



Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

PURIFICACIÓN DE UNIDAD PROTEOLÍTICA ALCALINA DE *Mytilus californianus* Y OTRAS ESPECIES DE BAJA CALIFORNIA, ASÍ COMO SU ANÁLISIS PARA SU POSIBLE APLICACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

Fernando Anastacio Leggs López

TUTOR

Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez

Ensenada, Baja California, México a 24 de junio 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA

PURIFICACIÓN DE UNIDAD PROTEOLÍTICA ALCALINA DE *Mytilus californianus* Y OTRAS ESPECIES DE BAJA CALIFORNIA ASÍ COMO SU ANÁLISIS PARA SU POSIBLE APLICACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

TESIS

Que para obtener el grado de Doctorado en Ciencias presenta:

Fernando Anastacio Leggs López

Aprobada por:


Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez
Director de tesis


Dra. Tatiana Nenetzen Olivares Bañuelos
Co Director


Dra. Graciela Guerra Rivas
Miembro del comité


Dr. Priscy Alfredo Luque Morales
Miembro del comité


Dr. Dante Alberto Magdaleno Moncayo
Miembro del comité

Ensenada Baja California, México. Junio 2022

RESUMEN de la tesis de **FERNANDO ANASTACIO LEGGS LÓPEZ** presentada como requisito parcial para la obtención del grado DOCTOR EN CIENCIAS del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California, México, junio del 2022.

PURIFICACIÓN DE UNIDAD PROTEOLÍTICA ALCALINA DE *Mytilus californianus* Y OTRAS ESPECIES DE BAJA CALIFORNIA, ASÍ COMO SU ANÁLISIS PARA SU POSIBLE APLICACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

Resumen: Las enzimas de origen marino son una importante herramienta para la industria médica, agrícola y medioambiental ya que estas poseen propiedades como la hipertermoestabilidad, regiospecificidad, estereoselectividad, tolerancia a las sales y cambios de pH. Un grupo de enzimas que ha despertado mayor interés son las enzimas hidrolíticas dentro de las cuales se encuentran las proteasas. Las proteasas son enzimas que se utilizan en diversos procesos de investigación biológica, alimenticia, salud, entre otras. En estos procesos se encuentra la resuspensión de células de cultivo; digestión de proteínas y posteriores análisis peptídicos; control de la formación de aromas en lácteos; mejora de textura en productos pesqueros (ablandamiento de carne); producción de alimentos hipoalergénicos; entre otros. En este proyecto de trabajo se obtendrán las variables indicadas para obtener una unidad proteolítica funcional de *Mytilus californianus*, las cuales serán utilizadas como catalizadores en biotecnología. Además, se pretende caracterizar mediante la secuencia de codones y aminoácidos, así como por su forma tridimensional, a las unidades que presenten una actividad catalítica más estable tras su purificación. La obtención, purificación y caracterización de proteasas funcionales nos permitirá hacer uso de un recurso marino renovable, el cual podrá ser utilizado en diversas e importantes áreas de la biotecnología ambiental.

Palabras clave: proteasas; mejillón californiano; tratamiento de agua residual; biorremediación; bioindicadores; enzimas alcalinas

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. TRATAMIENTO DE DESCARGAS RESIDUALES	10
1.2. BIOINDICADORES	14
2. ANTECEDENTES	15
2.1. PROTEASAS	15
2.1.1. PROTESAS ALCALINAS	20
2.1.2. PURIFICACIÓN DE PROTEASAS ALCALINAS	22
2.1.3. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LAS PROTEASAS	25
2.2. BIOINDICADORES	29
3. HIPÓTESIS	31
4. OBJETIVOS	31
4.1. OBJETIVOS GENERALES	31
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	31
5. METODOLOGÍA	32
5.1. COLECTA DE MEJILLÓN <i>Mytilus californianus</i>	32
5.1.1. EXTRACTO DE HEPATOPÁNCREAS DE <i>Mytilus californianus</i>	33
5.2. COLECTA DE ANEMONA <i>Anthopleura elegantissima</i>	37

5.2.1.	PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE BENZO(A)PIRENO	37
5.2.2.	FRACCIONES SUBCELULARES DE TEJIDO DE <i>Anthopleura elegantissima</i>	37
5.2.3.	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA NADPH citocromo C reductasa	38
5.2.4.	DETERMINACIÓN DE BENZO(A)PIRENO EN EL AGUA DE MAR EXPERIMENTAL	39
5.3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
7.	CONCLUSIONES	54
8.	BIBLIOGRAFÍA	55

ÍNDICE FIGURAS

- Figura 1. Mecanismo general de acción de las proteasas. Las enzimas dividen las proteínas mediante una reacción de hidrólisis y la posterior adición de una molécula de agua a un enlace peptídico. Tomado de Homaei, Lavajoo, & Sariri, 2016. _____ 16*
- Figura 2. Distribución de los tipos de enzimas que son más utilizadas en la industria. En la gráfica se indica la proporción que representa cada tipo de enzimas del total de enzimas comerciales. La parte sombreada indica el total de proteasas comerciales. Modificado de Rao et al., 1998. _____ 19*
- Figura 3. Aplicaciones de las proteasas alcalinas. En el esquema se muestran diversas aplicaciones que tienen actualmente las proteasas alcalinas. Modificado de M. Sharma et al., 2019. _____ 20*
- Figura 4. Bioprospección de catalizadores marinos. El esquema representa los pasos generales de la bioprospección para enzimas marinas, así como las principales características que tienen éstas. Modificado de Trincone, 2011. _____ 26*
- Figura 5. Proceso enzimático de una Serina proteasa. Proteasa alcalina tripsina (color negro) sobre el carbono amida de una proteína n (Rojo) que presente Arginina (Arg) o Lisina (Lys). 1.- Principales aminoácidos del centro activo de la endoproteasa Tripsina (histidina-57, aspartato-102 y serina-195) los cuales forman enlaces de hidrogeno entre ellos, causando aumento en la nucleofilicidad de la serina. 2.- Tripsina presenta un " hueco de oxianión" generado por átomos de hidrógeno presentes en tripsina (Gly-193 y Ser-195), a través de enlaces de hidrógeno se estabilizan la carga negativa que se acumula en el oxígeno de la amida presente en Arginina (Arg) o Lisina (Lys), después del ataque nucleófilo al carbono de la amida por el oxígeno de la Serina genera que el carbono asuma una geometría tetraédrica realizando el corte de la proteína. 3.- Separación por hidrólisis. Tomado de Elgendy & Abdelrasool, 2016. _____ 28*
- Figura 6. Puerto de La Bocana Santo Tomas, Ensenada Baja California México. En las fotografías se aprecia A: una de las embarcaciones y sus tripulantes, quienes amablemente participaron en la colecta de los mejillones; B: embarcaciones de pescadores que trabajan en el puerto de La Bocana; C: costa rocosa en La Bocana. _____ 32*
- Figura 7. Cromatografía de intercambio iónico en una columna Q-sepharose®. _____ 33*
- Figura 8. Obtención de tejido de mejillón *Mytilus californianus*. A: Tejido fresco de mejillón. B: Disección del tejido y pesaje. C: Homogenización de hepatopáncreas de mejillón. D: Homogenado de hepatopáncreas de mejillón. E: Filtración del homogenado. _____ 40*

Figura 9. Cromatografía de intercambio iónico. A: Equilibrio de la columna. B: Se agregó la muestra del homogenado de mejillón. C: Corrimiento de la muestra por la columna de intercambio iónico. D: Colecta de eluciones obtenidas. E: Regeneración de la fase estacionaria de la columna. _____ 41

Figura 10. Identificación de fracciones eluidas de la cromatografía de intercambio iónico (desviación estándar, $\sigma = 0.05$) _____ 42

Figura 11. Actividad proteolítica de las fracciones aisladas a pH 8 y pH 9 (desviación estándar, $\sigma = 0.05$) _____ 43

Figura 12. Gel de poliacrilamida para determinar la presencia de proteínas totales en el homogenado de hepatopáncreas de mejillón. A1: Escalera de proteínas; A2 y A3: Libre; A4 y A5: Sobrenadante de hepatopáncreas; A6: Elución pH9; A7: Elución pH8; A8: libre; A9: sobrenadante de hepatopáncreas. _ 44

Figura 13. Proceso de ósmosis para las eluciones. El proceso se hizo previo a la electroforesis para las eluciones obtenidas con tris pH 9 de la cromatografía de intercambio iónico realizada con el homogenado de hepatopáncreas de mejillón *Mytilus californianus*. _____ 44

Figura 14. Gel 1 de poliacrilamida a 0.75 mm de grosor. 1: Escalera (S8445 SigmaMarked) para determinar el peso molecular en kDa. 2: Blanco. 3: Muestra eluida 2. Las eluciones fueron obtenidas con tris pH 9 de la cromatografía de intercambio iónico realizada con el homogenado de hepatopáncreas de mejillón *Mytilus californianus*. _____ 45

Figura 15. Gel 2 de poliacrilamida a 0.75 mm de grosor. 1: Escalera (S8445 SigmaMarked) para determinar el peso molecular en kDa. 2: Blanco. 3: Muestra eluida 2. Las eluciones fueron obtenidas con tris pH 9 de la cromatografía de intercambio iónico realizada con el homogenado de hepatopáncreas de mejillón *Mytilus californianus*. _____ 45

Figura 16. Espectros de absorción UV de extractos de agua de mar. Los extractos se obtuvieron tras la extracción de los ejemplares de *Anthopleura elegantissima* de los frascos en el experimento de exposición. El agua de mar de cada recipiente de exposición se trató con diclorometano y se leyó la absorbancia de la fase orgánica. Los organismos se sometieron a exposición B(a)P durante 72 h. Se indican los valores de concentración para cada grupo (10 individuos) expuestos. El espectro B(a)P es un B(a)P de 56 mM en agua de mar a modo de comparación _____ 47

Figura 17. Actividad de NADPH citocromo C reductasa en fracciones subcelulares de tejido columnar de anémona de mar *Anthopleura elegantissima* bajo exposición a benzo(a)pireno durante 72 h. En todos los

casos, el número de organismos por grupo fue de 10. Los valores son el promedio de cinco mediciones. La actividad enzimática se expresa en nanomoles de citocromo C reducido por minuto por miligramo de proteína. B (a) P = Benzo (a) pireno. Disolvente = Acetonitrilo. GC = Grupo de control; GS = grupo de disolventes; G2, G4 y G6 = Grupos expuestos a B(a)P 2 mM, 4 mM y 6 mM respectivamente. N = Fracción nuclear MIT = Fracción mitocondrial.

ÍNDICE TABLAS

Tabla I. Reactivos de la curva estándar para evaluación colorimétrica de proteasas. _____ 35

*Tabla II. Actividad de NADPH citocromo C reductasa (\pm ds) en fracciones subcelulares de tejido columnar de anémona de mar *Anthopleura elegantissima* bajo exposición a benzo (a) pireno durante 72 h. En todos los casos, el número de organismos por grupo fue de 10. Los valores son el promedio de cinco mediciones. Se muestran las sustancias y concentraciones a las que estuvo expuesto cada grupo. La actividad enzimática se expresa en nanomoles de citocromo C reducido por minuto por miligramo de proteína. B (a) P = Benzo (a) pireno. Disolvente = Acetonitrilo. GC = Grupo de control; GS = grupo de disolventes; G2, G4 y G6 = Grupos expuestos a 2, 4 y 6 mM de B(a)P respectivamente. _____ 48*

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente muchas de las principales problemáticas a nivel mundial están relacionadas con el agua. Por una parte, es importante la innovación en las técnicas de tratamiento; sin embargo, también se debe considerar la identificación de los compuestos presentes en las descargas domésticas e industriales ya que esto permitirá el tratamiento eficiente de los efluentes. Hoy en día se estima que alrededor de 60 000 compuestos químicos diferentes se utilizan en diversas actividades antropogénicas por lo que todas pueden introducirse en los cuerpos de agua ya bien sea durante su procesamiento, uso o derrame accidental (Rittman & McCarty, 2020). Algunos de estos compuestos se consideran potencialmente dañinos ya que se ha encontrado que algunos son disruptores endocrinos, carcinogénicos, patógenos para el humano y algunas otras especies (Xagorarakis & Kuo, 2008). Además de estos compuestos químicos, desde el 2008 se identificaron agentes contaminantes emergentes entre los que se encuentran fármacos, microorganismos, toxinas algales y algunos otros compuestos relacionados con la extracción y procesamiento del petróleo. La aparición de estos contaminantes requiere que estos puedan ser identificados, además de que se establezcan los efectos sobre los ecosistemas y por último que se desarrollen técnicas de tratamiento adecuadas para su eliminación. Como parte de este proyecto se abordan dos de estas necesidades, la primera es la bioprospección de enzimas de origen marino que puedan ser utilizadas en el tratamiento de descargas residuales con alta concentración de proteínas, así como parásitos humanos y virus. Por otra parte, se establecerá si uno de los organismos sésiles que abundan en las costas del Pacífico pueden ser utilizadas como bioindicadores de la presencia de benzo(a)pireno, hidrocarburo policíclico aromático, producto de la combustión incompleta de la gasolina y diésel que son utilizados en barcos menores (National Library of Medicine, 2022).

