

UNIVERSIDAD DE TECNOLOGÍA DE COMPIEGNE FRANCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDIO DE LOS GALACTANOS EXTRAÍDOS DE LA PARED DEL ALGA
AGAROFITA GRACILARIA VERRUCOSA (HUDS.) PAPENFUSS, CULTIVADA
BAJO CONDICIONES CONTROLADAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN INGENIERÍA BIOLÓGICA**

PRESENTA

MAURICIO ALFREDO ONDARZA BENEITEZ

Compiègne, Francia. Octubre de 1988

Resumen

El patrón de sustitución químico en polisacáridos del tipo agar, a partir de algas rojas; ha sido poco estudiado. La variación en los niveles de metilación y sulfatación, aun es desconocida.

El problema principal cuando se analizan las variaciones en los niveles de sustitución de estos polímeros, se da en el hecho de que el agar no es un material uniforme. Por lo tanto, un problema inmediato se presenta cuando se manipula un polímero heterogéneo, sobretodo en el significado de las variaciones observadas en los niveles de sustitución. Aun cuando es cierto que las variaciones pueden deberse a diferencias en los métodos experimentales empleados; otras posibles causas pudieran incluir: variaciones climáticas, ambientales y de estadios de vida.

Estudios iniciales en el laboratorio, nos han permitido identificar y cuantificar, la presencia centésimo molar de los principales sustituyentes de la Unidad D-Galactosa (6-0-metil- β -D-Galactosa, 4-0-metil- α -L-Galactosa) de polisacáridos del tipo agar obtenidos a partir de Gracilaria verrucosa.

Se describe aquí por vez primera, la presencia y el tipo de enlace de grupos laterales (4-0-metil- α -L-Galactosa) en la cadena polimérica principal de polisacáridos del tipo agar en Gracilaria verrucosa.

Aun más, ahora que sabemos que sustituyentes tanto 0-metil y 4-0-metil-galactosa afectan el C-6 de las unidades D-Galactosa; hemos definido una nueva estrategia para monitorear los eventos característicos del metabolismo del agar.

Por esta razón, decidimos seguir por separado la variación en los patrones de sustituciones de la Unidad D-Galactosa; tanto en segmentos de ejes primarios como en ramificaciones primarias laterales de plantas nativas comparada a muestras sometidas a condiciones controladas de crecimiento favorable y no favorable.

De manera a obtener fracciones ricas con los 2 sustituyentes de la Unidad D-Galactosa (6-0-metil y 4-0-metil), desarrollamos un protocolo de extracción secuencial, que fue aplicado a muestras cultivadas y nativas. Nuestros principales resultados fueron:

- 1) Un alto grado de sustitución por 4-0-metil, en polisacáridos del tipo agar obtenidos de segmentos de ejes primarios, cultivados bajo condiciones favorables de crecimiento.
- 2) Un grado de sustitución importante por 6-0-metil, en fracciones de agar obtenidas a partir de ramificaciones primarias laterales, cultivadas tanto en condiciones favorables como no favorables del crecimiento.

Estos resultados sugieren que un intercambio continuo puede existir entre las diferentes formas de las unidades D-Galactosa, durante la maduración del alga.

Independientemente del procedimiento exhaustivo de extracción aplicado en el fraccionamiento de los polímeros del tipo agar, el análisis químico de fracciones residuales en ejes primarios; mostraron una mayor concentración molar de residuos 4-0-metil-Galactosa, a diferencia de sustituciones por residuos 6-0-metil-Galactosa. De igual manera, se observó que las fracciones extraídas y obtenidas a altas temperaturas, presentaban una concentración molar mas importante de este carbohidrato metilado. Esto, implicaría indudablemente, que este sustituyente metilado, forma parte de cadenas de polisacáridos neutras, adheridas firmemente a la pared celular.

ANTECEDENTES

Recientemente la Biotecnología se ha convertido en un dominio de la investigación, particularmente fecundo y portador de esperanzas. Notablemente, se constata hoy un verdadero progreso en el conjunto de procedimientos y de técnicas de manipulación de organismos vivos y de sus constituyentes.

El apoyo científico de las biotecnologías, basado en el progreso de la Química Orgánica, la Química estructural, la Q. Analítica y la Ing. Química; han permitido a los diferentes sectores industriales, la ampliación de las posibilidades de explotación. Por otra parte, las biotecnologías se han constituido mediante la adquisición de elementos fundamentales derivados de las BioCiencias (Biología Molecular, Fisiología Celular, Enzimología y Microbiología) así como a otras ciencias físicas.

El cultivo de células vegetales es una técnica nueva que permite obtener moléculas originales con la perspectiva de acceder a su producción industrial. En el Campo de la Biotecnología Marina, se logra constatar hoy, un interés particular por el cultivo de células vegetales.

Uno de los proyectos del Equipo de Polisacáridos Parietales de Vegetales, es el de producir agarosa en bioreactores, mediante el cultivo de células aisladas a partir de la macroalga roja Gracilaria verrucosa. La realización de este proyecto esta condicionada por el conocimiento de la bioquímica y fisiología de algas enteras y de una perfecta caracterización de los polímeros del agar. Los trabajos preeliminares han mostrado que la calidad del agar extraído de Gracilaria verrucosa varía no solamente en función de las condiciones fisiológicas sino también en función de la edad y naturaleza de los tejidos del alga. Una heterogeneidad química ha sido constatada y relacionada a la calidad del ficocoloide.

Dichas consideraciones nos han llevado a establecer una estrategia de estudio que permitiese explicar dicha heterogeneidad química del agar de Gracilaria verrucosa en función de la edad del tejido, de las variaciones

estacionarias y de los métodos de extracción empleados. La estrategia adoptada fue la siguiente:

- 1) Desarrollar un método de extracción selectivo de familias de polímeros, en función del grado de solubilidad a diferentes temperaturas, tanto en agua destilada o en mezclas de etanol / agua a diferentes proporciones.
- 2) Analizar la composición química fina de los polisacáridos extraídos a partir de 2 entidades biológicas de algas enteras recolectadas en la naturaleza en el periodo de invierno (es decir, ejes principales y ramificaciones primarias laterales).
- 3) Por otra parte, someter dichas entidades en cultivo durante 2 meses bajo condiciones controladas, favoreciendo o no el crecimiento; Con el fin de poder comparar la composición química de polímeros extraídos en cada caso, con aquella de polímeros de algas testigo recolectadas en la naturaleza y, por la otra parte, de invertir las condiciones de cultivo con el objeto de estudiar las repercusiones obtenidas mediante un cambio brusco de las condiciones fisiológicas en la composición química de los polímeros del agar.

Previamente a la exposición de los principales resultados obtenidos durante el estudio aquí expuesto y antes de presentar las repercusiones en el avance del procedimiento biotecnológico; nos ha parecido de gran utilidad, de recordar algunos datos relativos al material biológico utilizado, así como los conocimientos sobre la composición de la pared de las algas rojas.

Aprobada por:

Presidente del jurado

Dr. DANIEL THOMAS

Sinodales

Madame M.D. LEGOY, Dr. Ing. YANNIS KARAMANOS

Dedicatoria

A mis queridos padres: Raúl Narciso y Estela Maria, por darme su amor incondicional, por su apoyo constante, por permitirme y dejar ser, por sus consejos y dedicación. Porque además de padres supieron ser amigos: ¡Los amo!

A mis hermanos: Raúl Vicente, Stella Emilia y Maria Fernanda, por su constante compañía, su apoyo incondicional, por las alegrías y tristezas que juntos convivimos durante nuestra niñez y adolescencia: saben que los quiero mucho!

A mis tíos: Fernando, Sergio, Adriana, Maria Luisa y Alfredo por el apoyo incondicional de siempre, por ser mis segundos padres y madres a la vez. Son los mejores tíos y saben lo mucho que los quiero.....

A mis queridos sobrinos: Andrea, Mauricio, Daniela, Javier y Pedro, porque ustedes me motivan a seguir adelante y a ponerme las pilas cuando flaqueo: los quiero como si fueran míos.....

A mi cuñado Oscar Fabián por ser amigo, cumplidor y con el que comparto afinidades por temas de la Química Inorgánica. ¡Gracias por estar ahí!

A ti Alicia, porque desde que te conocí mi vida tiene un sentido mas profundo, digno y me haces sentirme orgulloso de ser tu pareja. Gracias por estar conmigo en todo momento: pensamientos, teléfono, correo electrónico, correo aéreo, motivándome y animándome en todo momento. Por ser la persona que amo y porque Dios nos ha permitido continuar disfrutando a esos hijos tan nuestros: Sebastián (Dios lo tenga en su gloria), Federico y Maurizio Jr.

Te amaré por siempre.

Mauricio Alfredo Ondarza Benítez

Agradecimientos

A las siguientes personas e instituciones que me apoyaron durante mi etapa de tesis: ¡Gracias!

A la Universidad de Flandes-Artois en Lille, Francia, por el apoyo otorgado durante la Realización de mi Tesis de Doctorado.

A la Facultad de Biología, por el préstamo de las aulas y laboratorios donde se nos impartían las clases, y en general por todas las facilidades recibidas durante mi estancia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por proporcionarme el apoyo de beca para realizar y concluir mis estudios de postgrado.

Al programa de intercambio Francia (Centro de Estudios para la Formación de Ingenieros "CEFI") por el apoyo financiero que otorgaron a mi institución académica en Francia y que sirvió de apoyo en la compra de equipo, análisis cuantitativos y cualitativos y material de laboratorio para la realización del trabajo experimental.

Al Dr. Yannis Karamanos, por ser además de mi director de tesis, Mi maestro y comandante cuando llovían los regaños. Por aguantarme cuando la depresión hacía mella en mí y me le desaparecía por un buen rato. Por la revisión y crítica de la tesis y por estar siempre pendiente de mis actividades.

Al Dr. Henri Morvan por darme la oportunidad de incorporarme a su equipo de macroalgas, por todas las atenciones, por sus enseñanzas y consejos para mejorar el trabajo de tesis.

Al Dr. Daniel Thomas, por sus enseñanzas y consejos en las aulas de clases, por su opinión y motivación para la continuación de mis estudios de Posgrado.

Al Dr. Daniel Christian, a la M. en C. Marie Claire Verdus, al Dr. Thierry Stadler

Y al Dr. Jean Mollion por motivarme a continuar con mi desarrollo profesional, por sus sabios consejos, por adentrarme al fascinante mundo de las macroalgas y por ser ante todo imparciales y profesionales. ¡Gracias a todos Ustedes!

A Rafic Feghali y a Bernard Priem, por ser mis mejores amigos, por sus consejos, por su apoyo incondicional en las buenas y en las malas, pero sobre todo por adoptarme en su familia: ¡Mil Gracias, Amigos!

A Pascale por demostrarme que el trabajo en equipo y las relaciones de amistad ¡son posibles!

A Verónique, Benoit, Julien, Hassan, Thierry y Stephanie por ser grandes anfitriones e inolvidables compañeros de estudios, por compartir nuestros desvelos, por nuestros días de reflexión y por darnos ánimos unos a otros.

¡Gracias Camaradas!

A mis amigos Jean Michel y Annie, por todo el apoyo otorgado, por las alegrías y tristezas que compartimos, por esas tardes de tenis y de cine en el que nos olvidábamos momentáneamente de los problemas.....

A la Facultad y al Instituto de Química de la UNAM y sus investigadores, por su invitación para exponer los resultados de la tesis en mi país y en mi idioma..... al menos por ese día de exposición.....

A mi nueva Universidad Autónoma de Tamaulipas, UAMRR (Rodhe) aquí en Reynosa, en donde encontré la estabilidad emocional, profesional y moral que tanto necesita mi familia ¡Gracias por siempre!

A mi Dios, que está siempre conmigo.....

A aquellos que no menciono pero que saben que los tengo presente

(Perdón pero el espacio es reducido.

Indice

Resumen.....
Votos Aprobatorios.....
Dedicatoria.....
Agradecimientos.....
Abreviaturas.....
Lista de figuras

IINTRODUCCION

- I. Conocimiento del Material Biológico
 - a) Biología e Importancia evolutiva de las Algas Rojas
 - b) Clasificación Taxonómica del Genero Gracilaria
- II. Constitución de la Pared de las Algas Rojas
 - a) La Organización de las Paredes Celulares
 - b) Los diferentes Polisacáridos en las Algas Rojas
 - 1) El Almidón Florideano
 - 2) Las Celulosas
 - 3) Los Xilanos
 - 4) Los Galactanos
 - c) Variación cuali y cuantitativa del agar en Gracilaria sp.

CAPITULO I: DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA DE EXTRACCION

I.- Introducción

II.- Material y Métodos

- A) Preparación de las muestras
- B) Las Extracciones Fraccionadas
 - 1) Extracción a temperatura ambiente
 - 2) Despigmntación
 - 3) Extracciones fraccionadas con agua o etanol/agua
 - a) Extracción acuosa
 - b) Extracción con etanol/agua
 - 4) Tratamiento de los extractos
- C) El procedimiento Analítico

III.-Resultados

- A) Rendimiento de las extracciones fraccionadas
- B) Caracterización Química de las Fracciones
 - 1) Extracción Fraccionada con Agua
 - 2) Extracción Fraccionada con Etanol/ Agua

IV.- Discusión y Conclusiones

CAPITULO II: DEMOSTRACIÓN DE LA PRESENCIA DE CADENAS LATERALES EN LOS POLIMEROS DEL AGAR

- I. Introducción
- II. Material y Métodos
 - A) La Hidrólisis Enzimática
 - B) La Permetilación
 - C) La Resonancia Magnética Nuclear del C¹³
- III. Resultados
- IV. Discusión y Resultados

CAPITULO III: ESTUDIO FISIOLÓGICO DE LA HETEROGENEIDAD MOLECULAR DEL AGAR

- I. Introducción
- II. Material y Métodos
 - A) Definición de las condiciones de cultivo
 - 1) Preparación de las muestras
 - 2) Condiciones de Cultivo
 - B) Protocolo empleado para las extracciones fraccionadas
 - C) Procedimiento Analítico
- III. Resultados y Discusión

CONCLUSIONES GENERALES

Literatura Citada

Abreviaturas

CFG = Cromatografía en fase gaseosa

HPLC = Cromatografía de líquidos a altas resoluciones

FRE = Fracción resistente a la enzima

DMSO = Dimetilsulfóxido

DEPT = Aumento de distorsión por transferencia polarizada

RMN del C¹³ = Resonancia Magnética Nuclear del Carbono 13.

δ = Desplazamientos químicos en ppm.

F I = neoagarohexaitol

F II = neoagarohexaosa

F III = neoagarotetraosa

Unidad A = 3,6-anhidro-α-L-galactosa

Unidad B = β-D-galactosa

EP = Ejes primarios centrales

RL = Ramificaciones Laterales

PF = Peso Fresco

PS = Peso Seco

CA = Cultivos Alternos

EC = Extracto Crudo

MC = Material Crudo

RAA = Residuo Algal Acuoso

REA = Residuo Algal Etanol Agua

CPC = Condiciones Promotoras del Crecimiento

CNPC = Condiciones No Promotoras del Crecimiento

PN = Plantas Nativas (TT, talos testigos)

♯ = GS (Grado total de Substitución de la Unidad D-galactosa)

α = cociente 6-O-MeGal + 4-O-MeGal / D-galactosa total

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribución ponderal de los diferentes extractos expresada en porcentaje con respecto al peso seco total obtenido para cada tipo de extracción. Ejes ordenadas: % en peso seco.

Figura 2: Identificación del 6-O-metil-galactosa y del 4-O-metil-galactosa

A: CFG del polímero conteniendo 2 compuestos no identificados (A y B)

B: CFG del tetrasacárido preparado a partir del porfirano

* Identificación del compuesto A como 6-O-metil-galactosa

Figura 3: Identificación del 6-O-metil-galactosa y el 4-O-metil-galactosa (respectivamente)

c : Espectro de masas del compuesto B, que corresponde a una 4-O-metil-hexosa

d : CFG del testigo 4-O-metil-galactosa

Identificación del compuesto B como 4-O-metil-galactosa

Figuras 4 y 5: Composición química de diferentes extractos

Distribución expresada en porcentaje molar de los monosacáridos con respecto a los carbohidratos totales

FIGURA 6: Espectro de RMN del C¹³ del polímero. Registro a 80 °C, con 28500 acumulaciones, largo espectral de 22727 Hz. y un tiempo de adquisición de 0.360 segundos.

Figura 7: Cromatografía en Bio-Gel P2, de los oligosacáridos obtenidos por hidrólisis enzimática de un extracto enriquecido con el 4-O-MeGal.

Figura 8: Analisis en Cromatografía en fase gaseosa (CFG) de los eteres metilicos obtenidos por permetilacion, metanolisis y acetilacion de :

a : fraccion F I, reducida con NaBD₄

b : Neoagarohexaitol

ESQUEMAS

Esquema 1: Las diferentes operaciones de extracción fraccionada.

Esquema 2 : Estructura química del polímero del Agar, Unidades D- y L-Galactosa Punto de enlace del 4-O-metil- α -L-galactosa (Karamanos Y, Ondarza MA y colbs. 1988.In: Algal Biotechnology ISBN I-85166-233-2).

Esquema 3 : Estructura propuesta para el dodecasacárido estudiado.

TABLAS

Tabla 1: Contenidos en celulosa de algunas especies de algas rojas (según ROSS, 1953).

Tabla 2 : Composición (en porcentaje molar) de las agarosas extraídas de diferentes agarofitas (Segun PAINTER, 1983).

Tabla 3: Símbolos utilizados por las diferentes series de extracciones fraccionadas.

Tabla 4: Valores de los desplazamientos químicos (δ) del 4-O-metil-galactosa y de sus compuestos de referencia y,

Tabla 5: Valores (δ)^a obtenidos para el polímero enriquecido en 4-O-MeGal obtenido de Gracilaria verrucosa.

Tabla 6: Relación molar del polímero y sus fracciones obtenidas mediante hidrólisis enzimática ^a.

Tabla 7 : Evolución de la biomasa (MF), de la materia seca (MS), contenidos en agua y en polisacáridos a lo largo del ciclo de cultivo.

Tabla 8: Composición química de los diferentes extractos obtenidos por el procedimiento simplificado de las extracciones fraccionadas.

ESTUDIO DE LOS GALACTANOS EXTRAIDOS DE LA PARED DEL ALGA AGAROFITA GRACILARIA VERRUCOSA (HUDS.) PAPENFUSS, CULTIVADA BAJO CONDICIONES CONTROLADAS

INTRODUCCIÓN

I. CONOCIMIENTO DEL MATERIAL BIOLÓGICO Y CONSTITUYENTES DE LA PARED DE ALGAS ROJAS (RHODOPHYTA)

A) Biología e Importancia evolutiva de las Algas Rojas.

