Verification of Their Antiangiogenic and Immunomodulatory Potency In Vitro and In Vivo. Mar Drugs 21:36.
- Stam M, Lelievre P, Hoebeke M, Corre E, Barbeyron T, Michel G. 2023. SulfAtlas, the sulfatase database: state of the art and new developments. Nucleic Acids Res D647-D653.
- Streit WR, Daniel R. 2017. Metagenomics. Springer New York.
- Structural Genomics Consortium, Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, Berkeley Structural Genomics Center, China Structural Genomics

9. Bibliografía

Consortium, Integrated Center for Structure and Function Innovation, Israel Structural Proteomics Center, Joint Center for Structural Genomics, Midwest Center for Structural Genomics, New York Structural GenomiX Research Center for Structural Genomics, Northeast Structural Genomics Consortium, Oxford Protein Production Facility, Protein Sample Production Facility, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative, SPINE2-Complexes. 2008. Protein production and purification. *Nat Methods* 5:135–146.

Synytsya A, Čopíková J, Kim WJ, Park YI. 2015. Cell Wall Polysaccharides of Marine Algae. *Springer Handbook of Marine Biotechnology*, 543-590.

Synytsya A, Kim W-J, Kim S-M, Pohl R, Synytsya A, Kvasnička F, Čopíková J, Il Park Y. 2010. Structure and antitumour activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*. *Carbohydr Polym* 81:41–48.

Tan J, Wang J, Geng L, Yue Y, Wu N, Zhang Q. 2020. Comparative study of fucoidan from *Saccharina japonica* and its depolymerized fragment on adriamycin-induced nephrotic syndrome in rata. *Mar Drugs* 18:137.

Takara Bio Inc. 2017. Chaperone plasmid set (Cat. No. 3340).

Takayama M, Koyama N, Sakai T, Kato I. 2002. Enzymes capable of degrading a sulfate-fucose-containing polysaccharide and their encoding genes. U.S. Patent 6489155B1.

Tran VHN, Nguyen TT, Meier S, Holck J, Cao HTT, Van TTT, Meyer AS, Mikkelsen MD. 2022. The Endo- α (1,3)-Fucoidanase Mef2 Releases Uniquely Branched Oligosaccharides from *Saccharina latissima* Fucoidans. *Mar Drugs* 20:305.

Tran VHN, Perna V, Mikkelsen MD, Thi Nguyen T, Thi Dieu Trang V, Baum A, Thi Thuy Cao H, Thi Thanh Van T, Meyer AS. 2022. A new FTIR assay for quantitative measurement of endo-fucoidanase activity. *Enzyme Microb Technol* 158:110035.

Trang VTD, Mikkelsen MD, Vuillemin M, Meier S, Cao HTT, Muschiol J, Perna V, Nguyen TT, Tran VHN, Holck J, Van TTT, Khanh HHN, Meyer AS. 2022. The Endo- α (1,4) Specific Fucoidanase Fhf2 From *Formosa haliotis* Releases Highly Sulfated Fucoidan Oligosaccharides. *Front Plant Sci* 13:823668.

Traving SJ, Balmonte JP, Seale D, Arnosti C, Glud RN, Hallarm SJ, Middelboe M. 2022. On Single-Cell Enzyme Assays in Marine Microbial Ecology and Biogeochemistry. *Front Mar Sci* 9:846656.

Trevino SR, Scholtz JM, Pace CN. 2007. Amino Acid Contribution to Protein Solubility: Asp, Glu, and Ser Contribute more favorably than the other Hydrophilic Amino Acids in RNase Sa. *J Mol Biol* 366:449–460.

Trincone A. 2011. Marine Biocatalysts: Enzymatic Features and Applications. *Mar Drugs* 9:478–499.