1.1. TRATAMIENTO DE DESCARGAS RESIDUALES

Como parte de esta problemática se encuentra el tratamiento de las descargas residuales, cuyas características son variables y están dadas por la actividad económica del emisor. En México, la regulación de las descargas de aguas residuales a los cuerpos

de aguas nacionales se establece en la NOM-001-SEMARNAT-2021; en esta se determinan los límites permisibles para contaminantes básicos, metales pesados y cianuros. Si bien existe una normativa al respecto muchas veces esta no se cumple propiciado así una degradación de los cuerpos de agua receptores. Naturalmente, uno de los componentes que se pueden encontrar en los cuerpos de agua es la materia orgánica disuelta (MOD), la cual es una mezcla compleja de sustancias húmicas, carbohidratos y aminoácidos (Baker & Spencer, 2004) los cuales provienen de la descomposición del material biológico (animales, plantas y microorganismos) (Spence et al., 2011). Además de la MOD de origen natural, los cuerpos de agua también son contaminados por materia orgánica que proviene de los vertidos urbanos, la actividad ganadera, así como por escurrimientos agrícolas e industriales (Fuentes-Rivas et al., 2015). La MOD proveniente de las actividades antropogénicas consiste en material particulado, coloides y macromoléculas en donde los principales grupos de sustancias son proteínas (40-60%), carbohidratos (25.5%) y aceites y grasas (10%) (Chandrappa & Das, 2014).

Como se mencionó, las descargas producto de las actividades antropogénicas deben de cumplir con niveles máximos establecidos por lo que es necesario que antes de ser vertidos al ambiente estas pasen por procesos de tratamiento. De manera general, los procesos de tratamiento de aguas residuales se clasifican en operaciones físicas, químicas y bioquímicas; el proceso general de purificación del agua consiste en cinco fases continuas que son:

1. Tratamiento primario o pretratamiento (físico y mecánico)
2. Tratamiento primario (fisicoquímico y mecánico)
3. Tratamiento secundario o purificación (químico y biológico)
4. Tratamiento final o terciario (físico y químico)
5. Tratamiento de lodos formados (reciclado o incineración) (Crini & Lichtfouse, 2018)

Cada una de estas fases tiene una finalidad en la cual se remueven ciertos contaminantes, particularmente los contaminantes orgánicos se remueven mediante

métodos biológicos que solo permiten una remoción parcial, lo que no permite mejorar sustancialmente la calidad del agua tratada. Considerando esto, es evidente la necesidad de contar con tratamientos biológicos más efectivos para la remoción total de los residuos orgánicos del agua residual o de cualquier tipo de agua a tratar. Dada la problemática ambiental, una de las herramientas emergentes es la biotecnología ambiental.

La biotecnología ambiental es una rama de la ciencia que utiliza organismos vivos, parte de estos o productos provenientes de ellos, en procesos innovativos con la finalidad de proveer soluciones eficientes y efectivas a los problemas ambientales (Scragg, 2010). En la actualidad, algunos retos de la biotecnología ambiental están enfocados a la biorremediación, la recuperación de aceites utilizando microorganismos, el diseño de sistemas bio-electroquímicos, el tratamiento de residuos industriales, la fitorremediación, la producción de biocombustibles, entre otros (Linchpinseo, 2022).

Entre los métodos tecnológicos más utilizados para la remoción de contaminantes orgánicos presentes en el agua se encuentran métodos físicos que se consideran tratamientos terciarios, como ósmosis inversa, ultrafiltración, y nanofiltración, métodos químicos como los procesos de oxidación avanzada para la remoción de desechos, y métodos biológicos que utilizan una mezcla de microorganismos degradadores de materia orgánica (Crini & Lichtfouse, 2018). Además de estos métodos, algunos como el de reactores biológicos de membranas, combinan en una misma fase métodos físicos y biológicos en donde microorganismos y/o partes de ellos son responsables de la degradación de los compuestos orgánicos presentes en el agua a tratar y, un sistema de membranas se encarga de separar físicamente el agua y los contaminantes (Gijin et al., 2021). Hoy en día, este tipo de reactores se consideran como el mejor tratamiento físico-biológico para aguas residuales, pero su utilización es limitada en las plantas tratadoras de aguas industriales o municipales debido a su elevado costo económico.

Dentro de las alternativas más viables que existen actualmente para la remoción de materia orgánica del agua tratada, se encuentran los sistemas de filtración, los cuales buscan retener los contaminantes, pero tienden a saturarse (antes de que se termine el tratamiento) debido al tamaño de poro que presentan los filtros y/o membranas y, a la

abundancia de material biológico. Además de la filtración, se han utilizado enzimas en el tratamiento de aguas residuales y en otros procesos de biorremediación, pero aún con estos componentes biológicos no se ha logrado eliminar el 100% de los contaminantes orgánicos presentes (Grady et al., 2011). Cabe mencionar que la degradación enzimática no solo se utiliza para eliminar materia orgánica, ya que las enzimas también se han utilizado para el fraccionamiento de organofosforados, hidrocarburos poliaromáticos, insecticidas organofosforados, petróleo, pesticidas, clorofenoles, y proteínas, entre otros.

Si bien todos los compuestos conocidos como contaminantes del agua son importantes, el presente trabajo se centra en los tratamientos existentes, y sus alternativas, para la eliminación de proteínas dado que no siempre se mencionan las implicaciones que tienen estos compuestos biológicos. Es bien sabido que cuando las proteínas se encuentran presentes como contaminantes en el agua éstas representan un riesgo para la salud humana, por lo que es necesario buscar métodos efectivos que facilite su degradación. Entre los métodos conocidos para la degradación de proteínas se encuentra la utilización de proteasas, enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos de las proteínas hasta degradarlas en aminoácidos. Dada la similitud que presentan las proteínas de los seres vivos, algunas proteasas son capaces de degradar distintos tipos de proteínas, independientemente de su origen biológico. Esta capacidad las convierte en moléculas de interés biotecnológico para la degradación de contaminantes orgánicos presentes principalmente, en las aguas residuales.

Considerando lo anterior, en el presente proyecto de investigación se trabajó en la búsqueda de unidades proteolíticas presentes en el mejillón *Mytilus californianus* las cuales podrán ser utilizadas como una alternativa biológica para la degradación de contaminantes orgánicos. Cabe mencionar que se seleccionó el mejillón por ser un organismo marino que presenta un conocido metabolismo filtrador capaz de remover compuestos químicos del agua, entre los que se incluyen los compuestos orgánicos, los metales pesados y, las proteínas.

1.2. BIOINDICADORES

El ambiente marino ha sido ampliamente estudiado para investigar las fuentes y el destino de los contaminantes orgánicos persistentes (POPs, por sus siglas en inglés, Persistent Organic Pollutants). Los POPs son sustancias químicas que permanecen en el medio ambiente por largo tiempo ya que son resistentes a la degradación; son bioacumulables, tóxicos y tienen un alto potencial para transportarse (Stockholm Convention, 2019). El benzo[a]pireno [B(a)P] es un hidrocarburo aromático policíclico (HAP), que ha sido clasificado como un grupo de contaminantes ambientales generalizados. Los HAP se forman durante la combustión incompleta de material orgánico y también ocurren naturalmente en el carbón, el petróleo crudo y la gasolina. Debido a su toxicidad para los seres humanos y otras formas de vida, los HAP son motivo de gran preocupación como amenaza para la salud. B(a)P ocupa el puesto número 8 entre 275 productos químicos en la Lista de prioridades de sustancias peligrosas, según el potencial de exposición humana y el peligro potencial para la salud, entre otros factores (EPA, 2017).

Los derrames de petróleo marino se han convertido en las últimas décadas en un problema de salud para la vida acuática debido a las grandes cantidades de crudo vertidas al océano o a las zonas costeras (Zhang et al. 2018). Se sabe que los HAP son biodegradables; sin embargo, Harmsen & Rietra, (2018) describen la degradación como muy baja para los HAP de 5 y 6 anillos. Según Duan et al., (2018), los HAP se acumulan en los sedimentos marinos y permanecen muy estables incluso durante cinco años después de un derrame de petróleo incidental. Esta estabilidad a largo plazo aumenta la probabilidad de exposición para el ecosistema marino y, por lo tanto, arroja un desafío para que la vida marina contrarreste los efectos de los HAP, a saber, la toxicidad, la mutagenicidad y la teratogenicidad. Específicamente, B(a)P puede causar mutaciones hereditarias en el ADN debido a la formación de aductos entre la molécula B(a)P y el ADN (Moorthy, Chu y Carlin 2015).

Los sedimentos, el agua y la vida marina han demostrado la acumulación, persistencia y efectos de B(a)P (Duan et al., 2018; Harmsen & Rietra, 2018; Lawson et

al., 2021; Livingstone, 2001; Overmans et al., 2018; Wolska et al., 2012). Por el contrario, existe escasa investigación sobre los efectos de B(a)P a nivel molecular y bioquímico, dos tipos de respuesta que pueden utilizarse como biomarcadores. Además, se necesitan modelos animales como bioindicadores para programas de monitoreo ambiental.

Las enzimas del citocromo P450 (CYP) son oxidasas de función mixta (MFO) que sirven como oxidasas terminales en cadenas de transferencia de electrones donde forman un complejo con una flavoproteína conocida como NADPH citocromo P450 reductasa. Los CYP son biomarcadores valiosos debido a su sensibilidad e inducibilidad tras la exposición a los PAH. Se ha informado una gran cantidad de CYP, pero se sabe poco sobre la actividad de MFO en los cnidarios.

2. ANTECEDENTES

2.1. PROTEASAS

Las enzimas proteolíticas son biomoléculas especializadas que tienen la capacidad de hidrolizar un enlace peptídico en un péptido o en una proteína de manera muy precisa, puntual y específica (Figura 1); a éste mecanismo se le conoce como procesamiento y es un regulador fundamental para el correcto funcionamiento de las proteínas casi todas las vías metabólicas de los seres vivos (Alan J. Barrett, J. Fred Woessner, 2013; Klein, Eckhard, Dufour, Solis, & Overall, 2018). La proteólisis es unidireccional y se lleva a cabo en las etapas finales del proceso postraducciona; en algunas células ocurre inmediatamente después de la síntesis ribosomal, mientras que en otras células se lleva a cabo una vez que la proteína sintetizada se localiza en el sitio final donde llevará a cabo su función. Las enzimas proteolíticas además de participar en el procesamiento

celular, son responsables de muchas otras funciones vitales para las células (Rawlings, 2013) entre las que destacan:

- Eliminar la metionina inicial en las proteínas citoplasmáticas recién sintetizadas
- Remover el péptido señal de las proteínas celulares que son transportadas por exocitosis
- Eliminar señales específicas que facilitan el movimiento de proteínas hacia organelos especializados como la mitocondria y el cloroplasto
- Remover propéptidos de moléculas como las hormonas, algunos receptores e incluso de otras enzimas para que se activen
- Liberar péptidos y proteínas de macromoléculas como las poliproteínas
- Liberar péptidos bioactivos de precursores proteicos
- Separar proteínas de la superficie celular
- Apagar señales de péptidos y/o proteínas degradando estas moléculas o a sus receptores
- Reutilizar aminoácidos, ya sea por el propio organismo o por un hospedero celular (patógeno o no)
- Destruir proteínas tóxicas o letales para las células, provenientes de patógenos
- Liberar péptidos antigénicos de patógenos, incluyendo parásitos
- Obtener aminoácidos de proteínas presentes en los alimentos para su reutilización

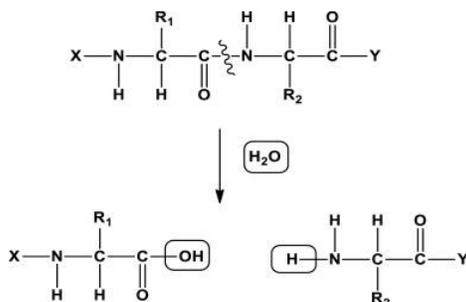


Figura 1. Mecanismo general de acción de las proteasas. Las enzimas dividen las proteínas mediante una reacción de hidrólisis y la posterior adición de una molécula de agua a un enlace peptídico. Tomado de Homaei, Lavajoo, & Sariri, 2016.

Lo anterior nos habla del papel tan importante que tienen las proteasas en la vida de los seres vivos. En el planeta Tierra son muy pocas las proteínas que escapan de los procesos proteolíticos por lo que cuando se descubrieron se les consideraba como

moléculas no deseadas que debían ser eliminadas de los extractos proteicos para que éstos pudieran ser analizados (Neurath, 1999). Hoy sabemos que son esenciales para las células y que una gran cantidad de organismos cuentan con enzimas proteolíticas. Por ejemplo, los organismos parasitarios y/o patógenos utilizan este tipo de enzimas para invadir a sus huéspedes inactivando cualquier proteína que interfiera con su reproducción o que pueda llegar a dañarlos. Los organismos extremófilos por su parte son capaces de producir enzimas que catalizan reacciones en los extremos de pH (por encima o bajo la neutralidad). En el caso de los humanos, se sabe que la degradación intrínseca de proteínas por causa de una enzima proteolítica ocasiona daños metabólicos que conllevan a enfermedades como la artritis reumatoide, metástasis de células tumorales o incluso en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Rawlings, 2013).

Las proteasas son indispensables para el metabolismo, ya que las proteínas que se ingieren en la dieta no llegan con la misma estructura a las células, sino que deben ser fragmentadas en aminoácidos, lo que representa un gasto energético y de aminoácidos para el organismo. Los seres vivos presentan gran similitud en diversas proteínas, a pesar de diferencias relacionadas con las secuencias de aminoácidos y la abundancia de algunas de estas. Las diferencias estructurales convierten a algunas proteínas en moléculas alergénicas, en algunas especies incluyendo la del humano. Para evitar problemas y/o una sobre respuesta del sistema inmunológico, es necesario que dichas proteínas sean convertidas en hipoalergénicas mediante el tratamiento con proteasas. Tras éste tratamiento las proteínas son inocuas y pueden ser consumidas por el humano, o por aquellas especies en las que generan algún tipo de efecto adverso (Elgendy & Abdelrasool, 2016; Pan, Wu, Liu, Cao, & Zeng, 2013). Muchas clases de enzimas proteolíticas son utilizadas actualmente gracias a la percepción que se tiene de éstas enzimas y su utilización se ha vuelto relevante en la industria alimenticia (Kudryashov, Uzakov, Tikhonov, Tikhonova, & Diachkova, 2020; Lee et al., 2019), médica farmacéutica (Gioia et al., 2020; Mirzaei et al., 2019), y biotecnológica (Hammami, Fakhfakh, Abdelhedi, Nasri, & Bayoudh, 2018; Kumar et al., 2022), entre otras. La biocatálisis se ha convertido en una herramienta necesaria en la producción industrial de productos farmacéuticos, agroquímicos y productos químicos a granel e ingredientes alimentarios.