Existen evidencias fósiles que muestran que los primeros organismos eucariontes aparecieron, hace 1300 millones de años aproximadamente y de que se trataba principalmente de algas rojas (RAMAN, 1978). El Phylum comprende hoy toda una serie de formas morfológicamente variadas, desde los organismos unicelulares más simples hasta las talofitas con ciclos de vida mas o menos complejos. Estos últimos no aparecieron que a partir del Periodo Paleozoico, es decir hace 220-570 millones de años.

Las Talofitas presentan en común las características siguientes:

- ❖ Las sustancias de reserva se presentan en forma de gránulos
- ❖ Los polisacáridos de la pared están constituidos por una forma primitiva de celulosa asociada a xilanos y a mananos que presentan analogías con las hemi-celulosas de plantas superiores (FREI y PRESTON, 1964).
- ❖ En fin, aparecen polisacáridos sulfatados, acompañados por una variedad excepcional de residuos de carbohidratos substituidos.

Las Algas rojas pluricelulares se diferencian de otras algas eucariontes por los rasgos siguientes:

1. Una ausencia total de formas flageladas
2. En el interior de los cloroplastos, los tilacoides se presentan en forma de lamelas individualizadas, en las que se insertan, además de las

clorofilas; los pigmentos fotosintéticos accesorios como: la ficoeritrina, la ficocianina y los carotenoides.

3. La presencia del almidón florideano, como material de reserva.
4. La existencia de una forma de reproducción sexual oogámica, en la que intervienen carpogonios (células especializadas del talo femenino) y los espermatíes (células reproductoras del talo masculino)
5. La Pared Celular esta compuesta principalmente por 2 compartimentos: una capa interna amorfa, de naturaleza microfibrilar y una capa externa rígida y mucilaginoso, esencialmente compuesta de galactanos como el agar, la carragenina o bien el porfirano (PERCIVAL Y McDOWELL, 1967; MACKIE Y PRESTON, 1974).

B) Clasificación Taxonómica del genero Gracilaria.

Él género Gracilaria pertenece a la Familia de las Gracilariaceae y al Orden Gigartinales. Dicho género cuenta con cerca de 100 especies (KYLIN, 1956) repartidas a través del mundo. En la lista de la Rhodophyta en las costas de Francia, de la península Ibérica y del Mediterráneo Occidental, FELDMANN j. (1977) describe 9 especies de Gracilarias: *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss, G. Armata (C. Ag.) J. Ag., G. Dura (C.Ag.) J.Ag., G. Arcuata Zanard., G. Compressa (C.Ag.) Grev., G. Foliifera (Forsk.) Boergs., G. Corallicola Zanard., G. Conferta Schousb., G. Heteroclada Mont.

Solo las 4 primeras especies viven en la mancha. Su hábitat se localiza en las cubetas del estado medio litoral inferior e infralitoral.

G. verrucosa es una especie muy repartida (HUDSON, 1798). Su carta de repartición, elaborada por BIRD y Colbs., (1982a), según los reportes florísticos; muestra una gran distribución: desde Noruega hasta África del Sur, de Europa a Asia, de América del Norte a América del Sur y en Australia.

La Nomenclatura de las especies en las Algas, se basa principalmente en su morfología y la anatomía del tallo, así como de sus órganos de reproducción.

BIRD y Colbs., (1982a) han demostrado experimentalmente, barreras de aislamiento reproductivo en *G. verrucosa*.

Por otra parte, JUNFUI y Colbs., (1984) se basan en criterios de determinación e identificación de *G. Verrucosa* mediante el estudio morfológico de los órganos de reproducción. Ellos proponen una separación en 3 subgrupos: el europeo, el asiático y el americano. Del mismo modo, YAPHE (comunicación personal) observa las diferencias en la composición bioquímica del agar entre la *G. verrucosa* americana y la francesa en el Cabo Nariz Gris.

G. verrucosa quien es el objeto de nuestro estudio y quien ha sido recolectada entre las poblaciones del Cabo Nariz Gris (Norte de Francia, frente a Inglaterra), estaría cercana a la *Gracilaria* inicialmente descrita por HUDSON (1798).

El ciclo de reproducción de *G. verrucosa* ha sido descrito como perteneciente al tipo *Polysiphonia* (YAMANOUCHI, 1906. El tetrasporofito ($2n$), posterior a la meiosis, libera las tetrasporas (n) que se fijan y se desarrollan en gametófitos (n) sean machos o hembras. La fecundación tiene lugar sobre el gametofito femenino, el cigoto ($2n$) da origen, mediante mitosis vía el carposporofito ($2n$); Un gran número de carposporas ($2n$) que darán lugar a los tetrasporofitos ($2n$).

II: CONSTITUCIÓN DE LA PARED DE LAS ALGAS ROJAS

La Pared de las algas rojas presenta ciertas características estructurales comunes con aquellas de las plantas superiores. Ciertas diferencias son debidas al hecho de que la mayoría de las algas rojas viven en el medio marino en donde la presión osmótica juega un papel determinante. Los constituyentes fibrilares y matriciales de la pared, son responsables en parte de la rigidez parietal.

Entre las algas pluricelulares, encontramos una gran variedad de poliósidos parietales, que no se encuentran en los vegetales superiores. Curiosamente, ciertos poliósidos substituidos por grupos semi-éster-sulfato, se encuentran igualmente presentes en el tejido conjuntivo de los animales.

Gracias a sus propiedades físicas, los productos derivados de los polisacáridos; han sido utilizados por mucho tiempo por el hombre, en una variedad de aplicaciones prácticas: soportes estructurales, adhesivos, placas de protección, geles de hidratación, soluciones viscosas, cromatografía por permeación en gel o por intercambio iónico. Sin lugar a dudas, estas propiedades tienen la misma importancia en las funciones biológicas que juegan los polisacáridos *in situ*. Dichas moléculas presentan un nivel de complejidad estructural análogo al de otras macromoléculas, de tal manera que resulta indispensable estudiarlas de forma detallada si queremos asociar sus propiedades físicas con sus funciones biológicas.

Información actualizada nos enriquece día a día, nuestros conocimientos sobre la elucidación de la estructura primaria de los polisacáridos y su modo de enlace entre los carbohidratos que lo conforman.

A) La Organización de las Paredes Celulares

En General, las paredes celulares presentan una organización ultraestructural heterogénea en la que podemos identificar 2 elementos principales; uno de naturaleza fibrilar, el otro mucilaginoso. Este último es a menudo considerado como una matriz amorfa paracristalina, en la que las microfibrillas se incrustan a manera de un sándwich (HANIC y CRAIGIE, 1969).

Las microfibrillas constituyen la parte más inerte y resistente de la pared celular. El más común y conocido de estos compuestos esqueléticos, es la celulosa, un polímero formado unidades de β -D-glucosa unidas mediante enlaces 1-4. En ciertos casos, esta puede ser reemplazada por polímeros que contienen unidades β -D-manosa unidas mediante enlaces 1-4 o por unidades β -D-xilosa unidas por enlaces 1-3 (FREI y PRESTON, 1961a; PARKER, 1964).

Parecería que esas microfibrillas estuviesen adheridas a la matriz; Sin embargo, la naturaleza y la distribución de los enlaces, continúan siendo un tema poco conocido. Existen evidencias sobre la presencia de proteínas en las paredes en donde los puentes disulfuro parecen jugar una función crucial en el control del crecimiento celular (THOMPSON Y PRESTON, 1968). Observaciones efectuadas

sobre algunas algas, muestran una orientación progresiva de las microfibrillas en la pared, a medida que la estratificación aumenta. Es así como se diferencia una zona externa cuya textura es mas cerrada. Los polisacáridos no esqueléticos o bien sus precursores, que atraviesan las paredes; pueden acumularse en esta lamela externa, dentro de los espacios intercelulares e inclusive llegan a difundirse en el medio acuoso.

Tal es el caso entre los rizoides de *Porphyra* en donde las paredes están constituidas por β -D-xilanos con unidades entrelazadas 1-3, enrollándose por capas cilíndrica de mananos, en el momento en el que se transfieren de manera descendente, hacia la parte basal del tallo (FREI y PRESTON, 1964). Dicha infiltración de la lamela externa, puede representar el origen de la "Cutícula" característica de muchas algas (HANIC Y CRAIGIE, 1969; VERDUS y Colbs., 1986).

B) Los diferentes Polisacáridos de las Algas Rojas.

La mayoría de las Algas Rojas producen toda una variedad de poliósidos hidrosolubles (O'COLLA, 1962). Estos últimos están también constituidos por el ácido urónico, la xilosa, la galactosa o la glucosa (O'DONNELL, 1959). Otras especies pueden contener ribosa y arabinosa formando parte de los polímeros (FISHER, 1957; CRONSHAW, 1958).

1) El Almidón Florideano:

El Almidón florideano es un polímero específico de las algas rojas que ha sido aislado de talos de *Constantina subulifera* (MEUSSE, 1960) y de *Dilsea edulis* (GREENWOOD Y THOMPSON, 1961). Dichos autores lograron el aislamiento al poner en inmersión a las algas rojas, en nitrógeno líquido y romper así las paredes celulares. El residuo insoluble es eliminado y tanto los polisacáridos ácidos como el sobrenadante son tratados con una solución compleja de saturada de CaCl_2 .

Enseguida se obtiene el almidón florideano, sometido a diálisis, congelación y liofilización. Los galactanos pueden ser eliminados por sedimentación después de

una ultra centrifugación. El conjunto de trabajos relacionados al almidón florideano, demuestran la presencia de cadenas de β -glucosa, enlazadas por uniones 1-4 o 1-3, ínter dispersas y en ocasiones substituidas por cadenas laterales sobre los C-6 de los radicales glucósidos.

2) Las Celulosas:

Como en todos los vegetales, la celulosa esta constituida principalmente por α (1-4) glucanos. Encontramos igualmente β (1-4) glucanos, que dan lugar a la celulosa II al cristalizar. Su asociación con otros polímeros tales que xilanos y los mananos, sugiere la presencia de una remarcable complejidad estructural. Hidrólisis realizadas en extractos de *Porphyra* sp. Han mostrado la presencia de radicales manosilados a asociados a la α -celulosa (CRONSHAW, 1958).

Posteriormente BJORND AHL y colbs., (1965) han purificado la celulosa obtenida a partir de paredes de *Rhodymenia pertusa* mediante extracciones secuenciales. Los estudios de metilación, CG-EM así como los de RMN-H¹; han confirmado la presencia de residuos β (1-4)-D-glucopiranosilos. Mas allá de las dificultades en cuanto a una definición, parecería que las algas rojas no presentan mas que de pequeñas cantidades de celulosa (**Tabla 1**).

TABLA 1: Contenidos en celulosa de algunas especies de algas rojas (según **ROSS, 1953**).

Especies de Rhodophytas	% de la materia seca
<i>Corallina officinalis</i>	5.1
<i>Rhodochorton floridullum</i>	7.6
<i>Rhodymenia palmata</i>	2.4
<i>Gelidium cartilagineum</i>	9.0
<i>Gracilaria confervoides</i>	3.8
<i>Gracilaria follifera</i>	4.6
<i>Dilsea edulis</i>	3.1
<i>Gigartina stellata</i>	2.3
<i>Chondrus crispus</i>	2.0
<i>Porphyra umbilicales</i>	3.2

3) Los Xilanos:

Un poliósido hidrosoluble mayoritario ha sido aislado a partir de extractos de *Rhodymenia palmata* (dulce). Este compuesto principalmente por unidades β -(1-3) y $-(1-4)$ -D-xilopiranosilo formando cadenas principales y laterales (BARRY y Colbs, 1950; PERCIVAL, 1967; BJORND AHL, 1965). Otros xilanos han sido aislados a partir de: *Porphyra umbilicales*, *Laurencia pinnatifida* (TURVEY Y WILLIAMS, 1970), *Chaetangium fastigiatum* (CEREZO, 1971 y 1972) Algunos xilanos presentan igualmente cadenas laterales formadas por residuos xilanopiranosilos, como lo han demostrado FREI y PRESTON (1964) y también (TURVEY Y WILLIAMS, 1970). Sus estudios se han centrado en paredes celulares aisladas de *Porphyra umbilicales* y de *Bangia fuscopurpurea*, respectivamente. Los xilanos son pues polímeros ramificados.

Por otra parte, los xilanos son raramente homopolímeros. En *Porphyra*, los xilanos están unidos a la galactosa y a la manosa (JONES, 1950).

TURVEY y WILLIAMS (1970), han encontrado en *Rhodochorton floridulum*, un poliósido que contiene además, residuos de glucosa. Generalmente los autores asocian a los xilanos con las hemi-celulosas, en función de su solubilidad en álcalis y de su composición heterogénea. Sin embargo, FREI y PRESTON (1964) han tenido éxito en separar la cutícula de la pared celular de *Porphyra umbilicales*, mostrando así que la primera esta conformada por residuos β (1-4)-mananos, mientras que la segunda, esta formada por β (1-3)-xilanos. Por otro lado, los fragmentos de D-manosa con un grado de polimerización promedio de 12, han sido identificados en extractos de *Porphyra umbilicales*.

4) Los Galactanos:

En las Algas Rojas, la fase matricial ocupa los espacios extracelulares y conforma un espacio continuo amorfo. Fácilmente extractable, esta posee propiedades físicas que han permitido el desarrollo de la industria de los gelificantes o ficocoloides. Mas sin embargo, la utilización de dichos coloides depende de la naturaleza bioquímica de estos y por ende, de su origen. Entre los galactanos que

son explotados comercialmente y que provienen de las algas rojas encontramos a: las carrageninas, los porfiranos y el agar.

En General, dichos galactanos presentan en común una organización secuencial (REES, 1969). Forman cadenas laterales constituidas por residuos de galactosa (Unidad A = β -Gal; unidad B = α -Gal) enlazadas de manera alternada en enlaces (1-3) (Unidades A) y (1-4)(Unidades B). Se trata por lo tanto de polímeros formados por secuencias (A-B)_n. Se diferencian unos de otros por la naturaleza enantiomérica de la Unidad B y por las sustituciones más o menos numerosas y variadas como:

1. Grupos metil-éter pueden unirse al C-2 o al C-6 de las unidades A, y aun más al C-2 o C-3 de las unidades B.
2. La Unidad A puede tener una sustitución mas compleja en el C-6, por residuos 4-O-metil-L-galactopiranosilo (NUNN y PAROLIS, 1969) o por 4-O-metil-D-galactopiranosilo (ALLSOBROCK, 1974).
3. La Unidad A presenta en ocasiones sustituciones con ácido pirúvico, unido en forma de anillo cíclico mediante puentes acetal en O-4 y en O-6.
4. Las Unidades A pueden ser substituidas por grupos hemi-éster-sulfato en las posiciones C-2, C-4 o C-6, mientras que las Unidades B pueden presentarlas en C-2, C-6 o en ambas simultáneamente.
5. La sulfatación en C-6 de las Unidades B, puede ser suprimida por vía enzimática o química, permitiendo así de un puente 3,6 anhidro característico de los galactanos de algas.

Es así que los Porfiranos se caracterizan por una alto patrón de sustitución de residuos 6-O-metil-D-galactosa (en las unidades A) y por lo menos un 50% de sustitución de las Unidades B, mediante grupos sulfato en la posición C-6 (PERCIVAL Y McDOWELL, 1967).

Los galactanos de Laurencia (BOWKER y TURVEY, 1968a y b), de *Ceranium rubrum* (TURVEY y WILLIAMS, 1976) así como aquellos de la mayoría de los géneros de la Familia Grateloupiaceae (ALLSOBROOK, 1969; NUNN y PAROLIS, 1969), presentan grupos metilos en el C-2 de las Unidades A. En

Anatheca dentata (Coliriaceae), la presencia del 3-O-metil-D-galactosa ha sido descrita por NUNN y Colbs. (1971). Un mucílago muy complejo ha sido extraído de talos de Polysiphonia fastigata (PEAT y Colbs., 1961). Esta constituido tanto por D- y L-galactosa, 6-O-metil-D-galactosa, por 3,6-anhidro-D-y L-galactosa. La presencia de una sulfatación ha sido igualmente señalada en el C-6 de la D- y L-galactosa.

Descubierto por PAYEN en 1859, el Agar es un polimero constituido por la repetición de un motivo de base compuesto por 2 unidades de galactosa unidas alternadamente mediante enlaces 1-4 y 1-3. El modelo ideal esta representado por la Agarosa, cuya estructura ha sido determinada por ARAKI (1937, 1944, 1956, 1966) despues por YAPHE (1957,1960). Se trata del 3,6 anhidro-4-O-(β -D-galactopiranosilo)- α -L-galactosa. La polimerización propociona una cadena de alto peso molecular sobre la cual se puede substituir en el C-6 de la D-galactosa ; eteres metílicos y sobre el C-6 de la L-galactosa, grupos ester-sulfato. El ácido piruvico (HIRASE, 1957) y el ácido D-glucurónico han sido igualmente señalados.

DUCKWORTH y YAPHE (1971), así como IZUMI (1970,1972) han separado por cromatografía de intercambio iónico, varias fracciones y han concluido que el gar es una familia de compuestos que van desde; un galactano muy sulfatado pobre en grupos 3,6 anhidro- α -L-galactosa, hasta la agarosa rica en 3,6-anhidro- α -L-galactosa, pudiendo contener 6-O-metil- β -D-galactosa (**tabla 2**).

Industrialmente, el agar se extrae principalmente de Gelidiales (Gelidium y Pterocladia) y de los Gigartinales (Gracilaria).

TABLA 2 : Composición (en porcentaje molar) de las agarosas extraídas de diferentes agarofitas (Segun **PAINTER, 1983**).

ESPECIES	UNIDAD A			UNIDAD B	
	D-Gal	6-0-Me-D-Gal	3,6-AG	L-Gal	L-Gal-6-Sulfato
<i>Gelidium amansii</i>	49	1.2	48	1.9	0.05
<i>G.subcostatum</i>	44	6.5	48	1.6	0.06
<i>G. japonicum</i>	49	1.4	48	1.9	0.05
<i>Pterocladia tenuis</i>	50	0.7	48	1.3	0.06
<i>Acanthopeltis japonica</i>	47	2.8	48	1.9	0.06
<i>Campylaeophora hypnaeoides</i>	48	0.7	47	3.9	0.06
<i>Gracilaria verrucosa</i>	35	14.6	48	2.0	0.05
<i>Ceranium boydenii</i>	31	18.8	49	1.0	0.03

C) Variaciones cuantitativas y cualitativas del agar de *Gracilaria* sp.