9. Bibliografía

- Usoltseva RV, Anastyuk SD, Shevchenko NM, Zvyagintseva TN, Ermakova SP. 2016. The comparison of structure and anticancer activity in vitro of polysaccharides from brown algae *Alaria marginata* and *A. angusta*. *Carbohydr Polym* 153:258–265.
- Usoltseva RV, Shevchenko NM, Malyarenko OS, Anastyuk SD, Kasprik AE, Zvyagintsev NV, Ermakova SP. 2019. Fucoidans from brown algae *Laminaria longipes* and *Saccharina cichorioides*: Structural characteristics, anticancer and radiosensitizing activity *in vitro*. *Carbohydr Polym* 221:157–165.
- Usov AI, Bilan MI, Ustyuzhanina NE, Nifantiev NE. 2022. Fucoidans of Brown Algae: Comparison of Sulfated Polysaccharides from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Mar Drugs* 20:638.
- Vallejo L, Rinas U. 2004. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb Cell Fact* 3:11.
- van den Burg B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol* 6:213–218.
- van Vliet DM, Palakawong Na Ayudthaya S, Diop S, Villanueva L, Stams AJM, Sánchez-Andrea I. 2019. Anaerobic Degradation of Sulfated Polysaccharides by Two Novel *Kiritimatiellales* Strains Isolated From Black Sea Sediment. *Front Microbiol* 10:253.
- Vanavil B, Selvaraj K, Aanandhalakshmi R, Usha Sri K, Arumugam M. 2020. Bioactive and thermostable sulphated polysaccharide from *Sargassum swartzii* with drug delivery applications. *Int J Biol Macromol* 153:190–200.
- Vanella FA, Fernández DA, Carolina Romero M, Calvo J. 2007. Changes in the fish fauna associated with a sub-Antarctic *Macrocystis pyrifera* kelp forest in response to canopy removal. *Polar Biol* 30:449–457.
- Vester JK, Glaring MA, Stougaard P. 2015. Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments. *Extremophiles* 19:17–29.
- Vester JK, Glaring MA, Stougaard P. 2015. Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments. *Extremophiles* 19:17–29.
- Vickers C, Liu F, Abe K, Salama-Alber O, Jenkins M, Springate CMK, Burke JE, Withers SG, Boraston AB. 2018. Endo-fucoidan hydrolases from glycoside hydrolase family 107 (GH107) display structural and mechanistic similarities to α -L-fucosidases from GH29. *J Biol Chem* 293:18296–18308.
- Vidal-Melgosa S, Lagator M, Sichert A, Priest T, Pätzold J, Hehemann JH. 2022. Not digested: Algal glycans move carbon dioxide into the deep-sea. *bioRxiv*: 2022-03.
- Vishchuk OS, Ermakova SP, Zvyagintseva TN. 2011. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity. *Carbohydr Res* 346:2769–2776.

9. Bibliografía

- Volpi N, Maccari F. 2006. Electrophoretic approaches to the analysis of complex polysaccharides. *J Chromatogr B* 834:1–13.
- Vuillemin M, Silchenko AS, Cao HTT, Kokoulin MS, Trang VTD, Holck J, Ermakova SP, Meyer AS, Mikkelsen MD. 2020. Functional Characterization of a New GH107 Endo- α -(1,4)-Fucoidanase from the Marine Bacterium *Formosa haliotis*. *Mar Drugs* 18:562.
- Vuong TV, Wilson DB. 2010. Glycoside hydrolases: Catalytic base/nucleophile diversity. *Biotechnol Bioeng* 107:195–205.
- Wagner M, Horn M. 2006. The Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. *Curr Opin Biotechnol* 17:241–249.
- Wang J, Liu Z, Pan X, Wang N, Li L, Du Y, Li J, Li M. 2022. Structural and Biochemical Analysis Reveals Catalytic Mechanism of Fucoidan Lyase from *Flavobacterium* sp. SA-0082. *Mar Drugs* 20:533.
- Wang S-H, Huang C-Y, Chen C-Y, Chang C-C, Huang C-Y, Dong C-D, Chang J-S. 2020. Structure and Biological Activity Analysis of Fucoidan Isolated from *Sargassum siliquosum*. *ACS Omega* 5:32447–32455.
- Wang Y, Xing M, Cao Q, Ji A, Liang H, Song S. 2019. Biological Activities of Fucoidan and the Factors Mediating Its Therapeutic Effects: A Review of Recent Studies. *Mar Drugs* 17:183.
- Wani AK, Rahayu F, Kadarwati FT, Suhara C, Singh R, Dhanjal DS, Akhtar TG, Chopra C. 2022. Metagenomic screening strategies for bioprospecting enzymes from environmental samples. *Earth Environ Sci* 974:012003.
- Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. 2018. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* 46:W296–W303.
- Wei C, Schultz J. 2015. Identification of divergent WH2 motifs by HMM-HMM alignments. *BMC Res Notes* 8:18.
- Wehr JD. 2015. Brown Algae, p. 851–871. *In* *Freshwater Algae of North America*. Elsevier.
- Wiegand S, Jogler M, Boedeker C, Pinto D, Vollmers J, Rivas-Marín E, Kohn T, Peeters SH, Heuer A, Rast P, Oberbeckmann S, Bunk B, Jeske O, Meyerdierks A, Storesund JE, Kallscheuer P, Muller RW, Brummer F, Labrenz M, Spormann AM, Op den Camp HJM, Overman J, Amann R, Jetter MSM, Mascher T, Medema MH, Devos DP, Kaster AK, Ovreas L, Rohde M, Galperin MY, Jogler C. 2020. Cultivation and functional characterization of 79 planctomycetes uncovers their unique biology. *Nat Microbiol* 126:140.