En éste tipo de producción, las proteasas son de las enzimas más importantes, ya que representan más del 60 % de las ventas totales de enzimas a nivel mundial (M. Sharma et al., 2019).

Las enzimas proteolíticas son conocidas también como proteasas, proteinasas y peptidasas (Barrett & McDonald, 1986; Mótyán, Tóth, & Tózsér, 2013). Las proteasas son entidades químicas con una solubilidad constante que siguen los criterios termodinámicos de sus compuestos puros como la pepsina y su inhibidor, la tripsina sus zimógenos e inhibidores, la ribonucleasa, la hexoquinasa, la quimiotripsina y el pepsinógeno, entre otros (Neurath, 1999; Northrop, Kunitz, & Herriott, 1948). En un principio las proteasas se clasificaron por 1) su origen (procariota o eucariota), 2) por el tipo de acción catalítica que presentaban (endopeptidasa o exopeptidasa), 3) por su tamaño molecular y, 4) por su carga y/o especificidad al sustrato (K. M. Sharma, Kumar, Panwar, & Kumar, 2017). Posteriormente la “Enzyme Commission” ubicó a las proteasa en la clase 3 de enzimas subgrupo 4, en las hidrolasas que hidrolizan enlaces peptídicos (Sumantha, Larroche, & Pandey, 2006). Por su homología significativa en la secuencia de sus aminoácidos las proteasas se clasifican en nueve familias y, algunas familias se dividen en subfamilias porque existe evidencia de una divergencia antigua dentro de la misma familia. Por tanto, una familia es un conjunto de enzimas proteolíticas homólogas. Una familia puede contener una sola enzima si no se conocen homólogos, y un solo producto génico, como una poliproteína viral, puede contener más de una enzima proteolítica, cada una asignada a una familia diferente. Cada familia se identifica con una letra que representa el tipo catalítico de las enzimas proteolíticas que contiene junto con un número único (Rawlings, Barrett, & Bateman, 2010). Las nueve familias conocidas de proteasas son:

1. Peptidasas aspárticas
2. Peptidasas cisteínicas
3. Peptidasas glutámicas
4. Metalopeptidasas
5. Peptidoliasas asparagínicas
6. Peptidasas mixtas

7. Peptidasas serínicas
8. Peptidasas treonínicas
9. Peptidasas con sitio catalítico desconocido

(fuente base de datos EMBL-EBI https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/family_index?type=P consultada 4 de febrero del 2022).

Dentro de estas familias, las proteasas se dividen en grupos de enzimas que son activas en rangos específicos de pH. Las proteasas alcalinas son las peptidasas serínicas, cisteínicas, aspárticas y las metalo peptidasas; se definen como proteasas activas en un rango de pH neutro a alcalino y que tienen un centro de serina. Las proteasas se subdividen de acuerdo con su forma de acción como endopeptidasas y exopeptidasas. Las endopeptidasas hidrolizan los enlaces peptídicos en la parte media de la cadena polipeptídica y las exopeptidasas remueven residuos C- o N-terminales de las cadenas (Homaei et al., 2016). Además del sitio de corte, las proteasas también pueden clasificarse en función de su pH óptimo como: neutras, ácidas o alcalinas, siendo desde hace varios años las proteasas alcalinas las más utilizadas en diversos tipos de industria (Figura 2) (Rao, Tanksale, Ghatge, & Deshpande, 1998).

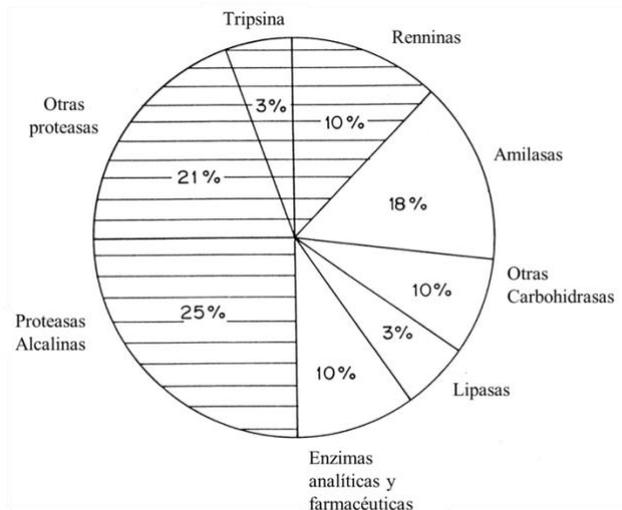


Figura 2. Distribución de los tipos de enzimas que son más utilizadas en la industria. En la gráfica se indica la proporción que representa cada tipo de enzimas del total de enzimas comerciales. La parte sombreada indica el total de proteasas comerciales. Modificado de Rao et al., 1998.

2.1.1. PROTESAS ALCALINAS

Las proteasas alcalinas son el grupo de enzimas más estudiado debido a su amplio uso en las industrias de detergentes, alimentos, farmacéutica y del cuero (Figura 3) (Haddar et al., 2009; M. Sharma et al., 2019). Son ampliamente utilizadas como catalizadores industriales porque presentan una alta actividad catalítica con un alto grado de especificidad por su sustrato y, porque se pueden producir en grandes cantidades mediante procesos económicamente viables (Anwar & Saleemuddin, 1998). El rendimiento de las enzimas proteolíticas está influenciado por varios factores, como el pH del proceso industrial, la fuerza iónica, la temperatura y el manejo mecánico. Estas propiedades enzimáticas permiten que las proteasas sean utilizadas en una diversidad de procesos industriales, que van desde la producción y tratamiento de alimentos específicos (como el ablandamiento de carne de vaca y pescado), la producción de sustancias particulares producto de la hidrólisis de proteínas de células blanco, hasta la biorremediación (Braia, Loureiro, Tubio, Lienqueo, & Romanini, 2017; Martin, 1981; Pan et al., 2013; Xiang-hua, 2012). Además de éstas funciones, las proteasas son utilizadas ampliamente en investigación, en donde se utilizan para aislar células y en el cultivo de tejidos, incluyendo el de células madre (De Ugarte et al., 2003; Martin, 1981).

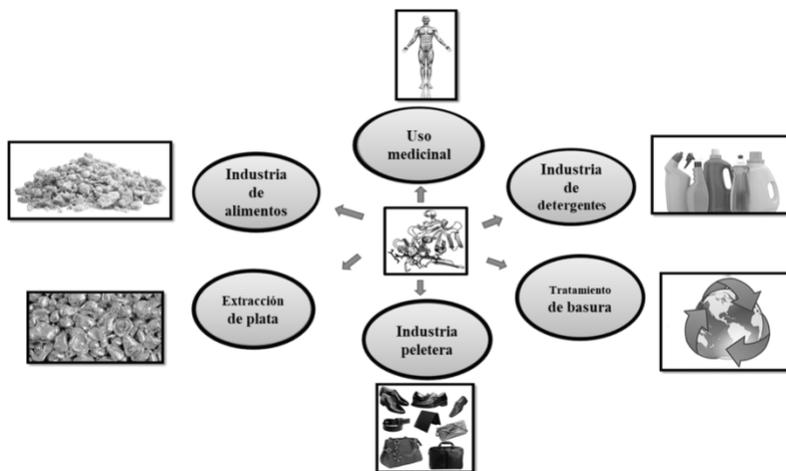


Figura 3.Aplicaciones de las proteasas alcalinas. En el esquema se muestran diversas aplicaciones que tienen actualmente las proteasas alcalinas. Modificado de M. Sharma et al., 2019.

Las proteasas alcalinas se pueden obtener de diversas fuentes como animales, hongos, bacterias e insectos, siendo los microorganismos alcalofílicos los mejores productores de éstas proteínas. Las proteasas alcalinas se producen mediante diferentes técnicas de fermentación, incluida la fermentación en estado sólido y la fermentación en estado sumergido. Para obtener una producción de enzimas comercialmente viable, los medios de fermentación deben optimizarse y controlar el pH, la fuente de nitrógeno, la fuente de carbono, los iones metálicos, la temperatura y los inhibidores enzimáticos, ya que todos estos factores pueden afectar directa o indirectamente la producción de dichas enzimas. A nivel industrial, la producción de proteasas utiliza medios de fermentación que contienen grandes concentraciones, entre 100-150 g peso seco/L, de proteínas, carbohidratos complejos y otros componentes de los medios (Ellaiah, Srinivasulu, & Adinarayana, 2002; M. Sharma et al., 2019).

Las propiedades enzimáticas y fisicoquímicas de las proteasas alcalinas originadas a partir de distintos organismos han sido ampliamente estudiadas. Se sabe que el rango de pH óptimo de las proteasas alcalinas es entre 9 y 11, con algunas excepciones registradas entre pH 11 y 13. Tienen puntos isoeléctricos altos y generalmente son estables entre un pH 6 y uno de 12. Las temperaturas óptimas a las que tienen actividad las proteasas alcalinas oscilan entre 50 y 70°C, con algunos registros de proteasas que trabajan hasta los 85°C. El peso molecular de éstas proteasas tiene un rango entre los 15 y 30 kDa, con algunas que alcanzan los 8 kDa, los 31.6 kDa, los 33 kDa, los 36 kDa, e incluso los 45 kDa (Ellaiah et al., 2002). Para tener una actividad óptima y/o para mejorar su estabilidad térmica, las proteasas alcalinas requieren un catión divalente como Ca^{+2} , Mg^{+2} y Mn^{+2} o una combinación de estos cationes. Se cree que dichos cationes protegen la enzima contra la desnaturalización térmica y juegan un papel vital en el mantenimiento de la conformación activa de la enzima a altas temperaturas (Ong & Gaucher, 1976). En enzimas como la proteinasa K se han descrito sitios de unión específicos de Ca^{2+} que influyen en la actividad y la estabilidad de la proteína. Los estudios de inhibición en las proteasas alcalinas muestran que la actividad catalítica es inhibida por iones de Hg^{+2} , por agentes quelantes como el EDTA, por el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y el fluorofosfato de diisopropilo (DFP). En el caso del PMSF, éste sulfona el residuo de serina esencial en el sitio activo y da como resultado la pérdida

completa de actividad de la proteasa, permitiendo que dicho tipo de proteasas alcalinas se clasifiquen como serina hidrolasas (El-Shanshoury, El-Sayed, Sammour, & El-Shouny, 1995; Ellaiah et al., 2002).

Las velocidades de reacción de las proteasas alcalinas varían ampliamente con los sustratos. Por ejemplo, las proteasas alcalinas resultan ser más activas contra la caseína que contra la hemoglobina o la albúmina sérica bovina. Son específicas contra residuos de aminoácidos aromáticos o hidrófobos, como tirosina, fenilalanina o leucina en el lado carboxilo del punto de división, y tienen una especificidad similar a la quimotripsina. Las enzimas muestran preferencia por los residuos de aminoácidos alifáticos, como la alanina, que están presentes en la elastina. Debido a esto se considera que la elastólisis fue iniciada por la formación de un complejo enzima sustrato a través de la interacción electrostática entre residuos de elastasa cargados positivamente y residuos de elastina cargados negativamente en un rango de pH por debajo de 10.6 (Shevchenko, L. S., Luk'yanov, P. A., & Mikhailov, 1995). Por su parte cuando el sustrato es queratina, los enlaces disulfuro forman una característica estructural importante e impiden la degradación proteolítica de las áreas más compactas de los sustratos queratinosos (Bökle, Galunsky, & Müller, 1995).

2.1.2. PURIFICACIÓN DE PROTEASAS ALCALINAS

Las preparaciones brutas de proteasas alcalinas se emplean generalmente para uso comercial con fines comerciales, y la principal consideración es el costo de producción en relación con el valor del producto final. La purificación de proteasas alcalinas debe permitir el correcto funcionamiento de la enzima una vez que ha sido purificada. Después de la extracción/producción masiva de proteasas deben eliminarse residuos de las células, los sólidos y los coloides del medio o tejido de donde se obtuvieron las proteínas. Para esto se utilizan generalmente filtros rotatorios al vacío y centrifugas de disco continuo. Es importante considerar que para evitar las pérdidas de actividad enzimática causadas por una clarificación imperfecta, es necesario realizar algún pretratamiento químico antes de comenzar la separación. Un tipo de pretratamiento puede ser un

cambio en el pH, lo que facilita una mejor separación de sólidos, los cuales generalmente suelen ser de naturaleza coloidal y son difíciles de eliminar directamente (Bohdziewicz, 1996). En la purificación también se pueden utilizar coagulantes o floculantes para efectuar la formación de coágulos o aglomerados más grandes, que aceleren la separación sólido-líquido. Los agentes floculantes comúnmente utilizados son sales inorgánicas, hidrocoloides minerales y polielectrolitos orgánicos. Por ejemplo, el uso de un polielectrolito Sedipur TF 5 demostró ser un agente floculante eficaz a 150 ppm y pH 7.0-9.0 y dio un rendimiento del 74% de actividad de proteasa alcalina. Dado que la cantidad de enzima presente en el filtrado libre de células suele ser baja, la eliminación del agua es primordial. Los procesos de separación por membrana se han utilizado para el procesamiento posterior, siendo la ultrafiltración uno de los procesos que se ha utilizado en gran medida para la recuperación de enzimas, ya que constituye una alternativa preferida a la evaporación y concentración. En la ultrafiltración se ha usado hidrogel sensible a la temperatura para concentrar proteasas alcalinas, en donde la eficiencia de separación de la enzima depende de la temperatura (Han, Park, & Ruan, 1995).