Los resultados sobre los trabajos de las variaciones de los coloides son bastante contradictorios. Aparece sin embargo, que las concentraciones en el agar varían al menos dentro de mismas especies según la localización geográfica y de acuerdo a su estado de desarrollo.

Numerosos autores, DELOACH y Colbs. (1946), HUMM (1951), KIM y HUMM (1965), UMAMAHESWARA (1969), JOHN y ASARE (1975), PENNIMAN (1977), HOYLE (1978b), CHRISTIAEN (1981), DIEPH MINH TAM y EDWARDS (1982); han señalado que el contenido en agar de diferentes especies de *Gracilaria*, sufren variaciones estacionarias. OZA (1978) ha observado, a lo largo de todo el año, variaciones en el rendimiento y en la fuerza de gel del agar extraído de *Gracilaria corticata*.

Más recientemente, WHYTE y Colbs. (1981) han puesto en evidencia un ciclo estacional de la producción y calidad del agar de Gracilaria verrucosa en un periodo de medio año. El sentido de las variaciones cualitativas y cuantitativas es sin embargo bastante controversial: DELOACH y Colbs. (1946) han mostrado que los rendimientos más importantes aparecen en Agosto y que la fuerza de gel es máxima en Junio; por el contrario, HUMM (1951) ha demostrado que las fuerzas Gel en agares de diferentes especies de Gracilaria recolectadas de Septiembre a noviembre, es mas elevada.

Estos 2 autores admiten sin embargo, la existencia de una relación entre el aumento de la biomasa y la disminución en los rendimientos del agar. Dicha relación no puede ser generalizada a todas las especies de Gracilaria, puesto que UMAMAHESWARA (1969), encontró en Gracilaria follifera, así como JOHN y ASARE (1975) en Gracilaria dentata, encuentran una correlación entre el crecimiento y la producción de agar.

Contrariamente a las carragenofitas, parecen no existir diferencias en la composición y el rendimiento en agar, a lo largo de las generaciones de Gracilaria (CHRISTIAEN, 1981; PENNIMAN, 1983). Sin Embargo, KIM y HENRIQUEZ (1979), WHITE y ENGLAR (1979b, 1981), observan diferencias entre los gametofitos y los tetrasporofitos. Aun más, estos últimos han mostrado que los rendimientos y la fuerza de gel, de plantas cistocárpicas son superiores a aquellas de plantas tetrasporofitas y talos vegetativos en Gracilaria verrucosa.

Por el contrario, PENNIMAN (1983) encuentra pocas variaciones en los diferentes estadios del ciclo de vida de Gracilaria tikvahiae y en Gracilaria follifera.

De igual manera, HOYLE (1978a) no reportan diferencias significativas tanto en los rendimientos del agar y la fuerza de gel; entre los pies de talos machos, femeninos o tetraesporofíticos de Gracilaria bursapastoris y en G. coronopifolia.

El contenido en hexosas varía en función del alga: 65% en Gelidium amansii, 48% para Gracilaria confervoides (HONG y Colbs. 1969). Estos autores han precisado que según las especies, la concentración en galactosa puede pasar de 27 a un 41% y aquella del 6-O-metil-D-galactosa, de 2 a 21%; mientras que la

concentración en anhidro-galactosa varía muy poco. Se ha establecido una correlación entre la taxonomía de las agarofitas y el tipo de polisacáridos.

Por otro lado, los residuos pueden sustituir a la molécula en diversos grados. ARAKI y Colbs. (1967) reportan que ciertas especies, y entre ellas las *Gracilaria*, presentan cantidades variables en 6-O-metil-D-galactosa. GUISELEY (1970) ha verificado ese punto al analizar más de 50 muestras de *Gracilaria* y ha evaluado la incidencia de dichas variaciones en la temperatura de gelificación de las soluciones de agar.

ARAKI y Colbs. (1967), describen la presencia del 4-O-metil-L-galactosa, del 2-O-metil-D-galactosa y de pequeñas cantidades de L-galactosa y de la D-xilosa. Por otra parte, DUCKWORTH y YAPHE (1971), REES y CONWAY (1962), así como también CRAIGIE y WEN (1984) hacen la observación de que si las concentraciones en D-galactosa y en 6-O-metil-D-galactosa varían enormemente; la relación molar entre la 3,6 anhidro-galactosa y la D-galactosa total, más el 6-O-metil-D-galactosa, permanece siempre cercano a la unidad.

Los análisis químicos de polímeros de la azarosa han revelado la existencia del 4-O-metil- α -L-galactopiranososa, probablemente unida al C-6 de la β -D-galactopiranososa (CRAIGIE y WEN, 1984; HELLEUR y Colbs. 1985a y b). TURVEY y WILLIAMS (1976) señalan por otra parte la presencia de L-galactosa en la ausencia del 3,6-anhidro-L-galactosa y del L-galactosa-6-sulfato.

LAHAYE y Colbs. (1985) han puesto en evidencia la heterogeneidad del agar en diferentes especies de *Gracilaria*, al analizar por RMN del C¹³, productos de extracciones fraccionadas de mezclas de etanol / agua y detectar, según las especies; El 2-O-metil-3,6-anhidro-L-galactosa y de grupos sulfato, no desplazados por el tratamiento alcalino.

ASARE (1979,1980) y CHRISTIAEN (1981) muestran que los contenidos en 3,6-anhidro-galactosa y en sulfato, varían con las estaciones del año. PENNIMAN (1983) pone en evidencia un ciclo parecido al de *Gracilaria tikvahiae*. Sin embargo, la utilización sistemática del tratamiento alcalino en el procedimiento de extracción seguido por PENNIMAN (1983), limita las comparaciones dado que el

efecto de los hidróxidos libera el sulfato en C-6 de la L-galactosa para dar lugar al puente 3,6-anhidro (REES, 1962).

El aumento del 3,6-anhidro-galactosa y la disminución concomitante del sulfato en agares extraídos al emplear esta técnica, ha sido demostrado en una variedad de especies de *Gracilaria* (HONG y Colbs., 1969; DUCKWORTH y Colbs., 1971; TAGAWA y KOJIMA, 1972; YOUNG, 1974; WHYTE y ENGLAR, 1976, 1979b y 1980).

Las diferencias en concentraciones en 3,6-anhidro-galactosa y en esteres-sulfato, debidas a la poliploidía de talos son controversiales. WHYTE y ENGLAR (1978a) y WHYTE y Colbs. (1981) se inclinan a favor de las variaciones en la composición del agar proveniente de plantas vegetativas, cistocárpicas y tetrasporofíticas. PENNIMAN (1983) no establece por el contrario ninguna diferencia significativa.

Los factores del medio parecen jugar un rol importante en el control de la síntesis del coloide. Es así, como NEISH y SCHACKLOCK (1971) han remarcado que en un medio enriquecido en nitrógeno, las algas experimentan un crecimiento rápido con una acumulación de proteínas, en detrimento de la concentración en polisacáridos (efecto NEISH).

Del mismo modo, PATWARY y VAN DER MEER (1983) revelan una correlación negativa entre el contenido de Nitrógeno en *Gracilaria tikvahiae* y la concentración en agar. De acuerdo a HOYLE (1978c), esta relación entre la biomasa y el agar sería meramente accidental y sería más bien la cantidad de nitrógeno la que establecería los rendimientos en los coloides. STADLER (1984) ha contribuido a esclarecer el papel del nitrógeno, al mostrar que este mismo favorece el crecimiento del alga, mediante el aumento de la materia seca representada esencialmente por los asimilados fotosintéticos; que enmascaran en consecuencia, la síntesis neta del agar dado que este generalmente es expresado con respecto a la cantidad de materia seca del talo.

En cultivos controlados, CRAIGIE y Colbs. (1984), indican que el aporte en nitrógeno ejerce una influencia en la concentración de derivados metilados: 6-O-

metil-D-galactosa en las ramificaciones primarias y(o) del 4-O-metil-L-galactosa en los ejes primarios.

La Temperatura tiene una influencia similar en el metabolismo del agar. Sin Embargo, a la inversa de WANG y YANG (1980) que encuentran una correlación negativa entre la temperatura y la cantidad de mucílagos; JOHN y ASARE (1975) observan los mas elevados rendimientos a medida en que se aumenta la temperatura del agua al máximo.

CRAIGIE y WEN (1984) demuestran que la calidad del agar (consistencia del gel) es inversamente proporcional a la temperatura del cultivo. La metilación del C-2 en la L-galactosa, se ve particularmente favorecida por un crecimiento de tejidos a una temperatura elevada. Aunado a una sulfatación más importante, dicha metilación disminuye la calidad del gel de agar.

Considerando los hechos anteriormente descritos en la literatura, nos interesamos en nuestro laboratorio, por estudiar las variaciones en la composición química de las moléculas de agar extraídas de *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss (Rhodophyta; Gigartinales).

Para llevar a cabo nuestro objetivo, hemos debido precisar los protocolos de extracción fraccionada con el fin de enriquecer las fracciones con marcadores específicos, caracterizar muy en particular un novedoso tipo de sustitución y de definir una estrategia de cultivo controlado; que nos permitiesen de seguir la evolución de los diversos marcadores (grado de sustitución en la cadena principal) en el polímero del agar, en función de diferentes parámetros de cultivo y de la edad de los tejidos.

CAPITULO I: DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA DE EXTRACCIÓN

I.- Introducción

El Agar ha sido definido por mucho tiempo como un polisacárido relativamente homogéneo, soluble en agua caliente. Este concepto ha ido evolucionando por la demostración tanto de la heterogeneidad de las moléculas extraídas (DUCKWORTH y YAPHE, 1971) y por otra parte, por la obtención de fracciones solubles en agua destilada a temperatura ambiente. Ha sido igualmente posible, enriquecer ciertas fracciones con grupos metilados y sulfatados, al realizar extracciones con mezclas de etanol/ agua (LAHAYE y Colbs., 1986) o mediante extracciones fraccionadas en agua (CHRISTIAEN, 1987).

CRAIGIE y WEN (1984) y CHRISTIAEN (1986) han señalado que dichas fracciones mas o menos sulfatadas y más o menos metiladas, podrían reflejar ciertas etapas características del metabolismo del agar. Es posible pues, utilizar estos polímeros como marcadores de la evolución, como testigos verdaderos de la fisiología del desarrollo del alga.

Hemos en un primer paso, comparado las extracciones en agua y (o) en etanol/ agua, con el propósito de definir un protocolo de extracción que permita evidenciar la presencia y función de los marcadores potenciales de la evolución de los polímeros del agar en *Gracilaria verrucosa*.

II.- Material y Métodos:

Hemos seguido a la vez, los rendimientos ponderales de las extracciones en diferentes etapas y de una manera más detallada; la presencia en mas o menos grandes cantidades de los constituyentes característicos del agar. Por razones técnicas, este estudio ha sido realizado con lotes de ramificaciones, como único material biológico estando disponible y seguido de la puesta en cultivo de otros fragmentos de talos, dentro del objetivo de estudiar la fisiología del alga (Capitulo III).

A) Preparación de las Muestras:

Muestras de *Gracilaria verrucosa* han sido recolectadas durante el mes de Diciembre de 1985, en el Cabo Nariz Gris, en la Mancha Oriental al Norte de Francia. Los talos enteros fueron limpiados mediante ultrasonido en una tina Bransonic (3 veces, 3 minutos) conteniendo agua de mar. Fueron enseguida enjuagadas con agua de mar, escurridas en una centrífuga (2 veces, 5 minutos, 600 vueltas/ minuto). Dos lotes fueron separados y pesados (peso de la materia fresca al inicio, peso de la materia seca después del proceso de liofilización).

Enseguida, fueron nuevamente subdivididas, trituradas (A, B) o no (X, Y) antes de ser expuestas a las diferentes extracciones fraccionadas. **La Tabla 3** nos presenta los símbolos empleados para las diferentes series de extracción

Tabla 3: Símbolos utilizados por las diferentes series de extracciones fraccionadas.

Tipo de Extracción	talos enteros	talos triturados
Etanol / agua	Talos X (6.0 g)*	polvo A (5.0 g)
Agua Destilada	Talos Y (6.0 g)	polvo B (5.0 g)

* Entre paréntesis, la masa seca del material empleado

B) Extracciones Fraccionadas

Las 2 primeras etapas son comunes para la extracción con agua y la extracción con etanol/ agua. Las diferentes operaciones de extracción son resumidas en el **esquema 1**.

- 1) Extracción a temperatura ambiente

Los talos (tritutados o no) son sometidos a extracción 2 veces en 1 l de agua destilada, durante 12 horas y a una temperatura ambiente; de manera a obtener una fracción relativamente cargada, denominada "Extracto frío", cuya descripción detallada no ha sido el objeto de este estudio.

2) Despigmntación:

Esta etapa tiene por objetivo, llevar a cabo una eliminación casi total de todos los pigmentos fotosintéticos, así como de los compuestos como las proteínas, los lípidos (intracelulares). Las muestras son tratadas sucesivamente con solventes orgánicos tales que la acetona y el etanol (en frío), seguido de etanol en ebullición (2 veces con 300 ml, durante 2 horas); hasta la obtención de filtrados incoloros. El residuo seco es denominado "material bruto".

3) Extracciones Fraccionadas con agua y etanol/ agua

a) Extracción con Agua

El material bruto es sometido a extracciones sucesivas a 40, 60, 80 y 100 °C, por duplicado, en 300 ml de agua destilada, durante 1h30; posteriormente sometidos a autoclave (1 atm, 121 °C) 2 veces en 300 ml de agua destilada durante 1h30.

b) Extracción en etanol/ agua

El material bruto es sometido a extracciones sucesivas con mezclas etanol/ agua conteniendo 80, 60, 40 y un 20% de etanol, seguido de una extracción con agua destilada a 100 °C y finalmente en autoclave (2 veces con 300 ml de agua destilada, 1h30 para todas las etapas, 121 °C).

4) Tratamiento de los Extractos

Después de cada etapa, los sobrenadantes son reunidos, filtrados sucesivamente en tamiz metálico, tejidos, posteriormente en membranas de 8, 3 y 0.45 µm. Después de una concentración en evaporador rotativo, los extractos son congelados y liofilizados

Talos enteros o triturados	
Extracto frío	
Despigmentación	
Material Bruto	
Extracción con Agua	Extracción con Etanol /agua
	80 °C
40	60 °C
60	40 °C
80	20 °C
100	100 °C
autoclave	autoclave (121 °C)

Esquema 1: Las diferentes operaciones de extracción fraccionada.

C) EL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

1) La composición en Galactosa no substituida, así como en galactosa substituida por grupos éter-metílicos; ha sido establecida por cromatografía en fase gaseosa (CFG). Los monosacáridos han sido analizados bajo la forma de acetatos de alditol, preparados previa hidrólisis ácida (HCl 2M, 2h a 100 °C) según lo describe SLONEKER (1972). Los acetatos de alditol fueron separados por cromatografía de gases, empleando una columna CP Sil 5CB (Chrompack).

Los espectros de masas fueron registrados con un espectrómetro RIBBER 10-10, utilizando una energía de electrones de 70 eV y una corriente de ionización de 0.2 mA.

2) La cantidad de sulfatos se estableció por colorimetría (TERHO y HARTIALA, 1971) o mediante adaptación de la técnica de cromatografía de líquidos a altas resoluciones (HPLC) siguiendo las instrucciones señaladas por MAAS y Colbs. (1986). Dichos valores son establecidos bajo la hipótesis de que todo el sulfato esta unido al C-6 de las unidades L-galactosa.

3) La concentración en 3,6-anhidro-L-galactosa es determinada por ensayos colorimétricos (YAPHE, 1960).

III.- RESULTADOS

A) Rendimiento de las extracciones fraccionadas.

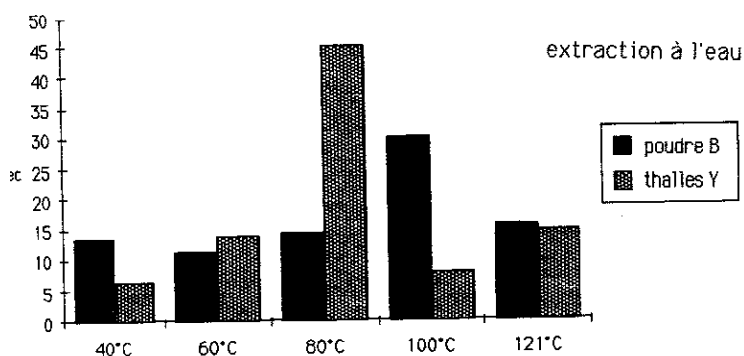
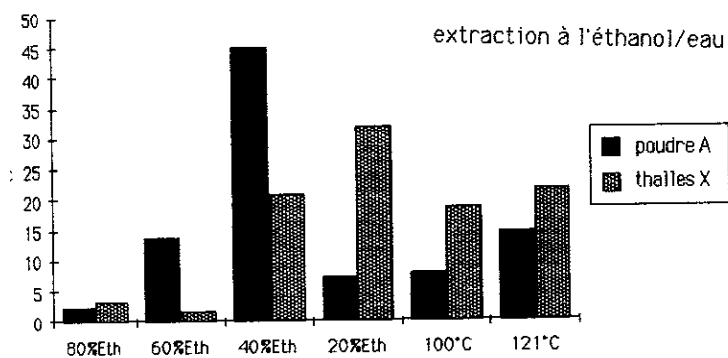


Figura 1: Distribución ponderal de los diferentes extractos expresada en porcentaje con respecto al peso seco total obtenido para cada tipo de extracción. Ejes ordenadas: % en peso seco.

B) Caracterización química de las fracciones

Los resultados son expresados sobre la base de cálculo de las composiciones molares en monosacáridos.

El 6-O-metil-D-galactosa ha sido identificado mediante comparación con el tetrasacárido de Porfirano extraído a partir de la macroalga *Porphyra umbilicalis* que contenía: 1 residuo de galactosa por 1 residuo de 6-O-metil-galactosa (**figura 2**). De la misma manera, por comparación con el testigo y su espectro de masas, hemos identificado nosotros en el laboratorio, a la 4-O-metil-L-galactosa*. Hemos podido demostrar la presencia simultánea de estos 2 compuestos en *Gracilaria verrucosa* y completar de esta forma, la demostración de la presencia del 6-O-metil-galactosa, anteriormente señalado por CHRISTIAEN (1981) colega.

1) Extracción fraccionada con Agua

Para los talos enteros, es en los extractos a 40 y a 60 °C, que constatamos la presencia de fracciones enriquecidas en 6-O-MeGal y en 4-O-MeGal (**figura 3**).