9. Bibliografía

- Wingfield PT. 2015. Overview of the Purification of Recombinant Proteins. CP Protein Science 80.
- Wolf BF, Ninnemann O. 1995. Heterologous expression of genes in bacterial, fungal, animal and plant cells. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 46: 419-44.
- Wright DW, Moreno-Vargas AJ, Carmona AT, Robina I, Davies GJ. 2013. Three dimensional structure of a bacterial α -l-fucosidase with a 5-membered iminocyclitol inhibitor. Bioorg Med Chem 21:4751–4754.
- Xu S-Y, Kan J, Hu Z, Liu Y, Du H, Pang G-C, Cheong K-L. 2018. Quantification of Neoagaro-Oligosaccharide Production through Enzymatic Hydrolysis and Its Anti-Oxidant Activities. Molecules 23:1354.
- Xu X-Q, Su B-M, Xie J-S, Li R-K, Yang J, Lin J, Ye X-Y. 2018. Preparation of bioactive neoagaroligosaccharides through hydrolysis of *Gracilaria lemaneiformis* agar: A comparative study. Food Chem 240:330–337.
- Yao Y, Yim EKF. 2021. Fucoidan for cardiovascular application and the factors mediating its activities. Carbohydr Polym 270:118347.
- Yao W, Kong Q, You L, Zhong S, Hileuskaya K. 2023. Polysaccharides from brown seaweed: physicochemical properties, absorption in the intestine, and beneficial effects on intestinal barrier. Food Front 1-14.
- Zaixso HE, Boraso AL. 2015. Recursos biológicos bentónicos: la Zona Costera Patagónica Argentina. 1ª ed. Universidad Nacional de la Patagonia – EDUPA, Comodoro Rivadavia.
- Zayed A, Avila-Peltroche J, El-Aasr M, Ulber R. 2022. Sulfated Galactofucans: An Outstanding Class of Fucoidans with Promising Bioactivities. Mar Drugs 20:412.
- Zayed A, El-Aasr M, Ibrahim A-RS, Ulber R. 2020. Fucoidan Characterization: Determination of Purity and Physicochemical and Chemical Properties. Mar Drugs 18:571.
- Zhang H, Yohe T, Huang L, Entwistle S, Wu P, Yang Z, Busk PK, Xu Y, Yin Y. 2018. dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. Nucleic Acids Res 46:W95–W101.
- Zhang W, Oda T, Yu Q, Jin J-O. 2015. Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* Has Powerful Immune-Modulatory Effects Compared to Three Other Fucoidans. Mar Drugs 13:1084–1104.
- Zhao Y, Zheng Y, Wang J, Ma S, Yu Y, White W, Yang S, Yang F, Lu J. 2018. Fucoidan Extracted from *Undaria pinnatifida*: Source for Nutraceuticals/Functional Foods. Mar Drugs 16:321.

9. Bibliografía

Zheng J, Ge Q, Yan Y, Zhang X, Huang X, Huang L, Yin Y. 2023. dbCAN3: automated carbohydrate-active enzyme and substrate annotation. *Nucleic Acids Res* gkad328.

Zhu W, Lomsadze A, Borodovsky M. 2010. *Ab initio* gene identification in metagenomic sequences. *Nucleic Acids Res* 38:e132

Zhu C, Liu Z, Ren L, Jiao S, Zhang X, Wang Q, Li Z, Du Y, Li J-J. 2021. Overexpression and biochemical characterization of a truncated endo- α (1 \rightarrow 3)-fucoidanase from *Alteromonas* sp. SN-1009. *Food Chem* 353:129460.

Zou P, Yang X, Yuan Y, Jing C, Cao J, Wang Y, Zhang L, Zhang C, Li Y. 2021. Purification and characterization of a fucoidan from the brown algae *Macrocystis pyrifera* and the activity of enhancing salt-stress tolerance of wheat seedlings. *Int J Biol Macromol* 180:547–558.

Zueva AO, Silchenko AS, Rasin AB, Kusaykin MI, Usoltseva RV, Kalinovsky AI, Kurilenko VV, Zvyagintseva TN, Thinh PD, Ermakova SP. 2020. Expression and biochemical characterization of two recombinant fucoidanases from the marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127T. *Int J Biol Macromol* 164:3025–3037.

Zuibert LM, Loviso CL, Marcos MS, Commendatore MG, Dionisi HM, Lozada M. 2012. Alkane Biodegradation Genes from Chronically Polluted Subantarctic Coastal Sediments and Their Shifts in Response to Oil Exposure. *Microb Ecol* 64:605–616.

Zvyagintseva TN, Shevchenko NM, Chizhov AO, Krupnova TN, Sundukova EV, Isakov VV. 2003. Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions. *J Exp Mar Biol Ecol* 294:1–13.