La precipitación es el método más utilizado para el aislamiento y recuperación de proteasas. También realiza pasos de purificación y concentración. Generalmente se adiciona sal o un solvente orgánico para reducir la solubilidad de las proteínas deseadas en una solución acuosa. Una de las sales que se adicionan como precipitante es el sulfato de amonio, el cual tiene una amplia utilidad en valores de pH ácidos y neutros. También se utiliza el sulfato de sodio como disolvente orgánico, pero la escasa solubilidad de la sal a bajas temperaturas limita su uso. También se ha reportado el uso de acetonitrilo en diferentes concentraciones volumétricas como medio de precipitación primaria para la recuperación de proteasas alcalinas; el uso de acetona seguido de centrifugación y/o secado. La precipitación de enzimas también se puede lograr mediante el uso de polímeros neutros solubles en agua, como el polietilenglicol (El-Shanshoury et al., 1995; Yun, Lee, & Kim, 2003).

Además de la precipitación, las proteasas se pueden purificar por cromatografía de intercambio iónico, ya que generalmente tienen carga positiva y no se unen a los

intercambios aniónicos. Los intercambiadores de cationes pueden ser una opción viable ya que las moléculas se eluyen de la columna mediante un aumento en la sal o el gradiente de pH. También mediante una cromatografía de afinidad es posible purificar proteasas alcalinas; se utiliza un adsorbente de afinidad como la hidroxiapatita para separar la proteasa neutra y purificar la proteasa alcalina, por ejemplo. Otras matrices de afinidad que se pueden utilizar son el Sephadex-a-fenilbutilamina, la caseína agarosa, o la N-benzoiloxycarbonil fenilalanina (Ellaiah et al., 2002; Lakshmi, Muni Kumar, & Hemalatha, 2018). A pesar de las ventajas de la cromatografía de afinidad, la principal desventaja es el alto costo de la purificación al utilizar este método. Los sistemas bifásicos acuosos también se han utilizado para la purificación de proteasas alcalinas utilizando mezclas de polietilenglicol y dextrano o polietilenglicol y sales (como H₃PO₄ y MgSO₄). Para la recuperación de proteasas alcalinas se han empleado métodos como el uso de micelas inversas para la extracción líquido-líquido, la precipitación por afinidad y el fraccionamiento de espumas, entre otros (Sinha, Singh, Ahmed, & Garg, 1996).

Una vez extraídas y purificadas las proteasas alcalinas es importante estabilizarlas para garantizar su actividad en los diluyentes y vehículos finales. Generalmente las preparaciones crudas son muy diferentes de las preparaciones de enzimas purificadas. Hay que considerar que durante el almacenamiento habrá una reducción en la actividad enzimática, por lo cual es indispensable mantener condiciones óptimas durante el almacenaje y el transporte hasta el usuario final de las proteasas. Las soluciones de proteasa están sujetas a degradación proteolítica y autolítica que da como resultado una rápida inactivación de la actividad enzimática. Para mantener la actividad enzimática y proporcionar estabilidad la adición de estabilizadores, como sales de calcio, formiato de sodio, borato, propilenglicol, alcoholes polihídricos de glicerina o betaína, preparaciones de proteínas y compuestos relacionados, ha resultado efectiva (Chauhan, Mathukiya, Singh, & Gohel, 2021). Se ha sugerido la adición de cloruro de sodio en una concentración del 18-20%. Por lo general las preparaciones de enzimas se mantienen en forma líquida estabilizada, ya que la manipulación de enzimas secas presenta riesgos potenciales para la salud.

La estabilización de proteasas alcalinas también ha sido posible mediante el uso de ingeniería de proteínas para mejorar mediante mutagénesis aleatoria el potencial electrostático, la introducción de puentes disulfuro, el reemplazo de residuos lábiles a la oxidación, la modificación de las interacciones de la cadena lateral, la mejora del empaquetamiento interno, el fortalecimiento de la unión de iones metálicos, la reducción en el despliegue de la entropía, la sustitución o eliminación de residuos basada en la homología y, la modificación de la especificidad del sustrato (Ibrahim et al., 2021).

2.1.3. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LAS PROTEASAS

En biotecnología, la bioprospección enzimática es una actividad de investigación básica encaminada a buscar nuevos y mejores biocatalizadores. En esta búsqueda, las proteasas alcalinas tienen un papel importante dadas las múltiples aplicaciones que tienen en distintos procesos biotecnológicos. Considerando el amplio uso que tienen las proteasas en la actualidad, no es de extrañarse que siempre hay demanda de enzimas con propiedades novedosas que pueden mejorar, optimizar o innovar los procesos industriales (K. M. Sharma et al., 2017). El hábitat marino es uno de los lugares naturales de interés para la actividad de bioprospección enzimática (Trincone, 2011). Dada la gran diversidad de compuestos marinos, se estima que el medio ambiente marino se convertirá en una fuente de nuevos compuestos bioactivos como las proteasas alcalinas. Los organismos marinos han evolucionado para sobrevivir en entornos diversos y hostiles, lo que los hace sumamente especializados con metabolitos secundarios (como las enzimas) que tienen mejores posibilidades para uso biomédico e industrial. Los organismos marinos son capaces de producir un amplio espectro de proteasas alcalinas que tienen funciones ecológicas importantes y aplicaciones industriales prometedoras (Barzkar, 2020).

La biotecnología marina de enzimas tiene la ventaja de que dichas proteínas son más estables en rangos específicos de temperatura, lo que les permite utilizarse en diversos tipos de industria. Los microorganismos, algas, vertebrados e invertebrados sirven como fuente para el aislamiento de enzimas marinas. Las enzimas marinas llevan a cabo

bioprocesos extraordinarios debido a sus características como la hipertermoestabilidad, la tolerancia a la sal, la adaptabilidad al frío y la barofilia, características ampliamente reconocidas por la biotecnología en general (Figura 4) (Barzkar et al., 2021). Las proteasas marinas son capaces de llevar a cabo reacciones químicas en circunstancias adversas y les proporcionan un potencial ideal para aplicaciones industriales y biomédicas, tiene una alta eficacia a baja temperatura y es factible inhibir su actividad con cambios leves de temperatura. Un grupo ampliamente encontrado en organismos marinos son las serina proteasas, enzimas digestivas que se encuentran en bacterias marinas, hongos marinos e invertebrados marinos (Barzkar, 2020). Entre los invertebrados marinos que tienen proteasas se encuentran los moluscos bivalvos como el mejillón *Mytilus californianus* (Connor, Sung, Garcia, Gracey, & German, 2016).

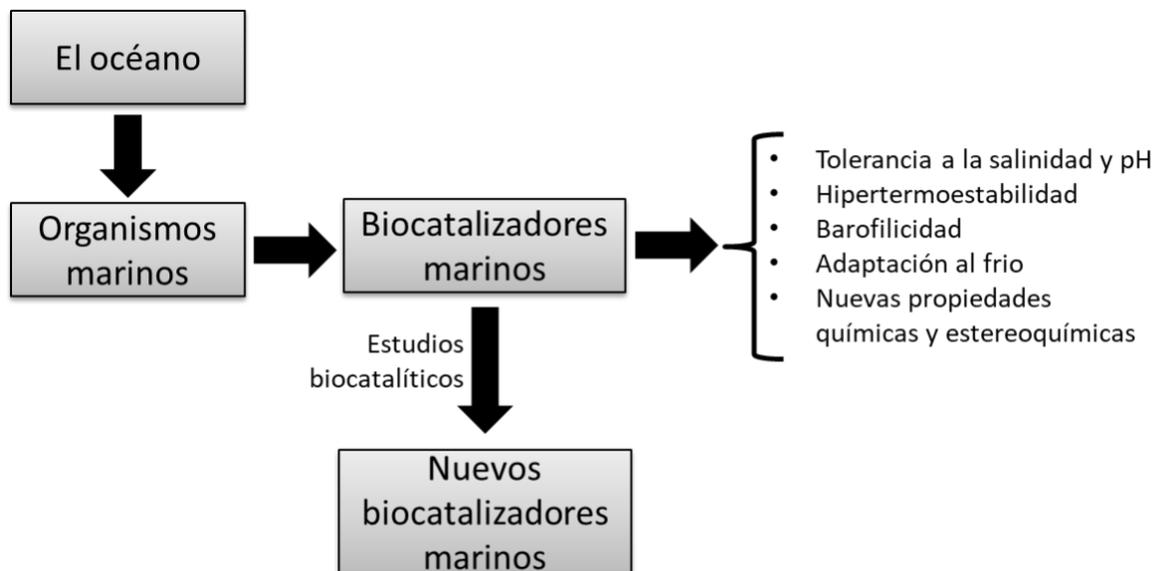


Figura 4. Bioprospección de catalizadores marinos. El esquema representa los pasos generales de la bioprospección para enzimas marinas, así como las principales características que tienen éstas. Modificado de Trincone, 2011.

El mejillón de California *Mytilus californianus* es un molusco bivalvo marino filtrador de la familia Mytilidae. Esta especie es nativa de la costa oeste de América del Norte,

desde la parte norte de México hasta las islas Aleutianas de Alaska. Los mejillones de California se encuentran agrupados frecuentemente en agregaciones en las rocas en la zona intermareal superior en la costa abierta, donde están expuestos a la fuerte acción de las olas (Bayne, Bayne, Carefoot, & Thompson, 1976; Connor et al., 2016). Estos organismos presentan una gran cantidad de proteasas en uno de sus órganos, el hepatopáncreas. El hepatopáncreas es una glándula del tracto digestivo de artrópodos y moluscos que produce distintas enzimas digestivas, como proteasas; estas enzimas son de gran importancia para el sistema digestivo ya que las proteínas que los mejillones consumen son degradadas por estas para obtener los aminoácidos que conforman las proteínas de interés para el organismo (Elgendy & Abdelrasool, 2016). En los mamíferos, el hígado y el páncreas son los órganos responsables de producir enzimas digestivas que permiten la absorción de alimentos digeridos (Bayne et al., 1976; Connor et al., 2016; Van Weel, 1974).

Este tipo de proteasas pueden ser utilizadas a nivel industrial. Entre las proteasas que más se utilizan en biotecnología se encuentra la endoproteasa llamada tripsina. Esta es una enzima importante para distintas especies y su expresión favorece el metabolismo, particularmente tripsina ayuda a la obtención de aminoácidos, al fraccionar proteínas, para formar otras que son requeridas en el metabolismo (Elgendy & Abdelrasool, 2016). La endoproteasa tripsina es de gran utilidad en distintas áreas de la biotecnología de alimentos, es utilizada con gran aprecio en el desarrollo de productos hipoalergénicos, los cuales ayudan a disminuir o inhibir las alergias que producen ciertos alimentos (Pan et al., 2013). La forma en que se desempeña las proteasas, es convirtiendo las proteínas alergénicas en péptidos, los cuales generan una menor respuesta en el sistema inmunológico (Elgendy & Abdelrasool, 2016; Pan et al., 2013). La tripsina puede ser una Serina proteasas debido que al hidrolizar una cadena peptídica en la parte interna (endoproteasa) deja una serina unida en el extremo ácido de la zona recién cortada de la proteína y después es removida por la reacción catalítica, tal y como se muestra en la figura 5 (Elgendy & Abdelrasool, 2016).

Este tipo de enzimas proteolíticas pueden ayudar en el manejo de proteínas que pueden causar un grave daño al ambiente, como la llamada proteína Cry proveniente de

la bacteria Gram-positiva *Bacillus thuringiensis*. Esta bacteria se libera en el ambiente a ser tratado para que produzca su proteína Cry y que ésta a su vez actúe como insecticida, ya que tiene una gran capacidad de eliminar diversos géneros de insectos. El problema subsecuente no es generado por la proteína en sí, sino por las células de *B. thuringiensis* ya que son capaces de proliferar y generar problemas ecológicos en los mantos acuíferos porque disminuye y/o elimina poblaciones de artrópodos, fundamentales en el equilibrio del ecosistema (Höfte & Whiteley, 1989).