La cantidad de 6-O-MeGal disminuye con el aumento de la temperatura, mientras que el 4-O-MeGal aumenta ligeramente. En el caso de los talos triturados, globalmente, se observa un aumento progresivo para ambos marcadores biológicos. La concentración en sulfatos es más importante en el caso de los talos triturados, aunque su distribución parece idéntica.

2) Extracción fraccionada con Etanol/ agua

En este caso, los marcadores son sobretodo abundante en las extracciones con alto porcentaje en etanol y su cantidad disminuye con el aumento de la parte acuosa. Finalmente mediante autoclave, se presenta un nuevo aumento, cada vez más notorio con los talos triturados (**figuras 4 y 5**). De cualquier forma, en el caso de los talos enteros, se observa un ligero pero constante incremento en 4-O-MeGal.

Podemos constatar que, como en la extracción acuosa, las fracciones más difíciles a movilizar y en principio, representando a los polímeros íntimamente adheridos a la pared celular; Son más ricos en residuos 4-O-MeGal que en 6-O-MeGal.

* Agradecemos al Profesor J.S. CRAIGIE, Halifax, Canada; por obsequiarnos una muestra del 4-O-MeGal.

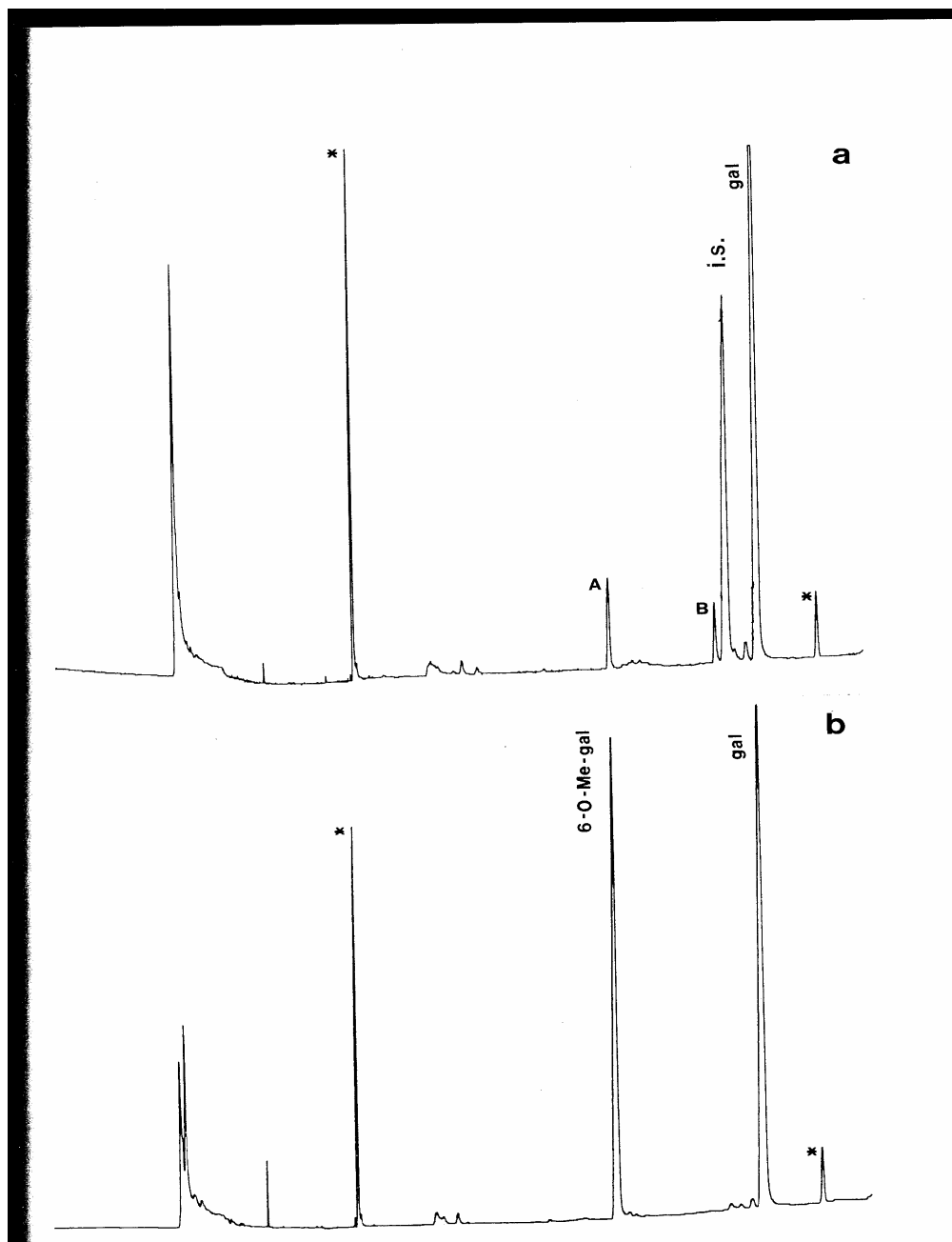


Figura 2: Identificación del 6-O-metil-galactosa y del 4-O-metil-galactosa

A: CFG del polímero conteniendo 2 compuestos no identificados (A y B)

B: CFG del tetrasacárido preparado a partir del porfirano

* Identificación del compuesto A como 6-O-metil-galactosa

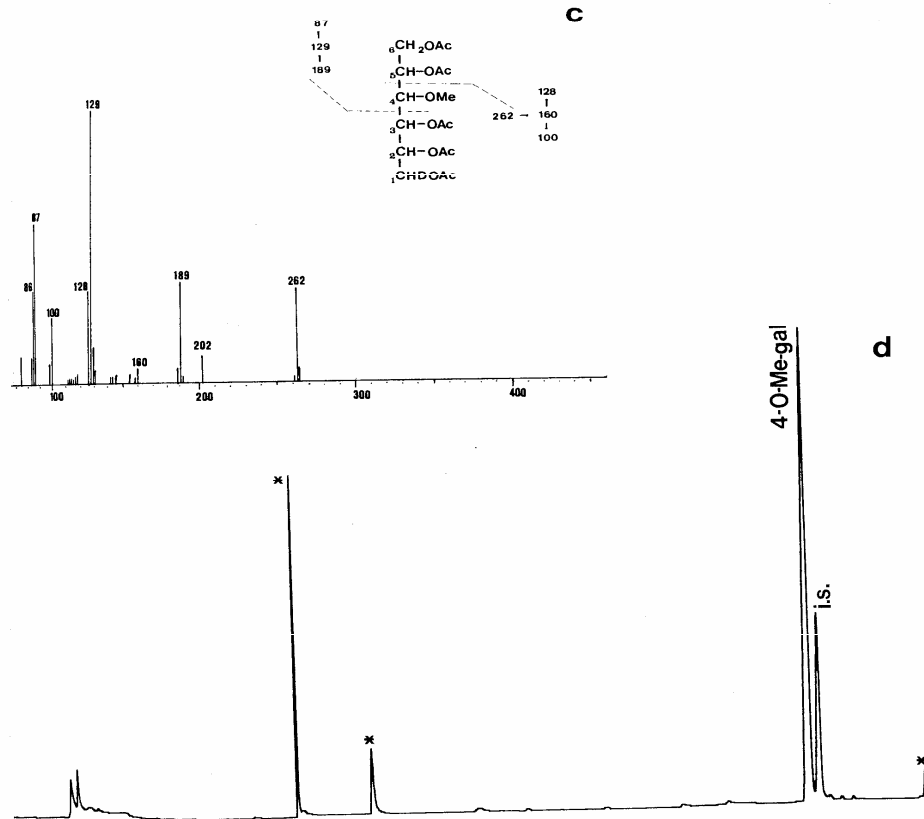
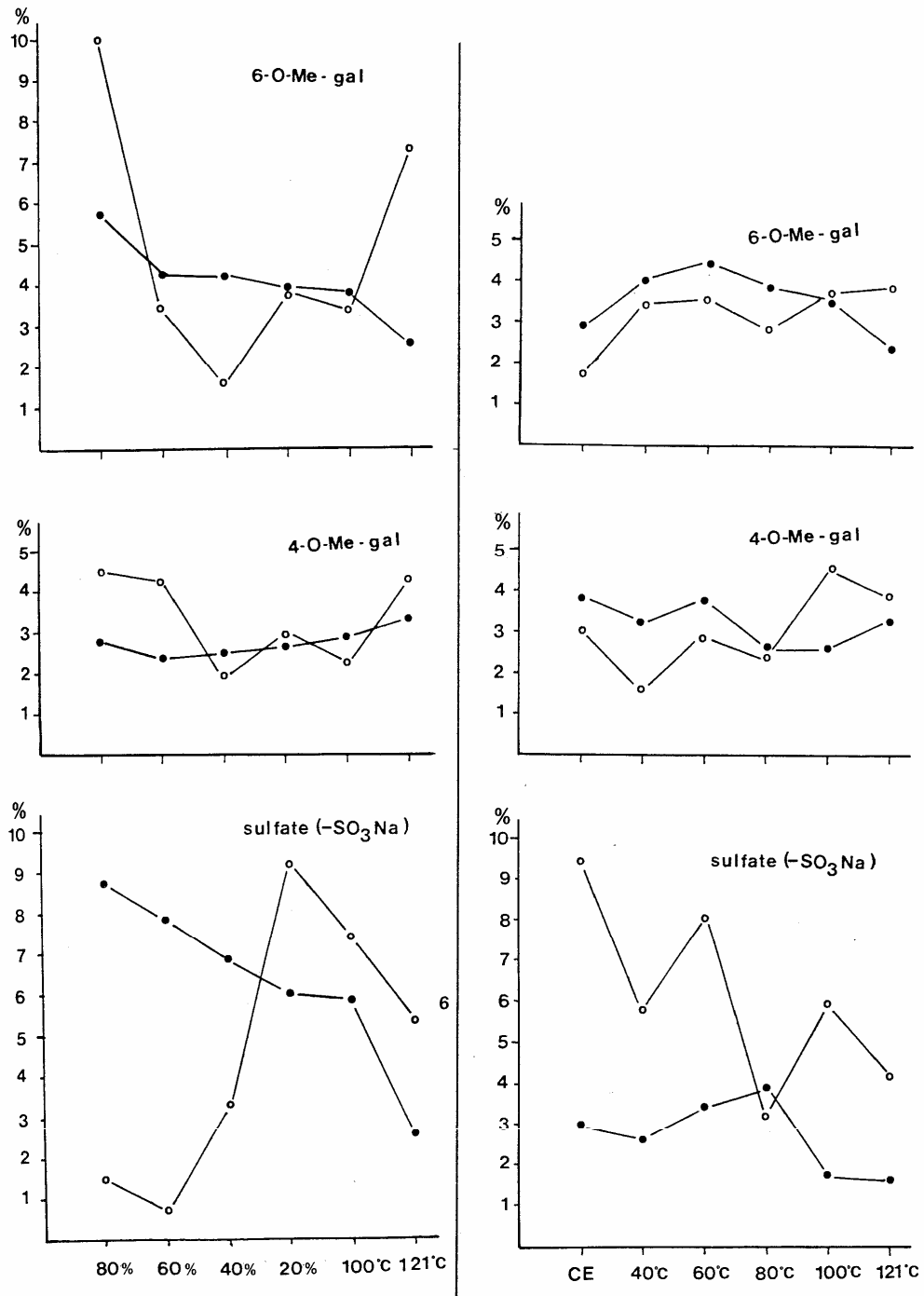


Figura 3 : Identificación del 6-O-metil-galactosa y el 4-O-metil-galactosa (respectivamente)

c : Espectro de masas del compuesto B, que corresponde a una 4-O-metil-hexosa

d : CFM del testigo 4-O-metil-galactosa

Identificación del compuesto B como 4-O-metil-galactosa



Figuras 4 y 5: Composición química de diferentes extractos
 Distribución expresada en porcentaje molar de los monosacáridos con respecto a los carbohidratos totales
 0---0---0 polvo ●-----●-----● talos enteros

IV.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El Primer objetivo consistió en investigar las condiciones de extracción más favorables para obtener los mejores rendimientos ponderales de los polisacáridos hidro y órgano solubles. Desde este punto de vista, la masa seca de los polímeros obtenidos en cada etapa, constituye un buen criterio de evaluación. Este puede ser completado por una cuantificación de los carbohidratos totales.

No podemos nosotros llegar a concluir en función de estos resultados iniciales; dado que los rendimientos fueron equivalentes en todos los casos; a excepción del polvo B con un 21.4 %, debiéndose probablemente a un error en el manejo de la etapa de filtración con tejido. Sin embargo, la trituración de los talos permitió la obtención de fracciones “Extracto frío” en cantidades interesantes, que no fue el caso para los talos enteros.

El segundo objetivo, consistió en determinar la composición química de los extractos, de manera a identificar aquellas fracciones enriquecidas en substituyentes de la D- y L-galactosa. Ello nos ha permitido confirmar la presencia del 6-O-MeGal y encontrar el 4-O-MeGal.

En lo que respecta a la extracción acuosa, la utilización de bajas temperaturas (60 °C) permitió la extracción de polímeros ricos en 6-O-MeGal así como de 4-O-MeGal, independientemente del tipo de material empleado (triturado o no). Aun más, se constató un aumento gradual en las cantidades del 6-O-MeGal y del 4-O-MeGal en aquellas fracciones expuestas a una extracción a altas temperaturas.

Por otra parte, observamos una rápida solubilización de fracciones enriquecidas con 6-O-MeGal, en las mezclas etanol/ agua ricas en etanol, tanto para talos triturados y no triturados. En las fracciones extraídas por autoclave, se observó un aumento en la presencia del 4-O-MeGal. Además, se observó una mejor solubilización de las fracciones enriquecidas en 6-O-MeGal y en 4-O-MeGal, al alcanzar el punto de ebullición en ausencia de etanol. Todos estos resultados nos permitieron decidir, la selección de las condiciones siguientes para experimentos posteriores:

- ❖ Trituración a polvo de los talos
- ❖ Extracción acuosa a temperatura ambiente
- ❖ Después, extracción fraccionada con agua destilada a 60 °C y en autoclave (1 atm, 121 °C)
- ❖ Y, extracciones fraccionadas con una mezcla etanol/ agua (40:60) y autoclave (1 atm, 121 °C),

Ya que estas condiciones nos permiten obtener 5 fracciones con composiciones químicas bastante diferentes que sirven de soporte para el estudio de las condiciones fisiológicas.

El resultado más interesante obtenido de este primer estudio; es la demostración de la presencia del 4-O-metil-galactosa en todas las fracciones en proporciones variables. Debido a la importancia previsible que dicho monosacárido pudiese tener dentro del metabolismo del agar; hemos decidido determinar su modo de enlace dentro de los polímeros del agar.

Es este aspecto el que vamos a describir en el siguiente capítulo (II), antes de llevar a cabo los estudios fisiológicos sobre la heterogeneidad molecular el agar.

CAPITULO II. DEMOSTRACIÓN DE LA PRESENCIA DE CADENAS LATERALES EN LOS POLIMEROS DEL AGAR.

1.- Introducción

El 4-O-metil-L-galactosa ha sido descrito por ARAKI y Colbs., (1967) en pequeñas cantidades en *Gracilaria amansii*. Posteriormente se le encontró en polisacáridos aislados de algas del Orden Grateloupiaceae (FARRANT Y colbs., 1971; ALLSOBROOK y colbs., 1974) y en Gracilariaceae (DUCKWORTH y colbs., 1971. CRAIGIE y WEN (1984) y CRAIGIE y colbs., (1984) notaron que el cociente de la relación L/ D-galactosa en las especies que ellos estudiaron; Siempre estaba cercana a la unidad (1), lo cual reflejaba la estructura fundamental de la unidad de repetición disacarídica (α -L-gal----- β -D-gal).

Por tal motivo, el 4-O-metil-galactosa, no podía participar en la cadena principal. Estos autores lograron mostrar asimismo, por una parte; que la calidad del gel (fuerza del gel) se deterioraba cuando había un aumento de este residuo, y por otro lado, que su contenido dependía de la edad de los tejidos vegetales.

Hemos demostrado el tipo de enlace del 4-O-metil-L-galactosa, mediante el empleo de hidrólisis enzimáticas, para aislar fracciones altamente substituidas y en conjunción con análisis por Resonancia Magnética Nuclear del carbono (C^{13}), así como también mediante una permetilación acoplada a la espectrometría de masas.

1. MATERIAL Y METODOS

A) La Hidrólisis Enzimática

Las porciones altamente substituidas de los polímeros del agar, lograron ser obtenidas mediante una hidrólisis enzimática empleando la enzima β -agarasa I (E.C.3.2.1.8.1) a partir de *Pseudomonas atlántica*. La cepa nos fue amablemente cedida por el Profesor W. Yaphe (q.e.p.d).

La enzima fue preparada y el hidrolizado conducido de acuerdo a la metodología descrita por MORRICE y colbs., (1983). La fracción resistente a las enzimas (FRE) se precipitó con etanol. El sobrenadante se evaporó a sequedad,

se predisolvió en agua destilada y los oligosacáridos fueron fraccionados en una columna Bio-Gel P2 (130 x 1.6 cm; agua destilada).

B) La Permetilación

La Permetilación fue efectuada de acuerdo a PAZ PARENTE y colbs., (1983). Los espectros de masa fueron interpretados utilizando la base de datos proporcionada por CHIZOV y colbs., (1982) para el caso de los derivados 3,6-anhidro-L-galactosa y los datos de FOURNET y colbs., (1981) para los valores de las hexosas. Se registraron los espectros de masa en un Espectrómetro RIBBER 10-10 con una energía de electrones de 70 eV y una corriente de ionización de 0.2 mA.

C) Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del C¹³

Las soluciones de las diferentes fracciones en el D₂O (1 a 4%) fueron analizadas con un espectrómetro BRUCKER AM 400 en sondas duales de 5 mm.

Los espectros del C¹³ (100.62 MHz) desligados del protón, fueron registrados a 30 °C para los oligómeros, y a 80 °C para el caso de los polímeros.

Los desplazamientos químicos (δ) fueron medidos en comparación dimetilsulfoxido (DMSO, $\delta = 39.6$), introducidos en la muestra y convertidos a valores relativos con el tetrametilsilano externo. La secuencia DEPT (aumento de distorsión por transferencia polarizada) ha sido utilizada de acuerdo a la técnica descrita por DOODRELL y colbs., (1982).

III. RESULTADOS

Hemos constatado en un primer tiempo, por medio de la cromatografía en fase gaseosa, la presencia de una 4-O-metil-hexosa, identificada como 4-O-metil-galactosa sobre la base de su espectro de masa y de su tiempo de retención (**figura 2**).