Zvyagintseva TN, Usoltseva RV, Shevchenko NM, Surits VV, Imbs TI, Malyarenko OS, Besednova NN, Ivanushko LA, Ermakova SP. 2021. Structural diversity of fucoidans and their radioprotective effect. *Carbohydr Polym* 273:118551.

10. ANEXO: Publicaciones

PUBLICACIONES

Enviado en noviembre 2023 para su publicación en *Journal of Marine Science and Engineering*. **Gonzalez J. A.**, Ponce, N. M. A., Lozada, M., Daglio, Y., Stortz, C. A., Dionisi, H. M. Fucanases related to the GH107 family from members of the PVC superphylum.

CAPITULOS DE LIBROS

M. Lozada, H.M. Dionisi, F. Espínola, P. Calderoli, M.A. Musumeci, **J.A. Gonzalez**, J.L. López, W.P. Mac Cormack and J.K. Jansson. "Contribution of metagenomics to our understanding of microbial processes in Antarctic and sub-Antarctic coastal sediments". In: *Microbial Ecology: Current advances from genomics, metagenomics and other "omics"*, Diana Marco (Ed.), 2018. Caister Academic Press, U.K. Pages: 65-106.

TRABAJOS PRESENTADOS A CONGRESOS INTERNACIONALES

Gonzalez, J.A., Molina, C. A. V., Musumeci, M. A., Lozada, M., Ponce, N. M. A., Stortz, C. A., Dionisi, H. M. 2021. Alginate Lyases and Fucanases from Uncultured Microorganism of Coastal Sediments of Southern Patagonia. *Microbe*. Del 20 al 24 de Junio. Modalidad: póster interactivo.

Gonzalez, J.A, Ponce, N. A., Stortz, C., Lozada, M., Musumeci, M. y Dionisi, H. M. 2019. Expresión heteróloga y caracterización de enzimas fucoidanasas identificadas en comunidades microbianas de un ambiente marino extremo. X Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria y XII Simposio REDBIO Argentina. Del 12 al 15 de noviembre. Montevideo, Uruguay. Modalidad: póster.

Dionsi, H.; **Gonzalez, J.**; Calderoli, P. y Lozada M. 2018. Brown Algae Polysaccharide Assimilation Potential in Intertidal Sediments of a Subantartic Sheltered Environment. *Microbe* 2018. Del 7 al 11 de junio. Atlanta, EEU. Modalidad: poster.

TRABAJOS PRESENTADOS A CONGRESOS NACIONALES

Ponce, N. M. A., Daglio, Y., **Gonzalez, J.**, Dionisi, H., Stortz, C. A. 2023. Estudios estructurales de fucoidanos de *Macrocystis pyrifera*. Aplicación de enzimas fucoidanasas. XXIV Simposio Nacional de Química Orgánica. Del 5 al 8 de Noviembre. Rosario, Santa Fe.

Gonzalez, J., Ponce, A., Stortz, C., Lozada, M. y Dionisi H. 2021. Mining an intertidal sediment metagenome for fucanases for the production of oligosaccharides from algae fucoidans. Tercer Encuentro y Primer Workshop de la Red Argentina de tecnología Enzimática (Red Tez). Del 8 al 10 de septiembre. Modalidad virtual.

Gonzalez J. A.; Lozada, M.; Musumeci, M. y Dionisi, H. 2018. Prospección de secuencias de enzimas fucoidanasas en sedimentos costeros de un ambiente subpolar. IV Congreso

10. ANEXO: Publicaciones

Argentino de Microbiología (CAMAyA). 11, 12 y 13 de Abril. Mar del Plata. Modalidad: poster.

Gonzalez, J. A.; Musumeci, M. Lozada M. y Dionisi, H. “Bioprospección de enzimas en una biblioteca metagenómica construida a partir de sedimentos costeros de Bahía Ushuaia”. 2017. XI Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO Argentina 2017: Biotecnología: valor en origen, productividad y sustentabilidad. Del 11 al 13 de Septiembre. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca. Modalidad: Póster.

Gonzalez, J. A.; Lozada M.; Musumeci, M. y Dionisi, H. “Identificación de enzimas que degradan fucoïdanos en comunidades microbianas de sedimentos costeros de Bahía Ushuaia”. 2017. VII Jornadas de becarios CENPAT-CONICET. CCT Centro Nacional Patagónico. 11 y 12 de mayo. Puerto Madryn. Modalidad: Oral.

Gonzalez, J. A.; Ponce, N. A.; Musumeci, M. A.; Lozada, M.; Henrisaat, B.; Dellatorre, F. G. y Dionisi, H. M. “Bioprospección de enzimas fucoïdanasas en ambientes costeros de la Patagonia”. 2016. VI Jornadas de Becarios CENPAT-CONICET. Centro Nacional Patagónico. 12 y 13 de mayo Puerto Madryn. Modalidad: Póster.