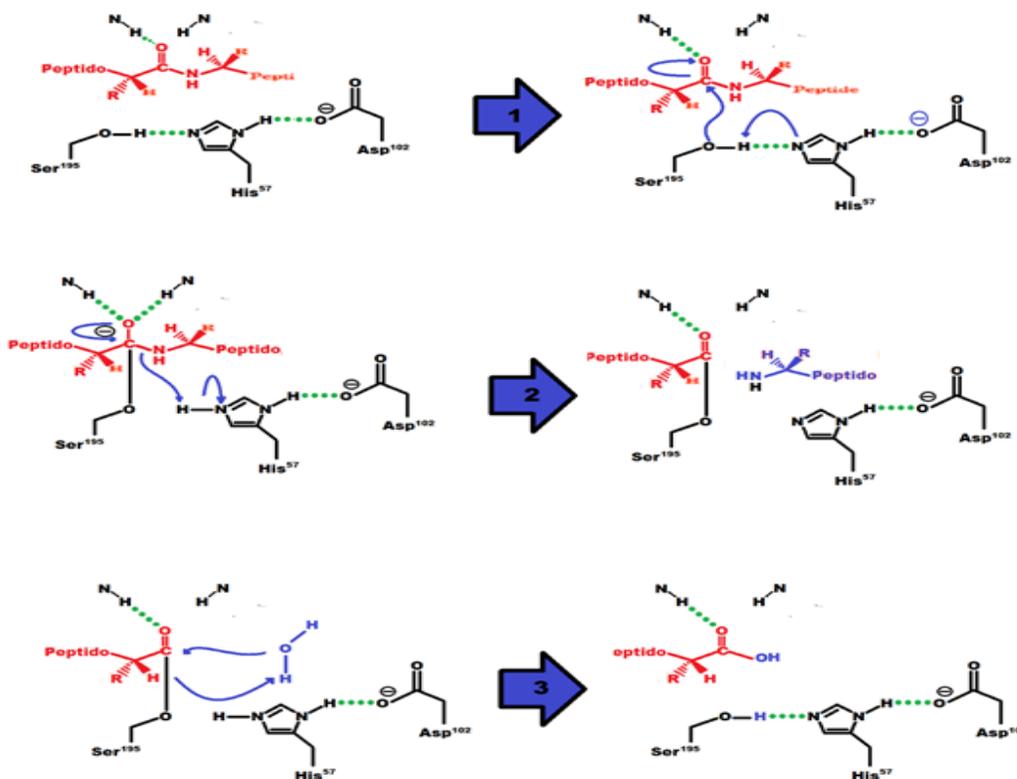


Figura 5.Proceso enzimático de una Serina proteasa. Proteasa alcalina tripsina (color negro) sobre el carbono amida de una proteína n (Rojo) que presente Arginina (Arg) o Lisina (Lys).
 1.- Principales aminoácidos del centro activo de la endoproteasa Tripsina (histidina-57, aspartato-102 y serina-195) los cuales forman enlaces de hidrogeno entre ellos, causando aumento en la nucleofilicidad de la serina. 2.- Tripsina presenta un " hueco de oxianión" generado por átomos de hidrógeno presentes en tripsina (Gly-193 y Ser-195), a través de enlaces de hidrógeno se estabilizan la carga negativa que se acumula en el oxígeno de la amida presente en Arginina (Arg) o Lisina (Lys), después del ataque nucleófilo al carbono de la amida por el oxígeno de la Serina genera que el carbono asuma una geometría tetraédrica realizando el corte de la proteína. 3.- Separación por hidrolisis. Tomado de Elgendy & Abdelrasool, 2016.

Otro ejemplo proteico causante de daños es el de la β -lactoglobulina. Esta proteína es la más abundante en el suero de la leche de vaca, yegua, cerda y varias especies de rumiantes. La β -lactoglobulina está formada por una cadena de 162 aminoácidos con un peso de 18.4 kDa, y se cree que sirve como proteína transportadora de ácidos grasos, pero se desconoce su función en los rumiantes. La β -lactoglobulina no está presente en la leche humana por lo que al ser ingerida el metabolismo la considera como una proteína extraña cuya presencia representa un alto factor de riesgo para el desarrollo de alergias, sobre todo en niños pequeños (Braia et al., 2017). Además, se ha considerado la posibilidad de que la β -lactoglobulina está relacionada con el desarrollo de diabetes en niños menores de 18 meses, ya que la proteína se une a la superficie de las células que producen insulina (Sara & Marcela, 2014).

2.2 BIOINDICADORES

El ambiente marino ha sido ampliamente estudiado para investigar las fuentes y el destino de los contaminantes persistentes. Los sedimentos, el agua y la vida marina han demostrado la acumulación, persistencia y efectos de B(a)P (Duan et al., 2018; Harmsen & Rietra, 2018; Lawson et al., 2021; Livingstone, 2001; Overmans et al., 2018; Wolska et al., 2012). Por el contrario, existe escasa investigación sobre los efectos de B(a)P a nivel molecular y bioquímico, dos tipos de respuesta que pueden utilizarse como biomarcadores. Además, se necesitan modelos animales como bioindicadores para programas de monitoreo ambiental.

Las enzimas del citocromo P450 (CYP) son oxidasas de función mixta (MFO) que sirven como oxidasas terminales en cadenas de transferencia de electrones donde forman un complejo con una flavoproteína conocida como NADPH citocromo P450 reductasa. Los CYP son biomarcadores valiosos debido a su sensibilidad e inducibilidad tras la exposición a los HAP. Se ha informado una gran cantidad de CYP, pero se sabe poco sobre la actividad de MFO en los cnidarios. Además, hay menos información sobre la localización subcelular. Este sistema enzimático se ha establecido en cinco especies de anémonas de mar y una especie de coral (Heffernan y Winston 1998). Los estudios

que se han realizado en anémonas en el campo de la ecotoxicología se centran en la biotransformación del benzo(a)pireno. Se ha identificado la MFO en *Hydra littoralis*, en la que se confirmó la epoxidación in vivo, presumiblemente debido a la actividad de MFO (Khan et al., 1972). En los antozoos, el metabolismo in vitro de B(a)P se detectó en las anémonas *Anthopleura xantogrammica* y *Bunodosoma cavernata*, y en el coral *Favia fragum* (Gassman y Kennedy 1992; Heffernan et al. 1998).

Las anémonas de mar son organismos simples con una anatomía que facilita la localización y el aislamiento de fracciones subcelulares para el análisis de macromoléculas. Las anémonas pueden bioacumular combustibles fósiles (Liu et al. 2020), una capacidad que las hace útiles como bioindicadores de la presencia de B(a)P (Lawson et al. 2021). A nivel bioquímico, las anémonas de mar son modelos animales adecuados para el estudio de los efectos de B(a)P, ya que se han demostrado sistemas enzimáticos relacionados con este xenobiótico en microsomas aislados. Heffernan & Winston, (1998) descubrieron la presencia de citocromo P450 y componentes de oxidasa de función mixta en microsomas de las anémonas de mar *Bunodosoma cavernata*, *Anthopleura elegantissima* y *Anthopleura xanthogrammica* incubadas con B(a)P. Winston et al. (1998) demostraron la inducibilidad del sistema de monooxigenasa funcional relacionado con varios metabolitos oxidativos mediante el tratamiento de microsomas de la región columnar de la anémona de mar *Bunodosoma cavernata* con B(a)P. Utilizando este xenobiótico, Gómez-Gutiérrez & Guerra-Rivas (2010) realizaron pruebas de toxicidad con *A. elegantissima* y demostraron el aumento de NADPH Citocromo C reductasa en microsomas de la región columnar de todo el organismo bajo B(a)P. El propósito del presente estudio es investigar la inducibilidad de NADPH citocromo C reductasa en fracciones subcelulares de la región columnar de individuos enteros de *A. elegantissima* expuestos a B(a)P.

3. HIPÓTESIS

- La unidad proteolítica aislada a partir del hepatopáncreas de *Mytilus californianus* tiene actividad enzimática relacionada con la degradación de proteínas.
- La NADPH citocromo C reductasa de diferentes fracciones subcelulares de la anemona *Anthopleura elegantissima* es inducida en presencia de benzo(a)pireno.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVOS GENERALES

- Purificar una unidad proteolítica alcalina del mejillón *Mytilus californianus* y analizarla para su posible aplicación en biotecnología.
- Determinar la inducibilidad de la NADPH citocromo C reductasa de la anemona *Anthopleura elegantissima* expuesta a benzo(a)pireno.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Purificar una unidad proteolítica alcalina del mejillón *Mytilus californianus*, mediante métodos de cromatografía en columna.
- Determinar la actividad enzimática de la unidad proteolítica alcalina del mejillón *Mytilus californianus*, mediante ensayos enzimáticos.
- Determinar la inducibilidad de la NADPH citocromo C reductasa de diferentes fracciones subcelulares de la anemona *Anthopleura elegantissima* expuesta a benzo(a)pireno.

5. METODOLOGÍA

5.1. COLECTA DE MEJILLÓN *Mytilus californianus*

Los especímenes de mejillón *Mytilus californianus* se colectaron en la localidad de La Bocana Santo Tomás, Ensenada Baja California, México (Latitud 31° 32' 12" norte, Longitud 116° 39' 34" oeste) en septiembre del año 2019 y en febrero del año 2020. Para la colecta se contó con el apoyo de los pescadores de la zona (Figura 6). Tras cada colecta, se trasladaron en frío 20 mejillones vivos al laboratorio Bio 2 de la Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño de la UABC, en donde fueron disectados para obtener el hepatopáncreas.



Figura 6. Puerto de La Bocana Santo Tomas, Ensenada Baja California México. En las fotografías se aprecia A: una de las embarcaciones y sus tripulantes, quienes amablemente participaron en la colecta de los mejillones; B: embarcaciones de pescadores que trabajan en el puerto de La Bocana; C: costa rocosa en La Bocana.

5.1.1. EXTRACTO DE HEPATOPÁNCREAS DE *Mytilus californianus*

Posterior a la disección de los mejillones y para hacer la extracción del tejido, se tomó la masa visceral fresca y se homogenizaron individualmente con Tris-HCl 0.1 M pH 9 en una relación de 0.1g de tejido/mL de Tris-HCl. Los homogenizados se centrifugaron a 9000 rpm durante 15 minutos y se descartó el precipitado, de acuerdo a la metodología descrita por Medve, Lee, & Tjerneld, 1998, y Vakhlu & Kour, 2006. El sobrenadante se almacenó a 4°C para su posterior uso como analito en Cromatografía de intercambio iónico.

5.1.1.1. PURIFICACIÓN DE PROTEASAS: CROMATOGRFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Se separó 1 mL del extracto de hepatopáncreas de *M. californianus* utilizando cromatografía de intercambio iónico en una columna Q-sepharose® (Figura 7). La elución se comenzó con buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 9.0 (50 mL aproximadamente), seguido de buffer de fosfatos 0.1 M pH 8.0 (50 mL aproximadamente), acetatos 0.1 M pH 7.0 (50 mL aproximadamente) y finalmente Tris-HCl 0.1 M pH 6.0 (50 mL aproximadamente). Con cada buffer se recolectaron 20 fracciones de 2.5 mL cada una y se evaluó su absorbancia a 260 nm y 280 nm. Aquellas fracciones correspondientes a los picos de mayor absorbancia se combinaron y se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry modificado.



Figura 7. Cromatografía de intercambio iónico en una columna Q-sepharose®.

5.1.1.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas obtenidas se cuantificaron mediante una curva de calibración, siguiendo el método Lowry modificado (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951). Brevemente, el procedimiento consistió en cuantificar por el método de Hartree-Lowry las proteínas extraídas mediante hidrólisis alcalina y las soluciones estándares. A cada muestra se le agregaron 900 μL de hidróxido de sodio 0,5 N, carbonato de sodio anhidro 10 % y tartrato de sodio y potasio tetrahidratado 0,2 %; las muestras se incubaron a 50°C durante 10 minutos y después se adicionaron 100 μL de hidróxido de sodio 0.1 N, sulfato de cobre pentahidratado 1 % y tartrato de sodio y potasio tetrahidratado 2 %; finalmente se adicionaron 3000 μL de reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu: Agua 2:15 v/v. Las absorbancias de cada muestra se midieron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 650 nm (Flores Ramos & Ruiz Soto, 2017). Los cálculos de concentración se hicieron a partir de las siguientes fórmulas:

$$\Delta A_{650\text{nm}} \text{ Estándar} = A_{650\text{nm}} \text{ Estándar} - A_{650\text{nm}} \text{ Blanco}$$

Preparar una curva estándar para graficar la $\Delta A_{650\text{nm}}$ del estándar contra la concentración de proteína en mg.

Para determinar la concentración de la muestra se utilizó la fórmula:

$$\Delta A_{650\text{nm}} \text{ Ensayo} = A_{650\text{nm}} \text{ Ensayo} - A_{650\text{nm}} \text{ Blanco}$$

La cantidad en mg de proteína se determinó a partir de la curva estándar para proteínas utilizando albúmina.

5.1.1.3. ENSAYO DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Para evaluar la actividad catalítica de las proteasas obtenidas se hicieron ensayos de actividad utilizando caseína como sustrato, siguiendo el método descrito por SIGMA (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Brevemente, el procedimiento a seguir consistió en

marcar 2 viales, uno como blanco y otro como ensayo; después de agregaron 5 mL de una solución al 0.65% (p/v) de caseína, se calentaron los viales a 37°C y se le agregó al vial marcado como ensayo, 1 mL de Solución Enzimática de Proteasa, la cual contenía 0.1 - 0.2 U/mL de Proteasa diluida en una solución fría previamente preparada que contenía Acetato de Sodio 10 con 5 mM de Acetato de Calcio a un pH 7.5; se mezclaron ambos tubos con agitación constante durante exactamente 10 minutos a 37°C y posteriormente se agregó a cada tubo 5 mL de Ácido Tricloroacético 110 mM y, al vial marcado como blanco se le agregó 1 mL de la Solución Enzimática de Proteasas. Ambos viales se colocaron en agitación a 37°C durante 30 minutos y posteriormente se filtraron con papel Whatman #50. Las muestras se guardaron para evaluarse después con el método colorimétrico.

Para la evaluación colorimétrica se preparó una curva estándar de acuerdo con la tabla I.

Tabla I. Reactivos de la curva estándar para evaluación colorimétrica de proteasas.