Dicho testigo, resultó muy útil en la interpretación de los espectros de la RMN del C¹³ registrados con los oligómeros y los polímeros. La **tabla 4** reúne los valores obtenidos para ese residuo, para su metil glicósido; Así como los valores para la galactosa y su metil glicósido, al igual que aquellos obtenidos por LAHAYE

y cols., (1985) para la L-galactosa presente en la molécula precursora desulfatada.

Hemos registrado el espectro RMN del C^{13} , perteneciente a una fracción enriquecida en 4-O-metil-galactosa (**figura 6**). Las 12 señales características de las unidades de agarobiosa concuerdan con los valores reportados en la literatura, y de igual manera lo hacen, con las resonancias complementarias para el 6-O-metil-galactosa (**tabla 5**). Varias resonancias (B) adicionales aparecen, correspondiendo probablemente a las unidades 4-O-metil- α -L-galactosa.

Tabla 4: Valores de los desplazamientos químicos (δ) del 4-O-metil-galactosa y de sus compuestos de referencia y, **Tabla 5:** Valores (δ)^a obtenidos para el polímero enriquecido en 4-O-MeGal obtenido de *Gracilaria verrucosa*.

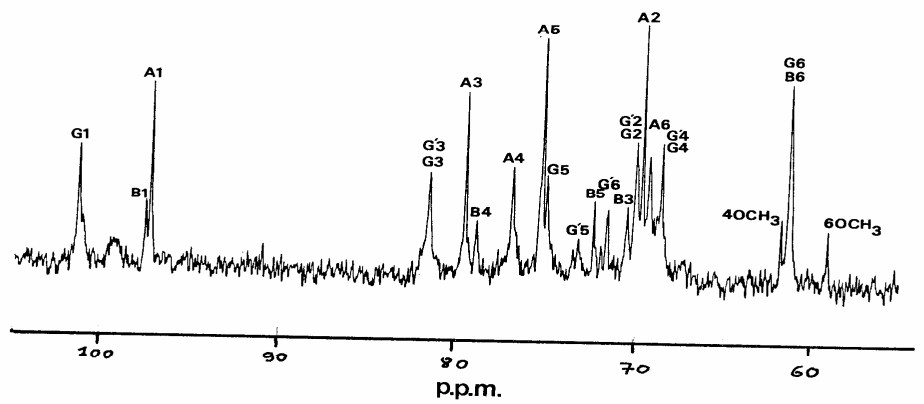
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	OMe-1	OMe-4
α -D-gal ^a	93.20	69.40	70.20	70.30	71.40	62.20		
4-O-Me- α -gal	92.91	69.41	70.36	80.53	71.49	61.44		62.08
Me- α -D-gal ^a	100.10	69.20	70.50	70.20	71.60	62.20	56.00	
Me-4-O-Me- α -gal	100.13	69.33	70.74	80.56	71.80	61.55	55.86	62.07
α -L-gal ^b	100.94	69.37	71.04	79.32	72.20	61.18		

unité	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	OMe-6	OMe-4
G	102.40	70.27	82.29	68.78	75.37	61.45		
A	98.32	69.91	80.16	77.39	75.67	69.49		
G'				69.01	73.62	71.87	59.10	
B	98.73		70.73	79.46	72.65	61.44		61.84
A ^t	98.29	69.74	81.05	70.16	77.50	69.19		

^a : a 80°. G, A, A^t, G' et B correspondent a D-galactopyranose, 3,6-anhydro-L-galactopyranose, 3,6-anhydro-L-galactopyranose no reducteur, 6-O-méthyl- D-galactopyranose et 4-O-méthyl-L-galactopyranose respectivement.

a: Según BOCK y PEDERSEN (1983)

b: Según LAHAYE y colbs. (1985)



G = D-galactose
 A = 3,6-anhydro-galactose
 4OCH₃ = méthyl du 4-O-méthyl-galactose
 G' = 6-O-méthyl-galactose
 B = 4-O-méthyl-galactose
 6OCH₃ = méthyl du 6-O-méthyl-galactose

FIGURA 6: Espectro de RMN del C^{13} del polímero. Registro a 80 °C, con 28500 acumulaciones, largo espectral de 22727 Hz. y un tiempo de adquisición de 0.360 segundos.

G corresponde a la D-galactosa, A al 3,6 AG (anhidrogalactosa), G' al 6-O-MeGal y B a las Unidades del 4-O-MeGal.

La Fracción resistente a la enzima (FRE), representa el 14.9% del agar total. Las fracciones mayoritarias obtenidas con la columna Bio-Gel P2 (**figura 7**), contenían a la neoagarotetraosa (F III, 36.9%) y a la neoagarohexaosa (F II, 24.2%). Estas 2 fracciones contienen igualmente pequeñas proporciones de oligosacáridos conteniendo al 6-O-MeGal.

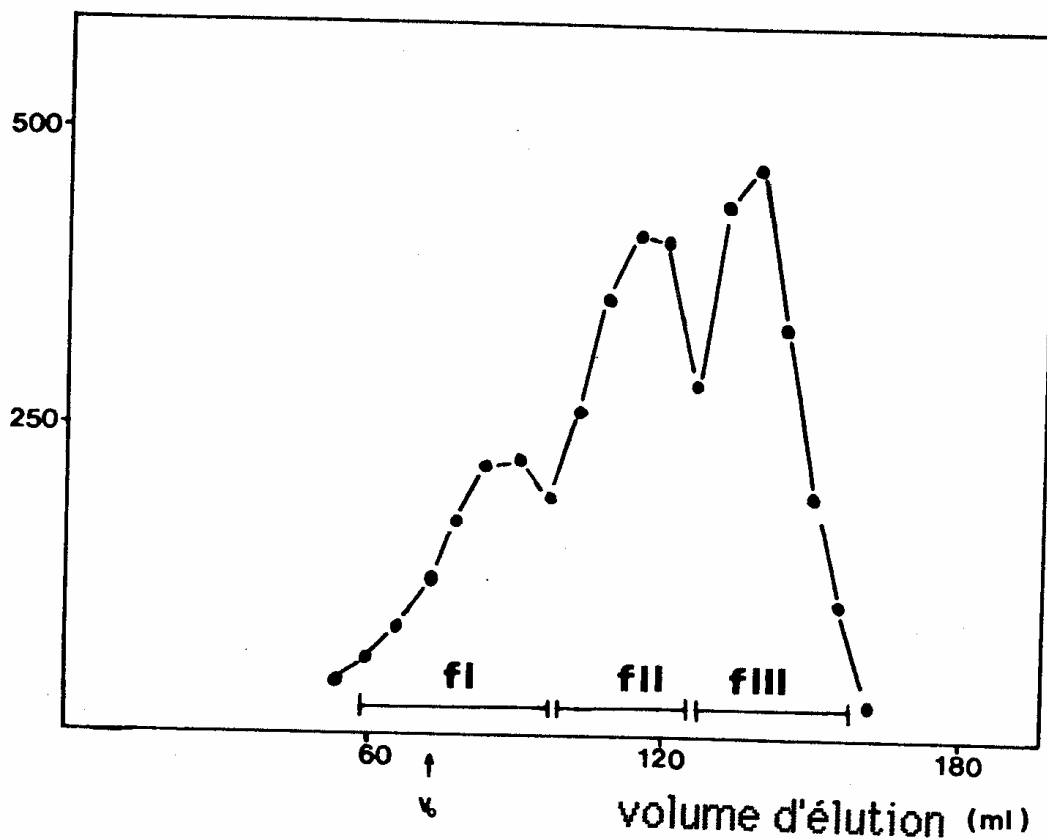


Figura 7: Cromatografía en Bio-Gel P2, de los oligosacáridos obtenidos por hidrólisis enzimática de un extracto enriquecido con el 4-O-MeGal.

La fracción F I (13.7%) se encontraba enriquecida en 4-O-MeGal, con una composición similar a aquella de la FRE (**tabla 6**). La fracción FRE contiene pequeñas cantidades de galactosa-6-sulfato (comprobado por RMN del C¹³).

Las investigaciones se continuaron con la fracción F I, la cual presentaba 2 ventajas: no se constató la presencia de la galactosa-6-sulfato, y los oligosacáridos eran solubles a la temperatura ambiente. Su espectro en RMN del C¹³, ha sido comparado con los datos suministrados por la RMN de la neoagarohexaosa. La secuencia DEPT (**figura 8**) ha permitido la interpretación de las señales de los C-6 correspondientes a la G, G', A y A^t (3,6 AG en posición terminal no reductora).

Tabla 6: Relación molar del polímero y sus fracciones obtenidas mediante hidrólisis enzimática ^a.

	6-OMe-Gal	4-OMe-Gal	Gal	%en poids
Agar	0.33	0.12	1	
E.R.F.	1.07	0.36	1	14.9
FI	0.87	0.29	1	13.7
FII	0.05	0.01	1	24.2
FIII	0.02		1	36.9

a: base de 1 residu de galactose
 6-OMe-Gal correspond a 6-O-méthyl-D-galactopyranose
 4-OMe-Gal correspond a 4-O-méthyl-L-galactopyranose
 Gal correspond a D-galactopyranose.

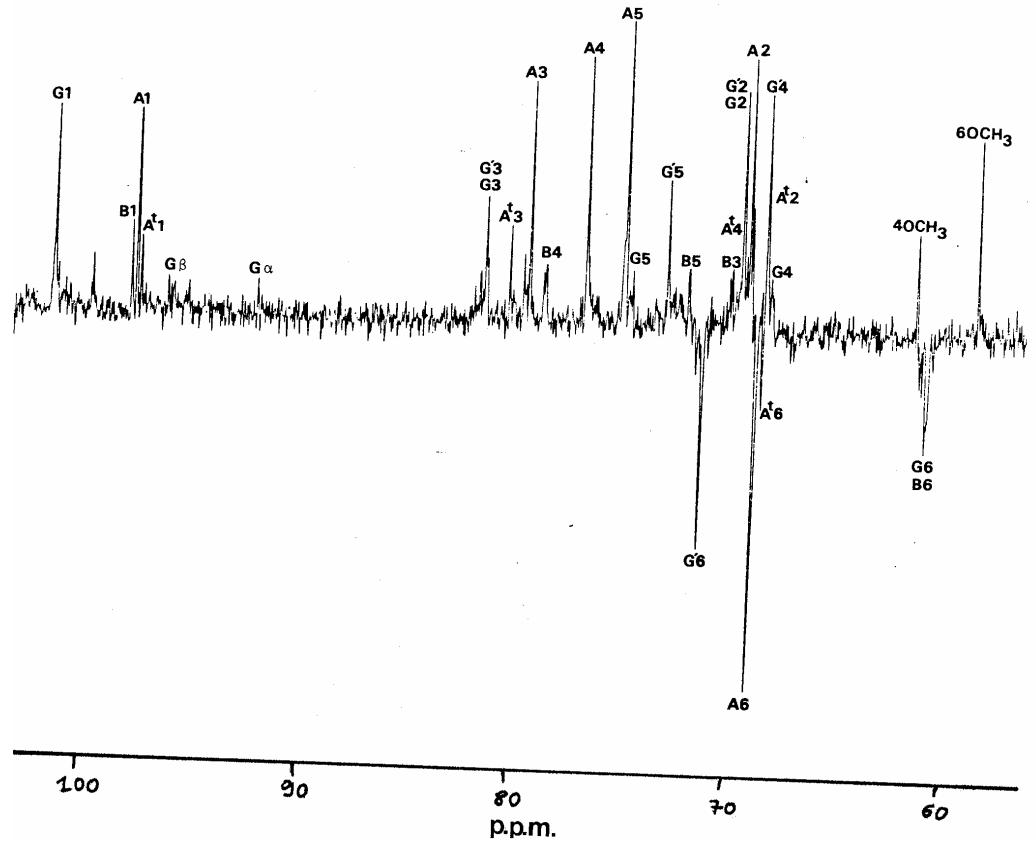


FIGURA 8 : Espectro de RMN del C^{13} de la fracción F I (secuencia DEPT). Registro a 30 °C, con 61522 acumulaciones, largo espectral de 23809 Hz. y un tiempo de adquisición de 0.344 segundos.

G = D-galactosa
 A = 3,6-anhidro-galactosa
 B = 4-O-metil-galactosa
 4OCH₃ = metilo del 4-O-MeGal
 6OCH₃ = metilo del 6-O-MeGal

G' = 6-O-metil-galactosa
 A^t = 3,6 AG no reductora

La señal en $\delta = 61.43$ es larga, debido, a las unidades B. La señal O-metilo de las unidades B, es muy diferente a la de las unidades G'. Comparando con los valores de referencia (**tabla 4**), se ha logrado interpretar los valores correspondientes a los C-3, C-4 y C-5. Los oligosacáridos se terminan todos en posición no reductora mediante el 3,6-AG (A[†]).

Hemos comprobado, mediante comparación con la neoagarohexaosa, una señal adicional en la región e los Carbonos anoméricos en $\delta = 98.73$ debida probablemente al C-1 de las unidades B.

Con los datos de la RMN, no es posible establecer la posición de enlace del 4-O-MeGal. Este, ha sido demostrado mediante comparación del residuo F I reducido (NaBH_4) con el neoagarohexaitol (**figura 9**), después de una permetilación, metanólisis y acetilación. Los éteres metílicos obtenidos a partir del neoagarohexaitol, eran (los números entre paréntesis corresponden a los picos enumerados en los cromatogramas de la **figura 9**):

1. El 2,4,6-tri-O-metil-galactosa (5,7) y,
2. El 1,2,4,5,6-penta-O-metil-galactitol (6).

Diversos compuestos minoritarios han sido observados y que corresponden a derivados del 3,6 AG (anhidrogalactosa). Algunos han sido identificados mediante cromatografía en fase gaseosa (CFG) acoplada a la espectrometría de masas como:

- ❖ El metil 3,6-anhidro-2-mono-O-metil-galactopiranososa (3),
- ❖ El metil 3,6-anhidro-2,4-di-O-metil-galactopiranososa (1),
- ❖ El 3,6-anhidro-2-mono-O-metil-galactosa dimetilacetal (8) y
- ❖ El 3,6-anhidro-2,4-di-O-metilgalactosa dimetilacetal (4).

Para la F I, además de los compuestos observados en el caso del neoagarohexaitol; hemos igualmente identificado el 2,3,4,6-tetra-O-metil-galactosa (2) y una cantidad equivalente del 2,4-di-O-metil-galactosa (9,10).

Estos 2 éteres metílicos corresponden al 4-O-metil-galactosa y a su punto de enlace (el C-6 de la D-galactosa) respectivamente (**esquema 2**). El grado de polimerización de la fracción F I (numero de unidades de repetición) calculado a

partir de los cromatogramas, es de 6. La relación molar de esta fracción (**tabla 6**) corresponde a este cálculo estimado.

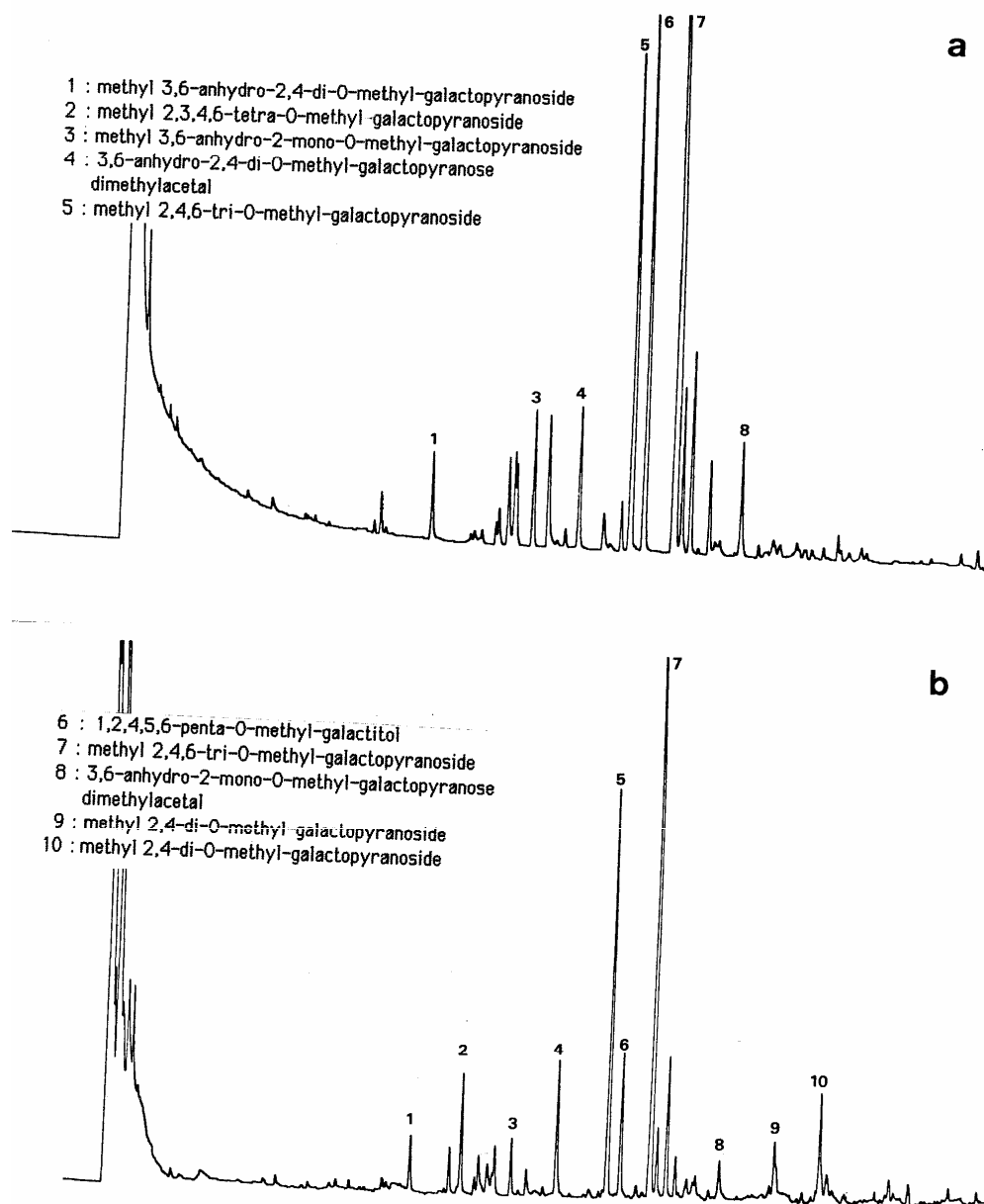
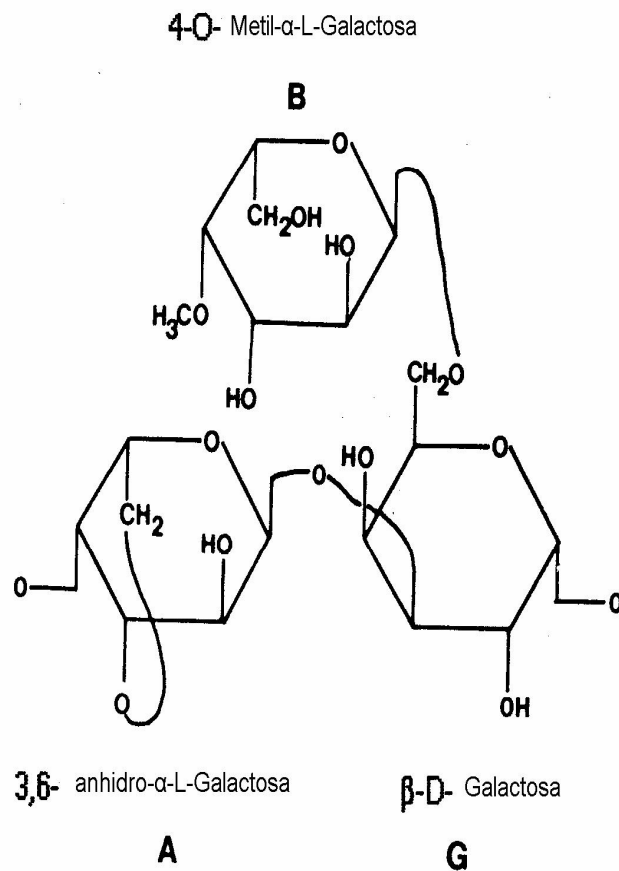


Figura 9: Análisis en Cromatografía en fase gaseosa (CFG) de los eteres metilicos obtenidos por permetilacion, metanolisis y acetilacion de :

a : fraccion F I, reducida con NaBD₄

b : Neoagarohexaitol



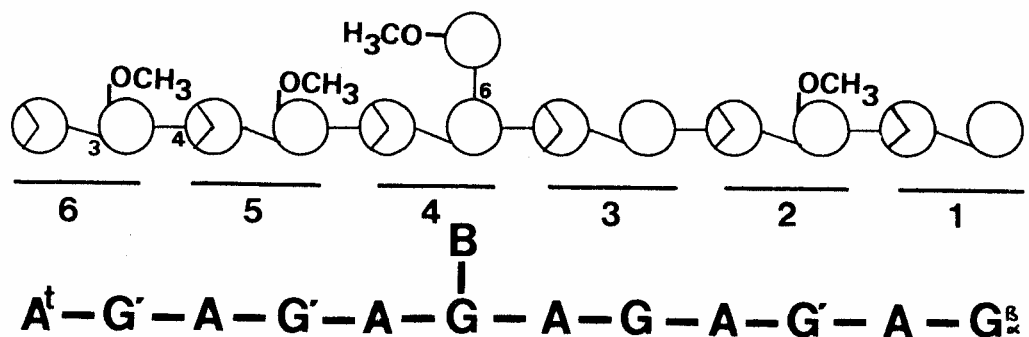
Esquema 2 : Estructura química del polímero del Agar, Unidades D- y L- Galactosa Punto de enlace del 4-O-metil- α -L-galactosa (Karamanos Y, Ondarza MA y colbs. 1988.In: Algal Biotechnology ISBN I-85166-233-2).

IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES

La utilización de la β -agarasa I a partir de *Pseudomonas atlántica*, nos permitió aislar oligosacáridos enriquecidos en 4-O-metil-galactosa, el cual se demostró estar unido al C-6 de la Unidad D-galactosa. El hecho de que el contenido en 4-O-metil-galactosa sea superior en la fracción F I y en la fracción FRE (resistente a la enzima); demuestra que las sustituciones laterales protegen al polímero en contra de degradaciones enzimáticas, que se presentan probablemente por conglomeraciones estéricas.

Hemos asimismo constatado, que las sustituciones en la Unidad D-galactosa en la posición C-6, intervienen en bloques, en promedio; de 6 unidades contiguas, conteniendo: 3 residuos 6-O-metilgalactosa y 3 residuos de galactosa, en donde 1 de ellos, lleva el enlace con el 4-O-metil-galactosa (**esquema 3**).

Dado que todos los oligosacáridos se terminan con el 3,6-AG en posición no reductora, parecería que 1 residuo de la D-galactosa permanece sin ser sustituido. Conociendo la especificidad de la β -agarasa I, la única posibilidad de localización que pudiese haber; es la de la unidad neoagarobiosa localizada cerca del punto de enlace.



Esquema 3 : Estructura propuesta para el dodecasacárido estudiado.

G = galactosa, G' = 6-O-MeGal, A = 3,6-anhidro-galactosa
 A^t = 3,6-AG en posición terminal no reductora α, β = en posición reductora,
 B = 4-O-MeGal, de 1 a 6 = unidades de neoagarobiosa

Podemos establecer como conclusión, que la sustitución con el 4-O-metilgalactosa, interviene en el C-6 de la Unidad D-galactosa. Nuestra hipótesis de trabajo respecto a la importancia eventual de este residuo, en el metabolismo del agar; se ve reforzada aun más, por el hecho que el C-6 es de la misma forma, el sitio de las O-metilaciones. Será pues interesante, seguir la evolución de estos 2 tipos de sustituyentes, para estudiar la posibilidad de una existencia de la relación entre estos 2 fenómenos.

CAPITULO III: ESTUDIO FISIOLÓGICO DE LA HETEROGENEIDAD MOLECULAR DEL AGAR

I. Introducción

Es bien sabido, que la productividad y el crecimiento de las poblaciones de algas, esta regulada por diversos parámetros. La intensidad y calidad de la luz, la temperatura del agua, la concentración en nutrientes, el fotoperíodo, etc.

Igualmente se reconoce que las algas marinas han desarrollado algunas estrategias para contrarrestar las diferencias en cuanto a la concentración de los nutrientes en el medio exterior. Podemos notar al menos 3 respuestas generales debido a las carencias nutricionales, las cuales se manifiestan por una disminución en el contenido de pigmentos fotosintéticos (DeBOER y RYTHER, 1977), una acumulación de compuestos de carbono de reserva (NEISH y colbs., 1971) y, una disminución en la concentración de proteínas y en ácidos nucleicos (NASR y colbs., 1968).

Los cultivos de algas en condiciones de laboratorio, ha mostrado por ejemplo; que la producción con fases alternadas, puede llegar a ser controlada igualmente por los parámetros ya descritos. Sin embargo, (NORTON y Colbs., 1982) hay estudios que demuestran que en condiciones artificiales de cultivo las fases de reproducción alternadas en los vegetales; son bastante diferentes a las observadas en la naturaleza.

Los trabajos efectuados sobre el efecto de la cantidad y calidad de la luz en el crecimiento y la productividad de los talos de *Gracilaria verrucosa*, demuestran la existencia de respuestas fototrópicas de los talos con respecto al ángulo de incidencia de la luz (JONES, 1959; SANTELICES, 1984). Otros trabajos, hacen énfasis en que el punto de compensación fotosintético, en talos de *Gracilaria verrucosa*; es del alrededor de $10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (BIRD, 1981a).

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio (STADLER, 1984 y CHRISTIAEN, 1987) muestran que luego que las condiciones son favorables al crecimiento, aumentan tanto el peso seco como el peso fresco del material. Los

polisacáridos producidos bajo esas condiciones son menos ricos en 3,6 anhidro-galactosa. En condiciones de ausencia de proliferación, el peso fresco disminuye pero la síntesis de agar se intensifica y la concentración en 3,6-anhidro-galactosa, aumenta.

Los resultados de los análisis químicos efectuados en el agar extraído de talos en condiciones de crecimiento y de ausencia de proliferación igualmente, sugieren una evolución química de los polímeros de la matriz parietal. La expresión de los resultados en términos del cociente galactosa/ 3,6-anhidro-galactosa no considera mas que a los residuos L-galactosa que pueden encontrarse ya sea como 3,6-anhidro-galactosa o bien como L-galactosa-6-sulfato.

En nuestro protocolo, hemos favorecido el estudio de la composición del residuo D-galactosa y nos hemos propuesto a analizar los galactanos extraídos a partir de *Gracilaria verrucosa*, cultivada bajo condiciones controladas, con el fin de comparar su composición con la de los polímeros extraídos de talos en su estado inicial (talos testigos).

II. Material y métodos

A) Definición de las condiciones de cultivo

1) Preparación de las muestras

La macroalga rodofita *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss fue colectada en el Cabo Nariz Gris (Noreste de Francia). El material vegetal se dividió en 3 partes: a) material nativo en su estado inicial, b) Muestra II y c) Muestra III, las cuales fueron sometidas a 2 diferentes condiciones de cultivo.

1. Condiciones promotoras de crecimiento (CPC):

Segmentos de Ejes primarios centrales (EP) y de ramificaciones laterales (RL) de 5 cm de longitud obtenidas a partir de la muestra II, fueron aclimatados a intensidades luminosas semejantes a las imperantes en el verano. La irradiación se fijó en $62 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (lámparas incandescentes Gros-luxe y fluorescentes Cool-white). El fotoperíodo fue programado en un ciclo 16:8 h (luz: oscuridad). La temperatura se mantuvo en $24 \pm 2^\circ\text{C}$. El aire fue suministrado al acuario. El medio consistió en agua de mar natural (3 l), enriquecida con medio Provasoli y era cambiada cada semana. La concentración final del NaNO_3 fue de 8 mM. Las tazas

de crecimiento se determinaron mediante la medición del peso fresco (PF). El peso seco (PS) se estableció posterior a una liofilización del material. El cultivo se llevo a cabo durante un periodo de 2 meses.

2. Condiciones no promotoras del crecimiento (CNPC):

Tanto (EC) como (RL) de 5 cm de longitud, fueron sometidos a intensidades luminosas de irradiación propias a las condiciones naturales del invierno ($17 \text{ mE} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). El Fotoperíodo se estableció en ciclos de 8:16 h (luz: oscuridad). La temperatura era de $5 \text{ }^\circ\text{C}$. El medio consistió en 3 l de agua de mar natural que era cambiada cada 1 vez por semana durante un periodo de 2 meses. El crecimiento se estableció como ya se describió anteriormente.

3. Cultivos alternados (CA)

Al final del ciclo de cultivo (2 meses) las condiciones han sido invertidos; Tanto las ramificaciones laterales (RL) como los Ejes primarios centrales (EP), que estaban bajo condiciones no promotoras del crecimiento; fueron sometidos a condiciones promotoras.

B) Procedimiento de extracción:

La comparación previa de extracciones en agua (CHRISTIAEN y colbs. 1987) y en mezclas de etanol/ agua (LAHAYE y colbs, 1986.), Nos permitieron desarrollar un nuevo procedimiento (ONDARZA y colbs.,1987).

De manera a simplificar la demostración de la heterogeneidad del agar, se menciona únicamente la ruta de extracciones con agua (**Figura 10**).

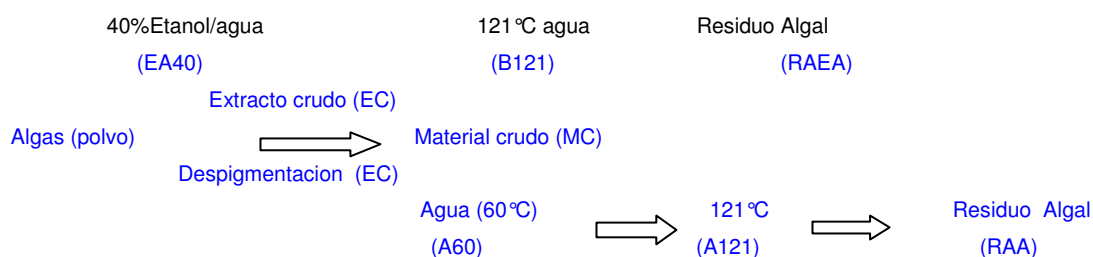


Figura 10: Procedimiento de extracción (simplificado).

En concreto, se pulverizaron los segmentos vegetales ya mencionados hasta tomar 5 g de cada uno y ser sometidos a doble destilación en agua destilada (1 l, 12 h) a 22°C. Se recuperó el extracto crudo (EC) mediante filtración en membranas de nitrocelulosa (8, 3 y 45 mm; Sartorius) y liofilización. El material crudo (MC) previamente tratado con acetona y etanol, fue sometido a extracción con agua destilada (300 ml) a 60 °C durante 1 hora (A60), seguido de autoclave (121 °C, 1 atm) en 300 ml de agua destilada por 3 y 1 h respectivamente (A121). El residuo algal acuoso (RAA) también fue liofilizado.

C) Caracterización de carbohidratos constituyentes y sus cantidades relativas:

El fraccionamiento del material crudo (MC) ha sido realizado por cromatografía de intercambio iónico en batch. Una solución de agar (20 ml ; 1 g/ l) fueron mezclados a un gel DEAE-Sephadex A50, equilibrado en agua y manteniendo la temperatura a 60 °C. Los polisacáridos neutros son eluidos con agua destilada (150 ml), mientras que los polisacáridos ácidos se eluyeron con 150 ml de una solución de NaCl 3M. Las fracciones fueron dializadas, concentradas, congeladas y posteriormente liofilizadas (Ver **Tabla 9**).

Los carbohidratos totales fueron determinados por el método del orcinol-ácido sulfúrico empleando a la galactosa como estándar. El contenido de 3,6-AG se estableció por el método del resorcinol usando la fructosa como estándar. El contenido en sulfato se determinó mediante HPLC (cromatografía líquida) empleando una columna Rosil AN (Altech) y un monitor de conductividad (Milton Roy), de acuerdo a la metodología descrita por Karamanos y colaboradores (KARAMANOS y cols, 1988).

Su identificación se basó en los tiempos de retención (relativos a carbohidratos conocidos) y a sus espectros de masa. El 6-O-Me-Gal fue aislado a partir de *Porphyra umbilicalis* mientras que el 4-O-Me-Gal fue proporcionado gentilmente por el Dr. J.S. Craigie (q.e.p.d). Los cálculos sobre la composición molar se establecieron de acuerdo al siguiente criterio:

- el L-Gal total se definió como el L-Gal-6-sulfato más el contenido en 3,6-AG

- el D-Gal total se obtiene de la suma de concentraciones molares tanto del D-Gal como del 6-O-Me-Gal
- Hipótesis de trabajo: la cantidad de sulfato estimada por HPLC representa el contenido total en L-Gal-6-sulfato.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

Las condiciones promotoras de crecimiento (CPC) favorecen la producción de biomasa (incremento de 8 a 12% por semana) para ambos segmentos vegetales ramificaciones laterales (RL) y ejes primarios centrales (EP) (**TABLA 7**).

TABLA 7 : Evolución de la biomasa (MF), de la materia seca (MS), contenidos en agua y en polisacáridos a lo largo del ciclo de cultivo.

	Ejes primarios (EP)	Ramificaciones laterales (RL)
Talos testigos (MF/ MS)	100/ 14	100/ 7
Condiciones favorables	190/ 43	168/ 34
del crecimiento (MF/ MS)		
Contenido en agua (g)	+ 61 ^a	+ 41
Contenido en Polisacáridos	17 ^b	20
(%MS)		
Condiciones de no proliferacion	100/ 18.5	105/ 16
(MF/ MS)		
Contenido en agua (g)	- 4.5	- 4
Contenido en Polisacáridos	20	29
(%MS)		

a : diferencia del valor inicial de los testigos **b** : total A60 + A121 +EA40 + B121

Los polisacáridos solubles en agua a temperaturas calientes representaron un 17 y 20% de la materia seca en ambos casos. Bajo condiciones no promotoras la biomasa permaneció estable y en donde el rendimiento en polisacáridos solubles fue de 20 y 25% de la materia seca respectivamente para los segmentos. Con las plantas nativas se obtuvieron rendimientos de 20 y 30% respectivamente.

Las graficas siguientes permiten visualizar de mejor manera:

- 1) el patrón de sustitución (6-O-Me-Gal y 4-O-Me-Gal)
- 2) el cociente (α) (6-O-Me-Gal/ 4-O-Me-Gal) y,
- 3) el grado total de sustitución (δ) para C-6 de la unidad D-Gal.

En la **Figura 11**, se ilustra la “Grafica de calidad” de este material crudo (MC) obtenido durante diferentes condiciones de cultivo. Fácilmente se observa que los polímeros altamente sustituidos son obtenidos bajo condiciones promotoras del crecimiento ($\delta > 0.4$) y que la buena calidad se obtiene con condiciones no promotoras, particularmente en el caso de las ramificaciones laterales (RL) ($\delta = 0.1$).

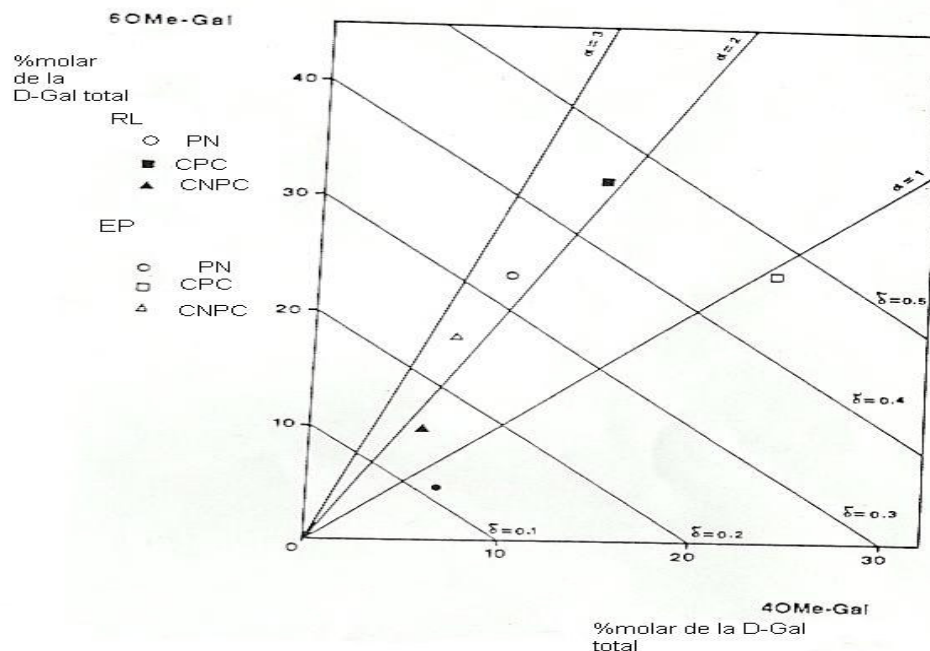


Figura 11: Grafica de calidad del material Crudo obtenido bajo las diferentes condiciones de cultivo.