Reactivo	Estándar 1	Estándar 2	Estándar 3	Estándar 4	Blanco Estándar
Estándar de L-Tirosina 1.1 mM	0.05	0.10	0.20	0.40	0.00
Agua desionizada	1.95	1.90	1.80	1.60	2.00
Carbonato de Sodio 500 mM	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Reactivo de Folin & Ciocalteu	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Tras elaborar la curva se prepararon las muestras y el blanco de acuerdo a lo siguiente: se marcaron nuevamente 2 viales como ensayo y blanco, al vial marcado como blanco se le agregaron 2 mL de la muestra blanco filtrada, y al vial marcado como ensayo 2 mL de filtrado de ensayo, y a cada vial se le adicionaron 5 mL de carbonato de sodio 500 mM y 1 mL de reactivo de Folin & Ciocalteu. Se mezclaron los viales con agitación y se incubaron a 37°C por 30 minutos. Después se dejaron enfriar los viales a temperatura ambiente y se filtraron a través de una membrana de 0.45 µm antes de la

lectura en el espectrofotómetro a 660 nm. Los cálculos se llevaron a cabo de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

Curva estándar: $\Delta A_{660 \text{ nm}} \text{ Estándar} = A_{660 \text{ nm}} \text{ Estándar} - A_{660 \text{ nm}} \text{ Blanco Estándar}$; graficar la $\Delta A_{660 \text{ nm}} \text{ Estándar}$ vs. $\mu\text{moles de Tirosina}$.

Determinación de las muestras: $\Delta A_{660 \text{ nm}} \text{ Muestra} = A_{660 \text{ nm}} \text{ Ensayo} - A_{660 \text{ nm}} \text{ Muestra Blanco}$; determinar los $\mu\text{moles de Tirosina}$ equivalentes a la absorbancia de la curva estándar elaborada. Se calcularon las unidades (U) por mL de enzima de acuerdo a:

$$U/\text{mL enzima} = \frac{(\mu\text{moles equivalentes de Tirosina liberada}) (V_T)}{(V_E) (T) (V_C)}$$

Dónde: V_T = Volumen total (en mL) del ensayo

T = Tiempo del ensayo (en minutos)

V_E = Volumen de la enzima (en mL) utilizada

V_C = Volumen (en mL) usado en la determinación Colorimétrica

Para determinar la cantidad de unidades enzimáticas por mg se utilizó la fórmula:

$$U/\text{mg sólido} = \frac{\text{unidades/mL enzima}}{\text{mg sólido/mL enzima}}$$

Y para la cantidad de proteína la fórmula:

$$U/\text{mg proteína} = \frac{\text{unidades/mL enzima}}{\text{mg proteína/mL enzima}}$$

5.2. COLECTA DE ANEMONA *Anthopleura elegantissima*

Los organismos fueron recolectados en la playa Popotla ubicada en el Municipio de Rosarito, B.C. (32° 17' N; 117° 2' O). Se colectaron 50 anemonas dentro de la zona intermareal. Se seleccionaron individuos entre 3,0 y 3,6 cm de diámetro y se colocaron en hieleras con agua de mar del sitio. Una vez recolectadas, las anémonas fueron transportadas a la Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño. Se lavaron quitando la arena y los pedazos de la concha después de lo cual se distribuyeron en frascos de vidrio con una capacidad de 3 L previamente llenados con agua de mar filtrada (0,45 mm) con una salinidad de 34 ‰. En cada matraz se colocaron dos anémonas de tamaño similar. Los organismos se mantuvieron a 17 °C, con un fotoperíodo de 12 x 12. Todas las anémonas fueron alimentadas el primer y tercer día con trozos de pescado blanco.

5.2.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE BENZO(A)PIRENO

Se realizaron pruebas de solubilidad para benzo(a)pireno en solventes: 20 % de acetona en agua de mar, 40 % de acetona en agua de mar, 60 % de acetona en agua de mar, acetona pura, diclorometano y acetonitrilo. Con base en estas pruebas, decidimos usar acetona como solvente para preparar las tres soluciones tóxicas utilizadas en el experimento de exposición ya que la solubilidad más alta de B(a)P estaba en este solvente.

5.2.2. FRACCIONES SUBCELULARES DE TEJIDO DE *Anthopleura elegantissima*

Para cada fracción se utilizó tejido columnar de organismos bajo las mismas condiciones de exposición. Los tejidos se enjuagaron, pesaron y cortaron en trozos pequeños y luego se homogeneizaron con cinco volúmenes de tampón en un homogeneizador Elvehjem-Potter. El tampón de homogeneización fue fosfato de potasio

0,065 M, pH 7,0, que contenía KCl al 1,15 % y MgCl₂ 3 mM (Stegeman y Kaplan 1981). Las fracciones subcelulares se obtuvieron en centrifugación por etapas, a 750xg durante 10 min (nuclear) y 13 000 x g durante 10 min (mitocondrial) en una ultracentrífuga BIOFUGE 22R-HAEREAUS INSTRUMENTS. Los sedimentos obtenidos se resuspendieron en 2 mL de tampón fosfato 0,1 M pH 7,3 por cada gramo de tejido. Para la fracción microsomal, los tejidos se homogeneizaron con cuatro volúmenes de tampón de fosfato de potasio 0,1 M pH 7,6 que contenía sacarosa 125 mM (Heffernan et al. 1998). Los homogeneizados se centrifugaron en serie en una BIOFUGE 22R (HAEREAUS INSTRUMENTS) durante 15 min a 8500 x g y 15 min a 14000 x g. Los gránulos resultantes se desecharon. Luego, el sobrenadante se centrifugó durante una hora a 105 000 x g en una Sorvall-20/17. El precipitado final (microsomas) se resuspendió en fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,6, que contenía sacarosa 250 mM, y se almacenó a -80 °C. Esta preparación fue de aproximadamente 4 g de tejido/mL de solución tampón.

5.2.3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA NADPH citocromo C reductasa

La actividad de NADPH citocromo C reductasa se midió siguiendo la reducción del citocromo C con el tiempo a 550 nm. El ensayo se llevó a cabo según el método de (Heffernan et al. 1998). La mezcla de reacción fue: citocromo C 0,048 mM; NADPH 1 mM, KCN 1 mM; tampón fosfato 0,1 M, pH 7,7 y 0,02 mL de la fracción subcelular. La reacción se inició añadiendo el cofactor NADPH. La actividad enzimática se definió como la cantidad de nmol de citocromo C reducido por minuto por mg de proteína (nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína). La actividad encontrada en las tres fracciones subcelulares del grupo GC se utilizó como actividad basal para los grupos GS, G2, G4 y G6. El coeficiente de extinción para calcular las actividades fue de 21 cm⁻¹ mM⁻¹ (Heffernan et al. 1998). La concentración de proteína se determinó según el método descrito por Lowry (1951) en muestras de 0,030 mL de cada homogeneizado y se diluyó a 1 mL con agua. Las concentraciones de proteína se calcularon con base en la ecuación obtenida por una curva de calibración (0-0.5 mg mL⁻¹) preparada con una solución estándar de albúmina (0.5 mg mL⁻¹).

5.2.4. DETERMINACIÓN DE BENZO(A)PIRENO EN EL AGUA DE MAR

EXPERIMENTAL

Se examinó el agua de mar de cada frasco de exposición para identificar cualquier B(a)P liberado por las anémonas. Después de la exposición de 72 h y la eliminación de los organismos, se tomó una muestra de agua de mar de 100 mL de cada frasco de vidrio y se extrajo con diclorometano. Este procedimiento se realizó tres veces y los extractos se agruparon. El disolvente se evaporó a sequedad y los residuos se resuspendieron en 2 mL de diclorometano. El espectro se corrió de 200 a 400 nm para cada muestra, usando agua de mar circundante del grupo de control (GC) como línea de base.

5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Zar, 2019) para verificar si la actividad enzimática en cada fracción celular en las concentraciones de B(a)P analizadas se distribuía normalmente. La homogeneidad de varianzas se analizó mediante la prueba de Bartlett (Zar, 2019). Se utilizó un análisis de varianza univariado (ANOVA) unidireccional para evaluar el efecto de B(a)P en la actividad de la reductasa del citocromo C NADPH relacionada con la concentración de B(a)P (Zar, 2019). Las diferencias en la actividad enzimática en función de la concentración de B(a)P se evaluaron para nuclear y mitocondrial utilizando la prueba de Tukey. Todos los coeficientes de correlación (r) (altura y peso; concentración de B(a)P y actividad enzimática) se calcularon con Statistica 5.0.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. PURIFICACIÓN DE UNIDAD PROTEOLÍTICA

Para la extracción se tomó la masa visceral fresca de los hepatopáncreas del mejillón, se pesó y se mantuvo en hielo (Figura 8A y 8B) hasta que posteriormente el tejido se homogenizó con Tris-HCl 0.1 M pH 9 (0.1g/mL) y se filtró con un filtro de 0.2 micrómetros (Figura 8C-8E). Posteriormente la muestra se centrifugó a 9000 rpm por 30 minutos para obtener las fracciones a analizar, se descartó el precipitado y el sobrenadante se almacenó a 4°C.

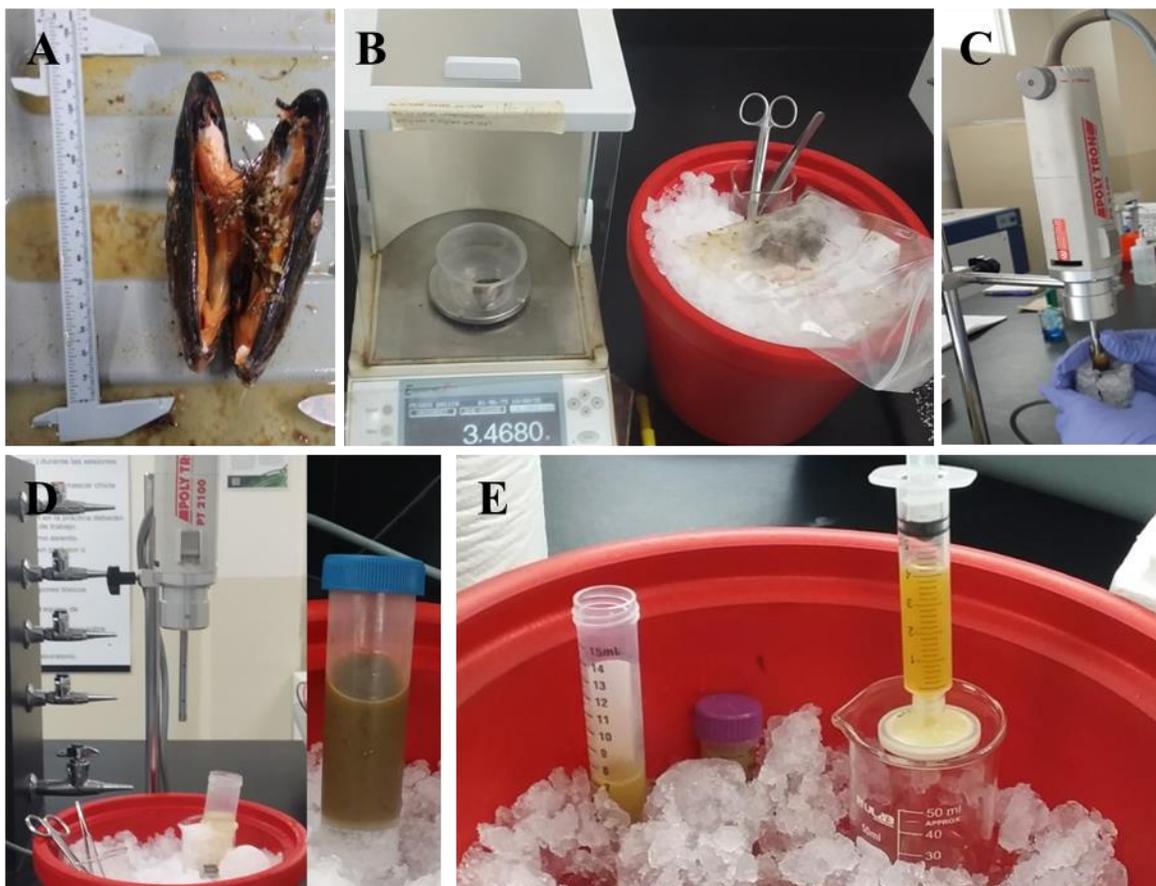


Figura 8. Obtención de tejido de mejillón *Mytilus californianus*. A: Tejido fresco de mejillón. B: Disección del tejido y pesaje. C: Homogenización de hepatopáncreas de mejillón. D: Homogenado de hepatopáncreas de mejillón. E: Filtración del homogenado.

6.1.1. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Las muestras filtradas del homogenado de hepatopáncreas de mejillón filtradas se separaron en fracciones mediante una cromatografía de intercambio iónico (Figura 9). Para esto primeramente se equilibró la fase estacionaria en la columna con Q-sepharose®, con Buffer Tris-HCl 0.1 M pH 9 (0.1g/mL) (Figura 9A). Se dejó un volumen mínimo de buffer, el cual mantuvo a la Q-sepharose hidratada en todo momento. A la columna se le adicionó 1.5 mL del homogenado filtrado de hepatopáncreas de *M. californianus* en Q-sepharose (Figura 9B). Los 1.5 mL de extracto pasaron por gravedad a través de la Q-sepharose (Figura 9C). Seguido se agregaron 2.5 mL de buffer tris a pH 9 para realizar las eluciones (Figura 9D); cada elución colectada fue de 2.5 mL. Las eluciones realizadas y los buffers utilizados se mantuvieron en frío. Una vez colectadas las fracciones se regeneró la fase estacionaria en columna (Figura 9E), con el objetivo de poder reutilizar la columna para la cromatografía de intercambio iónico. El procedimiento se hizo por cuadruplicado. Adicionalmente en otra columna y siguiendo el mismo procedimiento, se hicieron eluciones con Buffer de Fosfatos 0.1 M pH 8 para determinar si se obtenían o no fracciones proteicas distintas con otro pH.