PN: Plantas Nativas RL: Ramificaciones laterales EP: Ejes Primarios
CPC: Condiciones promotoras del crecimiento CNPC: Condiciones no promotoras del crecimiento
 \mathcal{J} = Grado total de sustitución de la Unidad D-Galactosa
 α = cociente 6-O-Me-Gal/ 4-O-Me-Gal

Comparado con las plantas nativas, la extracción de polisacáridos solubles a temperaturas calientes, mostró patrones de sustitución similares a los obtenidos bajo condiciones no promotoras de cultivo, con ligero incremento en el contenido del 6-O-Me-Gal en las ramificaciones laterales. Esto no es para sorprenderse dado que las plantas nativas se colectaron en condiciones de invierno, bajo condiciones climáticas parecidas a las establecidas para las condiciones no promotoras del crecimiento (CNPC).

En la **Tabla 8**, se reportan los contenidos en 6-O-MeGal y en 4-O-MeGal, expresados en porcentajes molares con respecto a la Unidad D-galactosa total (D-Gal + 6-O-MeGal). De tal manera que el 6, representa el porcentaje del 6-O-MeGal presente en las Unidades D-galactosa y, 4 representa el porcentaje de las unidades de D-galactosa que presentan la cadena lateral del 4-O-MeGal. El grado de sustitución total ($GS = \mathcal{J}$) es definido como el cociente (α) representado por la concentración del 6-O-MeGal + 4-O-MeGal / D-galactosa total. Los valores de las 2 condiciones de cultivo (favorables y no favorables) fueron comparados con a los de los talos testigos.

Tabla 8: Composición química de los diferentes extractos obtenidos por el procedimiento simplificado de las extracciones fraccionadas.

		CONDICIONES DE CULTIVO								
		Talos Testigos (TT)			CPC (C+)			CNPC (C-)		
		6	4	GS	6	4	GS	6	4	GS
EP	A60	29.0	5.1	0.34	29.0	16.2	0.45	29.5	6.5	0.36
	A121	20.7	7.0	0.28	23.8	30.4	0.54	22.6	7.3	0.30
	RAA	22.3	13.9	0.36	15.8	19.1	0.35	8.6	7.4	0.16
	EA	40.5	7.9	0.48	26.1	26.4	0.52	39.8	6.7	0.46
	B121	16.2	5.1	0.21	23.5	28.5	0.52	16.0	6.5	0.23
	REA	10.5	3.6	0.14	17.7	20.0	0.38	8.9	9.2	0.18
RL	A60	4.2	5.4	0.10	41.9	14.3	0.56	14.0	3.8	0.18
	A121	7.2	9.5	0.17	31.2	13.2	0.44	10.7	6.9	0.18
	RAA	3.2	5.3	0.09	29.7	15.4	0.45	5.4	5.3	0.11
	EA	6.5	6.2	0.13	55.3	22.6	0.78	18.6	6.7	0.25
	B121	6.1	6.5	0.13	25.6	11.0	0.37	16.7	10.7	0.27
	REA	3.9	5.3	0.09	22.5	13.1	0.36	5.6	5.5	0.11

6 = cociente 6-O-MeGal / D-galactosa total 4 = 4-O-MeGal / D-Gal total

GS = \sum = Grado de sustitución total

EP = Ejes Primarios centrales

RL = Ramificaciones laterales

TT = Talos testigos (condiciones iniciales)

Los verdaderos cambios ocurrieron durante condiciones promotoras del crecimiento (CPC) con incrementos en las concentraciones molares en residuos 4-O-Me-Gal (principalmente en ejes primarios centrales). Un mismo patrón de sustitución fue finalmente obtenido para ambos segmentos vegetales ($r = 0.47$).

Dichos resultados sugieren que un intercambio continuo puede existir entre las diferentes formas de la unidad D-Galactosa, durante el crecimiento del alga.

El residuo algal (RAA) presenta mayor contenido en residuos 4-O-Me-Gal. Este carbohidrato parece pertenecer al tipo de polisacáridos neutros adheridos firmemente a la pared celular y presentando por lo tanto una baja extractibilidad (resultados confirmados por cromatografía de intercambio iónico en columna DEAE-Sephadex, en donde se obtienen mayoritariamente fracciones enriquecidas con residuos 4-O-Me-Gal).

Los cambios en la composición del agar documentados aquí, pueden ser interpretados como el resultado de actividades metabólicas de las células. Queda por establecerse, si este intercambio continuo es un efecto del anabolismo o es el resultado de una degradación, seguida por una síntesis de novo de polímeros substituidos en mayor o menor grado. El aislamiento de las enzimas que intervienen en este fenómeno, dará una respuesta a nuestra hipótesis (KARAMANOS y cols, 1989).

Los residuos algales se caracterizaron por una concentración en 4-O-MeGal mas elevada que en otras fracciones, en comparación al 6-O-MeGal. La relación del cociente α (6-O-MeGal/ 4-O-MeGal), disminuye a lo largo de las etapas de extracción. Paralelamente, la concentración en sulfato disminuye, lo cual indica que el 4-O-MeGal se encuentra fuertemente asociado a los polímeros neutros principalmente; íntimamente adheridos a la pared celular y por ende, siendo mas difíciles a ser extraídos. Finalmente, de manera a apoyar nuestra hipótesis, hemos decidido fraccionar, mediante cromatografía de intercambio iónico; el material bruto preparado a partir de Ejes primarios centrales cultivados bajo condiciones promotoras del crecimiento (CPC).. Dicho extracto era el más enriquecido en 4-O-MeGal. La composición de las unidades D- y L-galactosa es

presentada en la **Tabla 9**. Se comprueba efectivamente, una tendencia antes señalada: la concentración en 4-O-MeGal es mayor en la fracción neutra.

TABLA 9: Composición química de las fracciones obtenidas por Cromatografía de intercambio iónico del material bruto proveniente de Ejes Primarios centrales (EP) en condiciones promotoras del crecimiento (CPC)*.

	Fracción eluída con agua	Fracción eluída con NaCl (3M)
Unidades D-Galactosa		
Galactosa (Gal)	58	63
4-O-MeGal	19	19
6-O-MeGal	23	18
Unidades L-Galactosa		
Galactosa-6-sulfato	9	31
3,6-anhidro-galactosa	91	69

* Resultados expresados en % molar de las Unidades D- y L-Galactosa

CONCLUSIONES GENERALES

El Agar es un galactano gelificante extraído de la pared de ciertas algas rojas, estando conformado por unidades de repetición alternadas: El 3,6-anhidro- α -L-galactopiranososa y el β -D-galactopiranososa. La calidad industrial de los geles que se forman, depende de la proporción relativa en azarosa, siendo esta la forma ideal de esta familia de moléculas. Existe un cierto número de sustituciones que logran modificar la cadena principal: Grupos éter-metilos, hemi-éster-sulfato, piruvato.

Trabajos preliminares en nuestro laboratorio, han mostrado que la calidad del agar extraído de *Gracilaria verrucosa*, varia no solamente en función de las condiciones fisiológicas, sino igualmente en función de la edad y en la naturaleza de los tejidos. Se ha confirmado y correlacionado una heterogeneidad química con la calidad del ficocoloide.

El Primer objetivo de este estudio, consistió en la búsqueda de las condiciones de extracción más favorable confirmando la heterogeneidad química de los galactanos. Una nueva estrategia extractiva fue desarrollada a partir de técnicas de extracción fraccionada con agua y con etanol/ agua.

El conjunto de diferentes técnicas analíticas utilizadas, nos ha permitido evaluar los contenidos centesimales de los monosacáridos que forman parte de los polímeros extraídos. Hemos podido comprobar la presencia del 6-O-Metil-galactosa y el describir por vez primera, la presencia del 4-O-Metil-galactosa.

Investigadores trabajando con otras especies de *Gracilaria*, señalaban la presencia del 6-O-metil-D-galactosa y del 4-O-metil-L-galactosa; en donde la concentración de este ultimo, se encontraba fuertemente enriquecida en las fracciones polisacáridicas obtenidas a partir de segmentos de ejes primarios centrales del alga.

Debido a la importancia previsible que este monosacárido pudiese tener en el metabolismo del agar; decidimos determinar su punto de unión en la cadena polimérica.

La utilización de la β -agarasa I, a partir de *Pseudomonas atlantica*, nos ha permitido aislar oligosacáridos enriquecidos en 4-O-MeGal, el cual mediante técnicas de permetilación, espectrometría de masas acoplada a la cromatografía de gases y a la Resonancia Magnética Nuclear del C^{13} y del protón H^1 ; resulta encontrarse unido al C-6 de la Unidad D-galactosa. Nuestra hipótesis sobre la importancia de este residuo en el metabolismo, se vio reforzada aun más, debido al hecho de que el C-6 es igualmente el sitio de las O-metilaciones.

Tomando en cuenta estos hechos novedosos, definimos una estrategia de cultivos controlados, que permitieran seguir la evolución de diversos marcadores biológicos (grados de sustitución de la cadena principal) en polímeros del agar; en función de diferentes parámetros de cultivo y de la edad de los tejidos.

Para ello, se estudiaron las variaciones en el patrón de sustitución de las unidades de la β -D-galactosa; en tanto ejes primarios centrales y en ramificaciones laterales, sometidos por separado a cultivos controlados, bajo condiciones promotoras (CPC) y también, no promotoras del crecimiento (CNPC). Se compararon los resultados con los obtenidos con los talos testigo.

La introducción de 2 nuevas representaciones de los resultados: el cociente (α) (6-O-MeGal/ 4-O-MeGal.), así como una gráfica de la calidad; Han simplificado las interpretaciones.

Un alto grado de sustitución ($\beta = GS$) en el 4-O-metil-L-Galactosa ha sido confirmado en los polímeros obtenidos a partir de los ejes primarios centrales (EP) cultivados bajo condiciones promotoras del crecimiento y asimismo, un importante grado de sustitución por el 6-O-MeGal en las fracciones obtenidas de las ramificaciones laterales (RL) cultivadas tanto en CPC como en CNPC.

El conjunto de resultados sugiere que un intercambio continuo parece llevarse a cabo entre las diferentes formas de la unidad D-galactosa, durante el crecimiento de las algas.

Los resultados obtenidos por fraccionamiento de los polímeros extraídos de ejes primarios al final del cultivo (2 meses), sobre una columna de intercambio de iones; han mostrado la presencia de fracciones eluidas con agua destilada, enriquecidas en el 4-O-metil-galactosa con relación al 6-O-Metil-galactosa.

Igualmente, hemos confirmado que las fracciones obtenidas con extracciones a altas temperaturas así como los residuos de extracción; presentaban una alta concentración en sustituyentes como el 4-O-MeGal, el cual como lo demostramos; se presenta como cadena lateral en los polisacáridos. Esto indica pues, que el 4-O-MeGal pudiera estar asociado a polímeros de naturaleza más neutra, íntimamente adheridos a la pared celular y siendo mas difíciles de extraer.

Finalmente, mediante los cultivos alternos, hemos constatado que el fenómeno de la modificación en la composición química de los polímeros (expresada en términos del grado de sustitución de la unidad.-galactosa), es un proceso que se realiza de manera muy rápida. En efecto, las variaciones de la composición que encontramos en las ultimas 3 semanas de cultivo; son pobres y, comparativamente a los valores encontrados en las condiciones iniciales, sugieren representar un patrón de uniformidad.

Al parecer, una modificación en la estructura de los galactanos, como por ejemplo en los ejes primarios centrales; interviene mucho antes de la aparición de las neoformaciones. Es este aspecto el que a nuestro juicio resulta determinante, para continuar el estudio de una producción de azarosa en bioreactor. Mediante el establecimiento de condiciones de un cultivo controlado de las condiciones, deberemos a priori, ser capaces de producir tanto una cantidad como la calidad deseada de galactanos. Si el cultivo de talos enteros o bien de segmentos de talos lo permiten; las condiciones rigurosas de un bioreactor lo harán.

LITERATURA CITADA

- ALLSOBROOK, A.J.R., NUNN, J.R. and H. PAROLIS, 1969.- Some Grateloupiaceae polysaccharides.
In: Margalef, R (Ed). Proc. 6th. Int. Seaweed Symp. Direccion General de Pesca Maritima, Madrid, 417-420.
- ALLSOBROOK, A.J.R., NUNN, J.R. and H. PAROLIS, 1974.- The linkage of 4-O-methyl-L-galactose in the sulphated polysaccharide of *Aeodes ulvoidea* Carbohydr. Res., 36 : 139-145.
- ARAKI, C., 1937.- Acetylation of agar-like substance of *Gelidium amansii* J. Chem. Soc. Jpn., 58 : 1338-1350.
- ARAKI, C., 1944.- Chemical studies on agar-agar. XIV. Investigation of component sugars of agar-agar by methanolysis. (1). Separation of 3,6-anhydro-L-galactose dimethylacetal. J. Chem. Soc. Jpn., 65 : 725-730.
- ARAKI, C., 1956.- Structure of the agarose constituent of agar-agar. J. Chem. Soc. Jpn., 29 : 543-544.
- ARAKI, C., 1966.- Some recent studies on polysaccharides of agarophytes. Proc. Int. Seaweed Symp., 5 : 3-19.
- ARAKI, C., ARAI, K. and S. HIRASE, 1967.- Studies on the chemical Constitution of agar-agar. XXIII. Isolation of D-xylose, 6-O-methyl-D-galactose, 4-O-methyl-L-galactose and O-methyl-pentose. Bull. Chem. Soc. Jpn., 40 : 959-962.
- ASARE, S.O., 1979.- Nitrogen relations in selected macroalgae from Camp Varnum and Ninigret Pond in Rhode Island.
Ph.D. Thesis. University of Rhode Island. 175 pp.

- ASARE, S.O., 1980.- Seasonal changes in sulphate and 3,6-anhydro-galactose content of phycocolloids from two Red Algae.
Bot. Mar., 23 (9) :595-598.
- BARRY, V.C., DILLON, T., HAWKINS, B. and P. O'COLLA, 1950.- The xylan of *Rhodymenia palmata*.
Nature, London, 166 : 788.
- BIRD, K.T., HANISAK, M.D. and J. RYTHER, 1981.- Chemical quality and production of agars extracted from *Gracilaria tikvahiae* grown in different nitrogen enrichment conditions.
Bot. Mar., XXIV : 441-444.
- BIRD, K.T. and J. McLACHLAN, 1982.- Some underutilized taxonomic criteria in *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales).
Bot. Mar., 25 : 595-598.
- BIRD, K.T., VAN DER MEER, J.P. and J. McLACHLAN, 1982a.- A comment on *Gracilaria verrucosa* (Huds) Papenf.
J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 62 : 453-459.
- BIRD, K.T., 1984.- Seasonal variations in protein : CHO ratios in a subtropical estuarine alga *G. verrucosa* and the determination of nitrogen limitation status using these ratios.
Bot. Mar., 24 : 111-115.
- BJORND AHL, H., ERIKSSON, K.E., LINDBERG, B. and B. SWAN, 1965.- Studies on the xylan from the red seaweed *Rhodymenia palmata*.
Acta Chem. Scand., 19 : 2309-2315.
- BOCK, K., LUNDT, J. and C. L. PEDERSEN, 1983.- 2-bromo-2-deoxy sugars as starting materials for the synthesis of - or B- glycosides of 2-deoxysugars.
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 41: 27-65.

..

- BOWKER, D.M. and J.R. TURVEY, 1968a.- Water-soluble polysaccharides of the red algae *Laurencia pinnatifida*. I. Constituent units.
J. Chem.Soc., C: 983-988.
- BOWKER, D.M. and J.R. TURVEY, 1968b.- Water-soluble polysaccharides of the red algae *Laurencia pinnatifida*. I. Methylation analysis of the galactan sulphate.
J. Chem.Soc., C: 989-992.
- CEREZO, A.S., LEZEROVICH, A., LABRIOLA, R. and D.A. REES, 1971.- A xylan from the red seaweed *Chaetangium fastigiatum*.
Carbohydr. Res., 19: 289-296.
- CEREZO, A.S., 1972.- The fine structure of *Chaetangium fastigiatum* xylan: studies of the sequence and configuration of the 1-3 linkages.
Carbohydr. Res., 22: 209-211.
- CHIZOV, O.S., ZOLOTAREV, B.M., USOV, A.I., RECHTER, M.A. and N.K. KOCHETKOV, 1971.- Mass spectrometric characterization of 3,6-anhydrogalactose derivatives.
Carbohydr. Res., 16: 29-38.
- CHRISTIAEN, D., 1981.- Etude biochimique de l'agar-agar de *Gracilaria verrucosa* (Gracilariacées : Gigartinales). Facteurs biologiques et physicochimiques influençant sa qualité et sa production industrielle.
Thèse 3ème cycle USTL., 103 pp.
- CHRISTIAEN, D., 1986.- Structures et fonctions des polyosides matricielles de la paroi de *Gracilaria verrucosa*.
Thèse de Docteur es Sciences Naturelles. USTL-LILLE I. N°: 673. 173 pp.
- CHRISTIAEN, D., STADLER, T., ONDARZA, M. and M.C. VERDUS, 1987.- Structures and functions of the polysaccharide from the cell wall of *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyceae, Gigartinales).
Hydrobiologia. 151/152: 139-146.

- CRAIGIE, J.S. and Z.C. WEN, 1984.- Effects of temperature and tissue age on gel strength and composition of agar from *Gracilaria tikvahiae* (RHODOPHYCEAE).
Can. J. Bot., 62:1665-1670.
- CRAIGIE, J.S., WEN, Z.C. and J.P. VAN DER MEER, 1984.- Interspecific, Intraspecific and Nutritionally-Determined Variations in the Composition of Agars from *Gracilaria verrucosa*.
Bot. Mar., 27: 55-61.
- CRONSHAW, J. and R.D. PRESTON, 1958.- A reexamination of the fine structure of the walls of vesicles of the green alga *Valonia*.
Proc. Roy. Soc., B., 148: 137-148.
- DEBOER, J.A. and J.H. RYTHER, 1977.- Potential yields from a waste recycling algal mariculture system.
The marine Plant ... A potential Ec. Resource : 1-24.
- DELOACH, W.S., WILTON, O.C., McCASKILL, J., HUMM, H.J. and F.A. WOLF, 1946.- *Gracilaria confervoides* as a source of agar.
Duke. Mar. Lab. Bull., 3 : 25-30.
- DIEP MINH TAM and P. EDWARDS, 1982.- Seaweeds of economic importance in thailand. Part 2: Analysis of agar from *Gracilaria sp.*
Bot. Mar., 25 : 459-465.
- DODDRELL, D.M., PEGG, D.T. and M.R. BENDALL, 1982.- Distortionless enhancement of NMR by the polarization transfert.
J. Magn. Resonance., 48 : 109-131.
- DUCKWORTH, M. and W. YAPHE, 1971a.- Preparation of agarose by fractionation from the spectrum of polysaccharides in agar.
Anal. Biochem., 44 : 636-641.