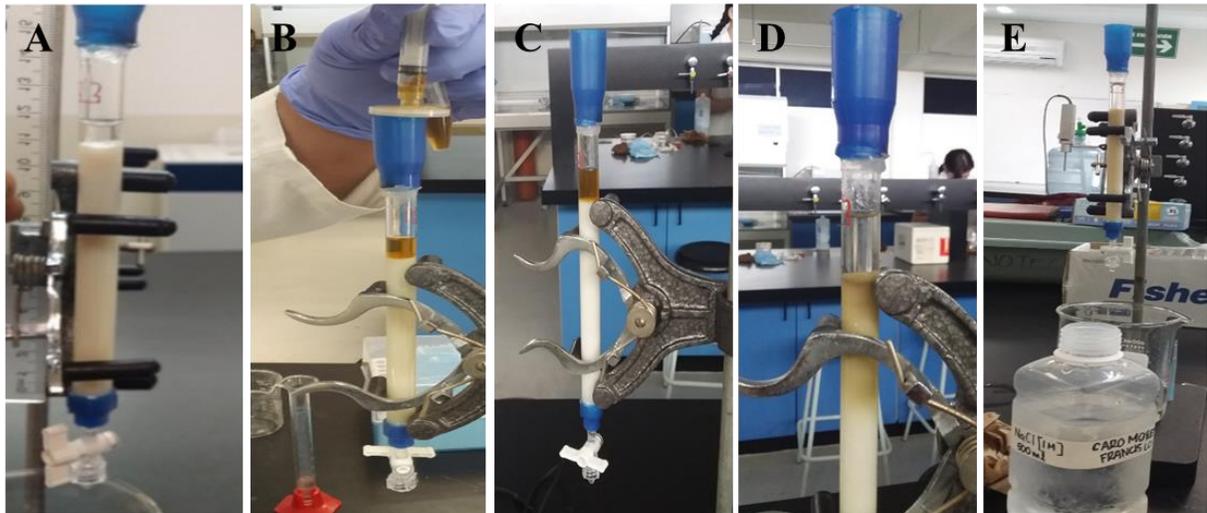


Figura 9. Cromatografía de intercambio iónico. A: Equilibrio de la columna. B: Se agregó la muestra del homogenado de mejillón. C: Corrimiento de la muestra por la columna de intercambio iónico. D: Colecta de eluciones obtenidas. E: Regeneración de la fase estacionaria de la columna.

El gradiente de pH de la columna de intercambio iónico fue de pH 9 a pH 7 ya que en este proyecto se quería identificar una proteasa alcalina. Por lo tanto, se colectaron distintas fracciones; la concentración de proteínas de las distintas eluciones se determinó por el método de Lowry y se seleccionaron aquellas que presentaban una mayor concentración proteica (Figura 10).

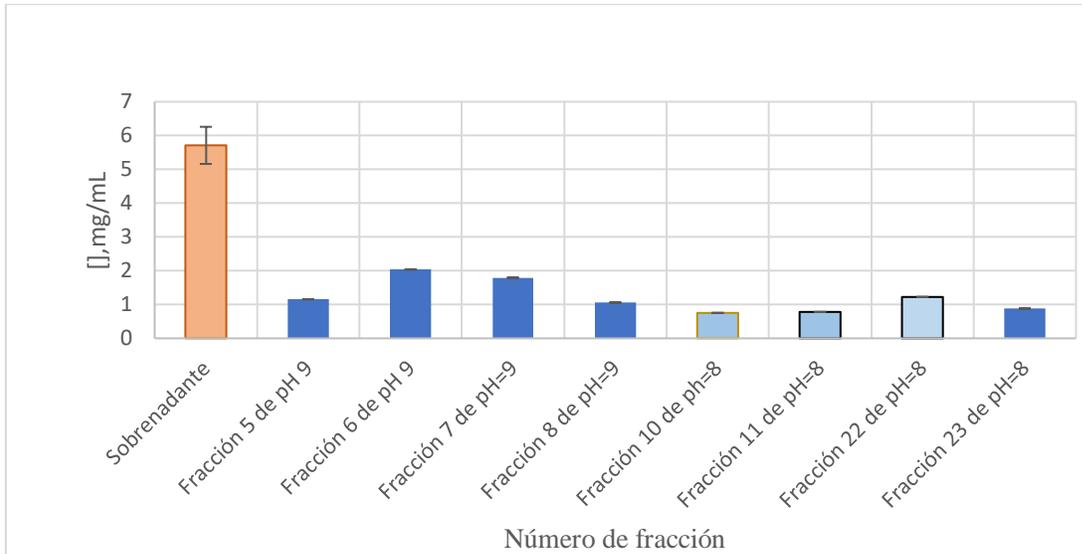


Figura 10. Identificación de fracciones eluidas de la cromatografía de intercambio iónico (desviación estándar, $\alpha = 0.05$)

Con estos resultados podemos observar que la mayor concentración de proteínas se encontró en las fracciones de pH 9 y pH 8; no se identificaron fracciones con proteínas a pH 7. Las eluciones seleccionadas posteriormente fueron concentradas y liofilizadas para tener una mayor cantidad de proteína.

6.1.2. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Debido a que la finalidad del proyecto es el identificar unidades proteolíticas que tengan actividad a pH alcalino, se realizaron los ensayos enzimáticos con las fracciones

previamente identificadas. En la figura 11 se observan las actividades enzimáticas de las fracciones aisladas

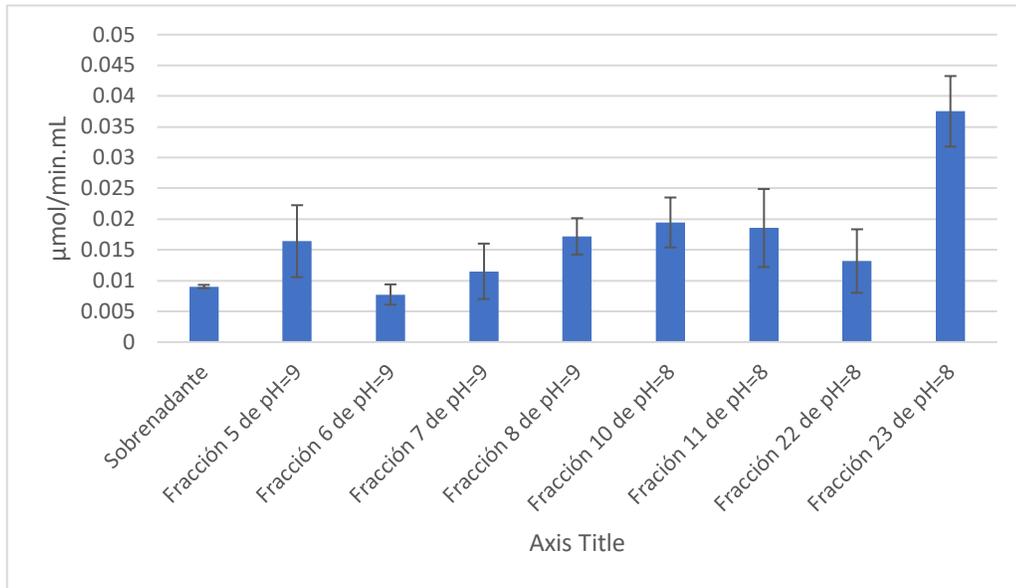


Figura 11. Actividad proteolítica de las fracciones aisladas a pH 8 y pH 9 (desviación estándar, $\sigma = 0.05$)

En la fig. 11 se puede observar que todas las fracciones aisladas a pH 8 y pH 9 tienen actividad proteolítica; sin embargo, la que mayor actividad presenta es la fracción 23 que corresponde al pH 8. Con estos resultados podemos decir que el hepatopáncreas del mejillón *Mytilus californianus* tiene una unidad proteolítica con capacidad de degradar proteínas a pH 8 y pH 9 siendo la del pH 8 la que presenta mayor actividad.

6.1.3. ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Con la finalidad de identificar y caracterizar las proteínas que se encontraban en las fracciones de hepatopáncreas de *M. californianus* se realizaron electroforesis SDS-PAGE al 7%. Primero se analizaron los extractos crudos, en los geles de poliacrilamida fue posible observar la presencia de proteínas (Figura 12). Tras corroborar esto se procedió con la elución y purificación de las mismas.

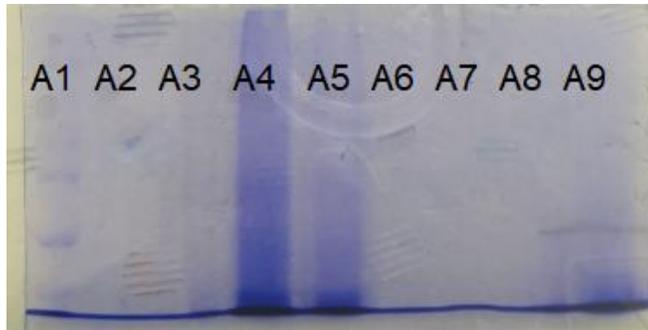


Figura 12. Gel de poliacrilamida para determinar la presencia de proteínas totales en el homogenado de hepatopáncreas de mejillón. A1: Escalera de proteínas; A2 y A3: Libre; A4 y A5: Sobrenadante de hepatopáncreas; A6: Elución pH9; A7: Elución pH8; A8: libre; A9: sobrenadante de hepatopáncreas.

6.1.3.1. MUESTRAS ELUÍDAS

Una vez identificadas las fracciones que presentaban actividad enzimática (fig. 11), las muestras se dializaron para para eliminar las sales y poder realizar la electroforesis SDS-PAGE (Figura 13).

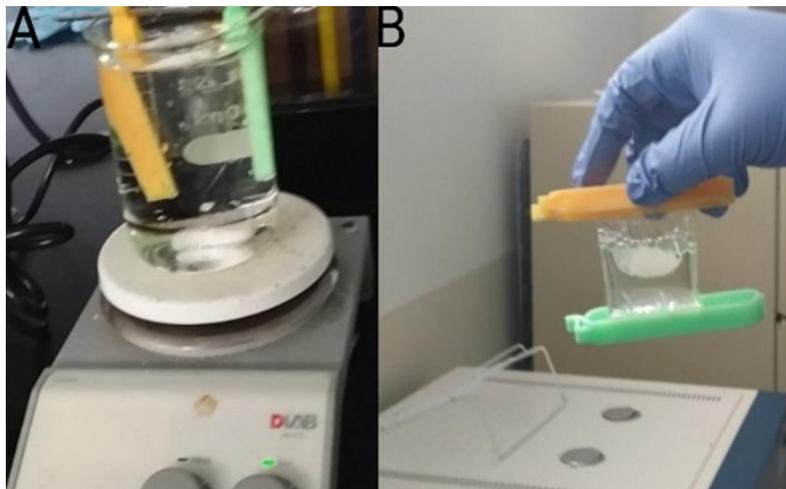


Figura 13.Proceso de ósmosis para las eluciones. El proceso se hizo previo a la electroforesis para las eluciones obtenidas con tris pH 9 de la cromatografía de intercambio iónico realizada con el homogenado de hepatopáncreas de mejillón *Mytilus californianus*.

Las muestras que presentaron una mayor concentración se corrieron en geles de poliacrilamida para determinar la presencia de cada una de sus fracciones proteicas (Figura 14, 15).

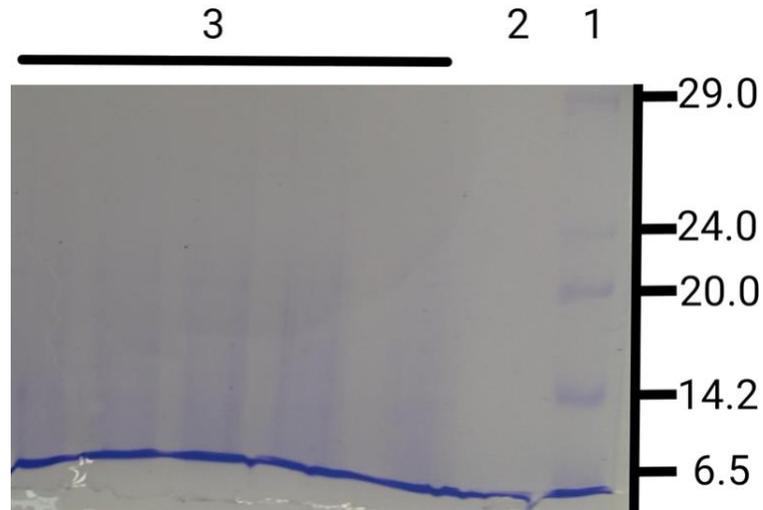


Figura 14. Gel 1 de poliacrilamida a 0.75 mm de grosor. 1: Escalera (S8445 SigmaMarked) para determinar el peso molecular en kDa. 2: Blanco. 3: Muestra eluída 2. Las eluciones fueron obtenidas con tris pH 9 de la cromatografía de intercambio iónico realizada con el homogenado de hepatopáncreas de mejillón *Mytilus californianus*.

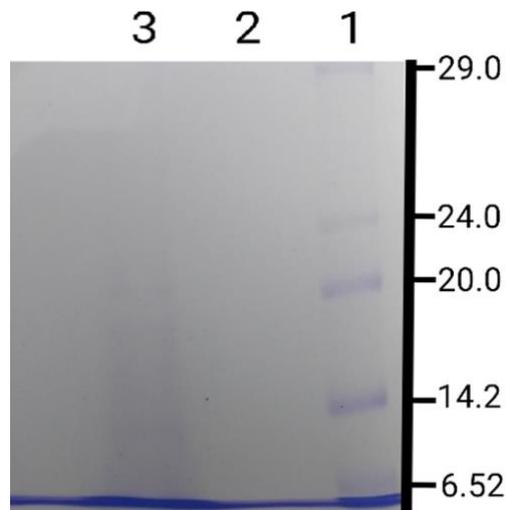


Figura 15. Gel 2 de poliacrilamida a 0.75 mm de grosor. 1: Escalera (S8445 SigmaMarked) para determinar el peso molecular en kDa. 2: Blanco. 3: Muestra eluída 2. Las eluciones fueron obtenidas con tris pH 9 de la cromatografía de intercambio iónico realizada con el homogenado de hepatopáncreas de mejillón *Mytilus californianus*.