- DUCKWORTH, M. and W. YAPHE, 1971b.- The structure of agar. Part 1. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. Carbohydr. Res., 16: 189-197.
- DUCKWORTH, M., HONG, K.C. and W. YAPHE, 1971.- The agar polysaccharides of *Gracilaria* sp. Carbohydr. Res., 18: 1-9.
- FARRANT, A.J., NUNN, J.R. and H. PAROLIS, 1971.- Sulphated polysaccharides of the Grateloupiaceae family. part VI: A polysaccharide from *Pachymenia carnosa*. Carbohydr. Res., 19: 161-168.
- FELDMANN, J., 1977.- Liste des Rhodophycées des côtes de la France de la péninsule ibérique et de la Méditerranée occidentale. 20 pp.
- FISHER, I.S. and E. PERCIVAL, 1957.- The water-soluble polysaccharides of *Cladophora rupestris*. J. Chem. Soc., 2666-2675.
- FOURNET, B., STRECKER, G., LEROY, Y. and J. MONTREUIL, 1981.- Gas-liquid chromatography and mass spectrometry of methylated and acetylated methyl glycosides. Application to the structure and analysis of glycoprotein glycans. Anal. Biochem. 116: 489-502.
- FREI, E. and R.D. PRESTON, 1961.- Variations in the structural polysaccharides of algal cell walls. Nature (London), 196: 130-134.
- FREI, E. and R.D. PRESTON, 1964a.- Non cellulosic structural polysaccharides in algal cell-walls. I. Xylan in siphonous green algae. Proc. Roy. Soc., ser.B, 160: 293-313.

- FREI, E. and R.D. PRESTON, 1964b.- Non cellulosic structural polysaccharides in algal cell-walls. II. Association of xylan and mannan in *Porphyra umbilicalis*.
Proc. Roy. Soc. Lond., ser. B, 160 : 314-327.
- GREENWOOD, C.T and J. THOMPSON, 1961.- Some physical properties of floridean starch and the characterization of structure-type of branched α -1,4- glucans.
J. Chem. Soc., 1534-1537.
- GUISELEY, K.B., 1970.- The relationship between methoxyl content and gelling temperatures of agarose.
Carbohydr. Res., 13 : 247-250.
- HANIC, L.A. and J.S. CRAIGIE, 1969.- Studies on the algal cuticle.
J. Phycol., 5: 89-102.
- HELLEUR, R.J., HAYES, E.R., JAMIESON, W.D. AND J.S. CRAIGIE, 1985a.- Analysis of polysaccharide pyrolysate of red algae by capillary gas chromatography- mass spectrometry.
J. Anal. Appl. Pyrol., 8: 333-347.
- HELLEUR, R.J., HAYES, E.R., CRAIGIE, J.S. and J.L. McLACHLAN, 1985b.- Characterization of polysaccharides of red algae by pyrolysis- capillary gas chromatography.
J. Anal. Appl. Pyrol., 8: 349-357.
- HIRASE, S., 1957.- Chemical constitution of agar-agar. XIX.
Bull. Chem. Soc. Jpn., 30: 68-79.
- HONG, K.C., GOLSTEIN, M.E. and W. YAPHE, 1969.- A chemical and enzymic analysis of the polysaccharides from *Gracilaria*.
Proc. 6th Int. Seaweed Symp., Madrid : 473-482.

HOYLE, M.D., 1978a.- Agar studies in two *Gracilaria* species (*G. bursapasteuris* "Gmelin" Silva, and *G. coronipifolia* J. Ag.) from Hawaii. I: Yield and gel strength in the gametophyte and tetrasporophyte generations. Bot. Mar., 21 : 343-347.

HOYLE, M.D., 1978b.- Agar studies in two *Gracilaria* species (*G. bursapasteuris* "Gmelin" Silva, and *G. coronipifolia* J. Ag.) from Hawaii. II: Seasonal aspects. Bot. Mar., 21 : 347-352.

HOYLE, M.D., 1978c.- Reproductive phenology and growth rates in two species of *Gracilaria* from Hawaii. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 35 : 273-283.

HUDSON, G., 1762.-
Flora anglica, London, 470-474.

HUMM, H.J., 1951.- The seaweed resources of North Carolina
Survey of marine fisheries of North Carolina, Ed. TAYLOR : 231-250.

IZUMI, K., 1970.- A new method for fractionation of agar.
Agr. Biol. Chem. Jap., 34:1739-1740.

IZUMI, K., 1972.- Chemical heterogeneity of the agar from *Gracilaria verrucosa*.
J. Biochem. Jap., 72 (1):135-140.

JOHN, D.M. and S.O. ASARE, 1975.- A preliminary study of the variations in yield and properties of phycocolloids from Ghanaian seaweeds.
Mar. Biol. 30: 325-330.

JONES, J.K.N., 1950.- The structures of the mannans present in *Porphyra umbilicalis*.
J. Chem. Soc. : 3292-3295.

JONES, W.E., 1959.- Experiments on some effects of certain environmental factors on *Gracilaria verrucosa*.
J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 38 : 153-167.

JUNFUI, Z., CHANG, C.F., and Y. BANGMEI, 1984.- Some problems in the taxonomy of chinese species of *Gracilaria* (Rhodophyta).
Hydrobiologia, 116/117 : 59-62.

KIM, D.H. and P. HENRIQUES, 1979.- Yields and gel strength of agar from cystocarpic and tetrasporic plants of *Gracilaria verrucosa*(Rhodophyceae)
Proc. IXth Int. Seaweed Symp., 257-262.

KIM, C.S. and H.J. HUMM, 1965.- The red alga *Gracilaria foliifera*, with special reference to the cell wall polysaccharides.
Bull. Mar. Sci. 15: 1036-1050.

KYLIN, H., 1956.- Die Gattungen der Rhodophyceae.
GLUK Gleerups Förlag Lund. 673 pp.

LAHAYE, M., YAPHE, W. and, C. ROCHAS, 1985.- ¹³C NMR spectral analysis of sulfated and desulfated polysaccharides of the agar type.
Carbohydr. Res., 143 : 240-245.

LAHAYE, M., ROCHAS, C. and W. YAPHE , 1986.- A New Procedure for Determining the Heterogeneity of Agar Polymers in the Cell Walls of *Gracilaria* sp (GRACILARIACEAE, RHODOPHYTA).
Can. J. Bot., 64 : 579-585.

MAAS, F.M., HOFFMANN, I., VAN HARMELEN, M.S., and L.S. DE KOK, 1986.- Refractometric determination of sulphate and other anions in plants separated by HPLC.
Plant & Soil, 91 : 129-132.

MACKIE, M. and R.D. PRESTON, 1974.- Cell wall and intercellular region polysaccharides.

In : Algal physiology and biochemistry. STEWARD W.D.P. (Ed.), Blackwell Sc. Publ. Oxford. p. 40-85.

MEEUSE, B.J.D., ANDRIES, M., and J.A. WOOD, 1960.- Floridean starch.

J. Exp. Botany, 11 : 129-140.

MORRICE, L.M., McLEAN, M.W., LONG, W.F. and F.B. WILLIAMSON, 1983.- Porphyrin primary structure. An investigation using B-Agarase I from *Pseudomonas atlantica* and ^{13}C -NMR spectroscopy.

Eur. J. Biochem., 133 :673-684.

NASR, A.H., BEKHEET, I.A., and R.K. IBRAHIM, 1968.- The effects of different nitrogen and carbon sources on amino acid synthesis in *Ulva Dictyota* and *Pterocladia*.

Hydrobiologia, 31 : 7-16.

NEISH, A.C. and P.F. SCHACKLOCK, 1971.- Greenhouse experiments on the propagation of strain T4 of Irish Moss.

Tech. Report Nat. Res. Council. Can., 14 : 1-25.

NORTON, T.A., MATHIESON, A.C. and M. NEUSHUL, 1982.- A review of some aspects of form and function in Seaweeds.

Bot. Mar., 25 : 501-510.

NUNN, J.R. and H. PAROLIS, 1969.- A polysaccharide from *Phyllomenia cornea*
Carbohydr. Res., 9 : 265-276.

NUNN, J.R., PAROLIS, H. and I. RUSSELL, 1971.- Sulphated polysaccharides of the *Solieriaceae* family. I. A polysaccharide from *Anatheca dentata*.

Carbohydr. Res., 20 : 205-215.

O'COLLA, P.S., 1962.- Mucilages.

In: Physiology and Biochemistry of algae. R.A. Lewin (Ed). Academic Press. New York, 337-356.

O'DONNELL, J.J. and E. PERCIVAL, 1959.- Structural investigations on the water soluble polysaccharides of the green seaweed *Acrosiphonia centralis*.
J. Chem. Soc., 2168-2178.

OZA, R.M., 1978.- Studies on Indian *Gracilaria*. IV. Seasonal variation in agar and gel strength of *Gracilaria corticata* J. Ag. occurring on the coast of Veraval.
Bot. Mar., 21 (3): 165-167.

PAINTER, T.J., 1983.- Algal Polysaccharides.
In: The Polysaccharides (G.O. Aspinall, Ed.) Academic Press, New York., Vol.2 : 195-285.

PARKER, B.C., 1964.- The structure and chemical composition of cell walls of three chlorophycean Algae.
Phycologia, 4: 63-74.

PATWARY, M.U. and J.P. VAN DER MEER, 1983.- Growth experiments on morphological mutants of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae).
Can. J. Bot., 61 (6) : 1654-1659.

PAYEN, M., 1859.- Sur la gélose et les nids de Salagane.
C.R. Acad. Sci., 49: 521-530.

PAZ PARENTE, J., CARDON, P., LEROY, Y., MONTREUIL, J., FOURNET, B. and G. RICART, 1985.- A convenient method for methylation of glycoprotein glycans in small amounts by using lithium methylsulfinyl carbanion.
Carbohydr. Res., 141 : 41-47.

PEAT, S., TURVEY, J.R. and D.A. REES, 1961.- Carbohydrates of the red alga, *Porphyra umbilicalis*.
J. Chem. Soc., 1590-1595.

- PENNIMAN, C.A., 1977.- Seasonal chemical and reproductive changes in *Gracilaria foliifera* (Forsk.) Borg from Great Bay, New Hampshire. J. Phycol., 13 (suppl.): 53.
- PENNIMAN, C.A., 1983.- Ecology of *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Gigartinales, Rhodophyta) in the great bay estuary, New Hampshire. Thesis., Biol., Univ. of Maine at Orono, USA. 267 pp.
- PERCIVAL, E.-and R.H. McDOWELL, 1967.- Algal polysaccharides. In: Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides. Academic Press, London 219 pp.
- PROVASOLI, L., 1968.- Media and prospects for cultivation of marine algae. Cultures and collections of algae (Watanabe, A. and A. Hattori, Eds) Jpn. Soc. Plant Physiol. 63-75.
- RAGAN, M.A. and D.S. CHAPMAN, 1978.- A biochemical phylogeny of the protists. In: Physiology of Algae. CHAPMAN D.S. (Ed.) Academic Press, New York.
- REES, D.A. and N.G. RICHARDSON, 1966.- Polysaccharide in germination. Occurrence, fine structure and possible biological role of the pectic araban in white mustard cotyledons. Biochemistry, 5 : 3099-3107.
- REES, D.A., 1969.- Conformational analysis of polysaccharides. II: Alternating copolymers of the agar-carrageenan chondroitin type by model building in the computer with calculation of the helical parameters. J. Chem. Soc., B: 217-226.
- REES, D.A. and E. CONWAY, 1962.- The structure and the biosynthesis of porphyran : a comparison of some samples. Biochem. J., 84: 347-352.

RIMINGTON, C., 1931.- The carbohydrate complex of the serum proteins. II. Improved method for isolation and redetermination of structure. Isolation of glucosaminodimannose from protein of ox-blood.
Biochem. J., 25 : 1062-1071.

ROSS, A.G., 1953.- Some typical analysis of red seaweeds.
J. Sci. Food Agric., 4: 333-335.

SANTELICES,-B. and W.E. FONCK, 1984.- Managing wild crops of *Gracilaria* in central Chile.
Hydrobiologia, 116/117 : 77-89.

SLONEKER, J.H., 1972.- Gas-liquid chromatography of alditol acetates.
Methods. Carbohydr. Chem., 6 : 20-24.

STADLER, T., 1984.- Physiologie de la production d'agar dans les parois de *Gracilaria verrucosa*.
Thèse de 3ème cycle, USTL. Flandres- Artois. LILLE, 102 pp.

TAGAWA, S. and Y. KOJIMA, 1972.- The alkali-treatment of the mucilage of *Gracilaria verrucosa*.
Proc. Int. Seaweed Symp, 7: 447-450.

TERHO, T.T. and K. HARTIALA, 1971.- Method for determination of the sulfate content of glycosaminoglycans.
Anal. Biochem., 41 : 471-476.

THOMPSON, E.W. and R.D. PRESTON, 1968.- Evidence for a structural role of protein in algal cell walls.
J. Exp. Bot., 19 : 690-697.

TILLMANS, J. and K. PHILIPPI, 1929.- The carbohydrate content of the important proteins of foodstuff and a colorimetric procedure for the determination of nitrogen free sugar in protein.
Biochem. J., 215 : 36-60.

TURVEY, J.R. and E.L. WILLIAMS, 1970.- The structures of some xylans from red algae.

Phytochemistry, 9: 2383-2388.

TURVEY, J.R. and E.L. WILLIAMS, 1976.- The agar-type polysaccharide from the red alga *Ceramium rubrum*.

Carbohydr. Res., 49: 419-425.

UMAMAHESWARA RAO, M., 1969.- Agar and algin-yielding seaweeds of India.

Proc. Int. Seaweed Symp., 6: 715-721.

VERDUS, M.C., CHRISTIAEN, D., STADLER, T. and H. MORVAN, 1986.- Etude ultrastructurale et cytochimique de la paroi cellulaire chez *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyceae).

Can. J. Bot., 64: 96-101.

WANG, C.Y. and S.S. YANG, 1980.- Seasonal variation in the quality of *Gracilaria* cultivated in Taiwan.

Proc. Natl. Sci. Council. Rep. China, 4: 78-86.

WHYTE, J.N.C. and J.R. ENGLAR, 1976.- Propagation in tanks and chemical composition of the marine alga *Gracilaria sp.*

Fisheries and Marine Service, Technical Report n° 623: 1-31.

WHYTE, J.N.C. and J.R. ENGLAR, 1979a.- Agar elaborated by *Gracilaria sp* from the coast of British Columbia. Part I. Properties of agars isolated from algae collected at Bamfield Inlet, Wiseman's Bay and Nuttal Bay.

Can. Fish. Mar. Serv. Tech. Rep. No. 860. 16 pp.

WHYTE, J.N.C. and J.R. ENGLAR, 1979b.- Agar elaborated by *Gracilaria sp* from the coast of British Columbia. Part II. Variations in agar quality with season and reproductive condition of the alga from Haines Island.

Can. Fish. Mar. Serv. Tech. Rep. No. 864. 23 pp.

WHYTE, J.N.C. and J.R. ENGLAR, 1980.- Chemical composition and quality of agars in the morphotypes of *Gracilaria* from British Columbia.
Bot. Mar., 23: 277-283.

WHYTE, J.N.C. and J.R. ENGLAR, 1981.- The agar component of the red seaweed *Gelidium purpurascens*.
Phytochem., 20: 237-240.

WHYTE, J.N.C., ENGLAR, J.R., SAUNDERS, R.G. and J.C. LINDSAY, 1981.- Seasonal variations in the biomass, quantity and quality of agar from the reproductive and vegetative stages of *Gracilaria verrucosa* type.
Bot. Mar., 24: 493-501.

YAMANOUCI, S., 1906.- The life history of *Polysiphonia violacea*.
Bot. Gaz., 42: 401-449.

YAPHE, W., 1957.- The use of agarase from *Pseudomonas atlantica* in the identification of agar in marine algae (Rhodophyceae).
Can. J. Microbiol., 3: 987-997.

YAPHE, W., 1960.- Colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose and galactose in marine algal polysaccharides.
Anal. Chem., 32 (10): 1327-1330.

YAPHE, W. and M. DUCKWORTH, 1972.- The relationship between structures and biological properties of Agars.
Proc. 7th Int. Seaweed Symp: 15-22.

YOUNG, K.S., 1974.- An investigation of agar from *Gracilaria* sp.
Can. Fish. Mar. Serv. Tech. Rep. No. 454. 18 pp.

COMUNICACIONES EN CONGRESOS

ONDARZA M, KARAMANOS Y, CHRISTIAEN D AND T. STADLER

“Variations in the composition of agar polysaccharides from *Gracilaria verrucosa*, cultivated under controlled conditions”. Communication Plant Polysaccharides, Structure and Function. Grenoble, France. July 1987.

KARAMANOS Y, ONDARZA M, BELLANGER F. AND D. CHRISTIAEN

“The linkage of 4-O-methyl- α -L-galactose in the agar polymers extracted from the cell wall of *Gracilaria verrucosa*”. Communication IXth International Symposium on Glycoconjugates. Lille, France. July 6-11, 1987.

PUBLICACIONES POSTERIORES

ONDARZA M, KARAMANOS Y, CHRISTIAEN D. AND T. STADLER

“Variations in the composition of agar polysaccharides from *Gracilaria verrucosa*, cultivated under controlled conditions”. Food Hydrocolloids, Vol.1, 5/6, 1987. Pages: 507-509.

KARAMANOS Y, ONDARZA M, STADLER T, MORVAN H. AND D. CHRISTIAEN

“Metabolic implications of 4-O-methyl-L-galactose substitutions on the D-galactose unit in agar polymers”. In: ALGAL BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, EDITORS: STADLER T., MOLLION J., VERDUS M.C., MORVAN H., KARAMANOS Y. AND D. CHRISTIAEN. 1988, 477-487. Chapter 3: Polysaccharides Structure and Function.

KARAMANOS Y, ONDARZA M, BELLANGER F, CHRISTIAEN D. AND S. MOREAU

The linkage of 4-O-methyl-L-galactopyranose in the agar polymers from *Gracilaria verrucosa*. Carbohydr. Res., 1989, 187: 93-101.

ONDARZA, M.

Pyrolysis-Gas chromatography-Mass Spectrometry of agar type polysaccharides from *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss. Rev. Latinoamer. Quím. 1994, 23/4: 126-132.