Como resultado de la electroforesis se identificaron proteínas con pesos moleculares similares a los reportados para otras proteasas; sin embargo, las imágenes no son concluyentes y es necesario concentrar la muestra para obtener resultados significativos.

6.2. INDUCCIÓN DE LA NADPH CITOCROMO C REDUCTASA DE LA ANEMONA

Anthopleura elegantissima

Las tallas y pesos de los grupos experimentales no mostraron diferencias significativas ($\alpha = 0,0010$), manteniendo una talla media general de $3,22 \pm 0,19$ cm en cada frasco de vidrio. Los tamaños de los organismos se encontraron entre 3,00 y 3,6 cm en la copa y los pesos entre 12,63 y 31,23 g. Se encontró una correlación lineal entre el peso y la altura de los 50 organismos utilizados en el bioensayo ($r=0,9257$).

6.3. EVALUACIÓN DEL AGUA DE MAR CIRCUNDANTE DURANTE EL BIOENSAYO DE EXPOSICIÓN

No se identificó la señal de B(a)P en ninguno de los 15 frascos de experimentación después de las 72 h de exposición. Ninguno de los picos máximos de absorbancia del benzo(a)pireno (264, 284, 296, 365 y 383 nm) aparece en los medios circundantes, según los espectros de la Figura 16. En la mayoría de ellos, se encontraron absorbancias negativas entre 200 y 383 nm. y 280 nm.

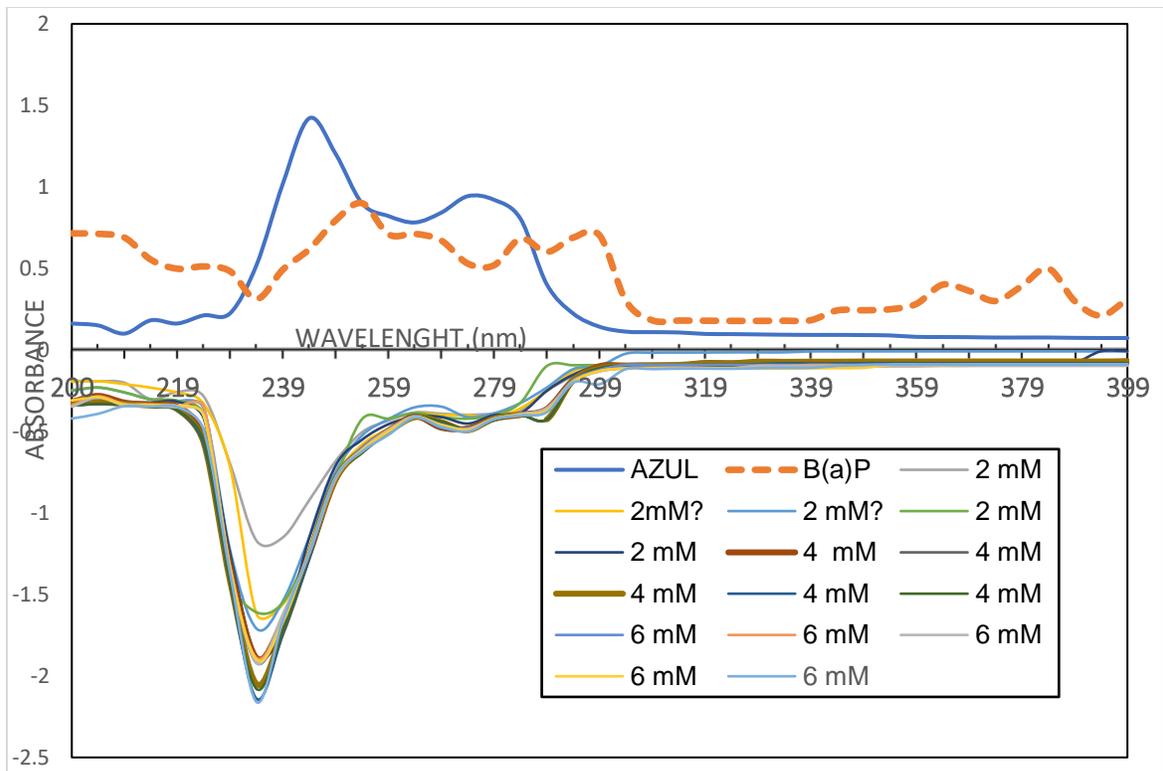


Figura 16. Espectros de absorción UV de extractos de agua de mar. Los extractos se obtuvieron tras la extracción de los ejemplares de *Anthopleura elegantissima* de los frascos en el experimento de exposición. El agua de mar de cada recipiente de exposición se trató con diclorometano y se leyó la absorbancia de la fase orgánica. Los organismos se sometieron a exposición B(a)P durante 72 h. Se indican los valores de concentración para cada grupo (10 individuos) expuestos. El espectro B(a)P es un B(a)P de 56 mM en agua de mar a modo de comparación

Actividad enzimática: se encontró actividad NADPH citocromo C reductasa en las tres fracciones subcelulares de todos los grupos experimentales (GC, GS, G2, G4, G6). Los valores de cada una de las fracciones se muestran en la Tabla II.

Comparamos la actividad de NADPH citocromo C reductasa en fracciones nucleares, mitocondriales y microsomales con la fracción correspondiente en el grupo con el que se comparará.

Fracción nuclear: El análisis estadístico reveló que no existen diferencias significativas entre las fracciones de los grupos GC y GS. Las actividades enzimáticas de la fracción nuclear oscilaron entre 1,00 y 2,144 nmol de citocromo C reducido min⁻¹ mg⁻¹. Los grupos G2 y G4 mostraron las mayores actividades en el núcleo sin diferencias significativas entre ellos ($\alpha = 0.05$). Las actividades más bajas se dieron en los grupos GC, GS y G6 con valores de 1.135, 1.183 y 1.05 nmol de citocromo C reducido min⁻¹ mg⁻¹ respectivamente (Tabla II, Figura 17). No hubo diferencias significativas entre GC, GS y G6 ($\alpha = 0,05$). La actividad basal en la mitocondria fue más alta que la actividad basal encontrada en las fracciones nuclear y microsomal. Las actividades mitocondriales de la NADPH citocromo C reductasa de todos los grupos fueron muy altas, siendo los grupos GC y GS los más altos, sin diferencias significativas entre ellos ($\alpha = 0.05$).

Tabla II. Actividad de NADPH citocromo C reductasa (\pm ds) en fracciones subcelulares de tejido columnar de anémoma de mar *Anthopleura elegantissima* bajo exposición a benzo (a) pireno durante 72 h. En todos los casos, el número de organismos por grupo fue de 10. Los valores son el promedio de cinco mediciones. Se muestran las sustancias y concentraciones a las que estuvo expuesto cada grupo. La actividad enzimática se expresa en nanomoles de citocromo C reducido por minuto por miligramo de proteína. B (a) P = Benzo (a) pireno. Disolvente = Acetonitrilo. GC = Grupo de control; GS = grupo de disolventes; G2, G4 y G6 = Grupos expuestos a 2, 4 y 6 mM de B(a)P respectivamente.

Fracción celular	GRUPOS				
	GC	GS	G2	G4	G6
	Agua de mar	1.5 % disolvente	2 mM B(a)P	4 mM B(a)P	6 mM B(a)P
Nuclear	1.135 \pm 0.006	1.183 \pm 0.02	1.827 \pm 0.02	2.144 \pm 0.02	1.05 \pm 0.13
Mitocondrial	8.762 \pm 0.08	8.913 \pm 0.13	5.049 \pm 0.17	5.654 \pm 0.52	4.789 \pm 0.64
Microcrosomal	2.95 \pm 0.04	3.051 \pm 0.16	3.702 \pm 0.47	3.836 \pm 0.73	4.595 \pm 0.62

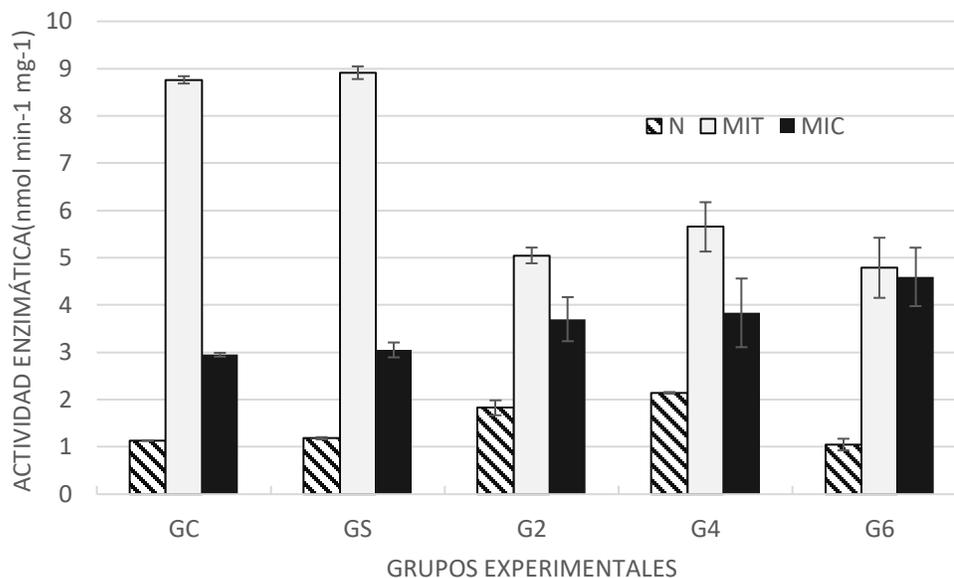


Figura 17. Actividad de NADPH citocromo C reductasa en fracciones subcelulares de tejido columnar de anémona de mar *Anthopleura elegantissima* bajo exposición a benzo(a)pireno durante 72 h. En todos los casos, el número de organismos por grupo fue de 10. Los valores son el promedio de cinco mediciones. La actividad enzimática se expresa en nanomoles de citocromo C reducido por minuto por miligramo de proteína. B (a) P = Benzo (a) pireno. Disolvente = Acetonitrilo. GC = Grupo de control; GS = grupo de disolventes; G2, G4 y G6 = Grupos expuestos a B(a)P 2 mM, 4 mM y 6 mM respectivamente. N = Fracción nuclear MIT = Fracción mitocondrial.

Fracción mitocondrial: Las actividades mitocondriales de los organismos expuestos se comportaron de manera similar a las encontradas en la fracción nuclear, y no se observaron diferencias significativas entre las actividades de los grupos G2 y G4 ($\alpha = 0,05$). Sin embargo, en las mitocondrias del grupo G6 la actividad enzimática disminuyó un 16,2% con respecto a la actividad del grupo G4. Para esta fracción se obtuvo un coeficiente de correlación negativo ($r = -0,79$).

Fracción microsomal: La actividad en el grupo GC y GS fue de $2,95 \pm 0,04$ y $3,05 \pm 0,157$ nmol de citocromo C reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, respectivamente. En esta fracción, al igual que en núcleos y mitocondrias, no se encontraron diferencias significativas entre las actividades de estos dos grupos ($\alpha = 0,05$). En los organismos

expuestos observamos incrementos en la actividad enzimática relacionados con el incremento en la concentración de B(a)P. En la fracción microsomal, la NADPH citocromo C reductasa fue 25, 30 y 80 % más activa que los controles en los organismos expuestos a 2 mM, 4 mM y 6 mM respectivamente. Todas estas actividades se calcularon con respecto a la actividad basal obtenida para el grupo control de organismos ($2,9504 \pm 0,04$). Para esta fracción se obtuvo una alta correlación ($r = 0,98$) entre la actividad de NADPH citocromo C reductasa y la concentración de B(a)P.

Además de la medición directa del contaminante, los biomarcadores y bioindicadores son excelentes herramientas para abordar los estudios de contaminación. El descubrimiento de enzimas relacionadas con el citocromo P450 en anémonas de mar Heffernan & Winston (1998) mostró la posibilidad de que estos organismos sean bioindicadores de HAP en ambientes marinos. Este hallazgo también sugiere que las enzimas asociadas con el citocromo P450 podrían ser biomarcadores prácticos de PAH para la investigación de la contaminación marina costera. En nuestro estudio, una de esas enzimas, NADPH citocromo C reductasa, se encontró en todas las fracciones obtenidas del tejido columnar. Sin embargo, nuestros resultados muestran diferentes intervalos de actividad de B(a)P en el núcleo, las mitocondrias y los microsomas de *A. elegantissima*. La actividad NADPH citocromo C reductasa encontrada en el grupo control (GC) fue la más baja de todos los grupos. En general, para el grupo GC, los valores fueron: núcleo < microsomas < mitocondrias. Nuestros resultados para la fracción nuclear son comparables con los encontrados en el percebe *Balanus ebemeus*, informados por Stegeman & Kaplan (1981). Estos investigadores informaron actividad de 0,819 nmol de citocromo C reducido min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. Para el pez marino *Stenotomus versicolor*, la actividad en los núcleos se estableció en 0,219 nmol de citocromo C reducido min⁻¹ mg⁻¹ de proteína (Stegeman y Binder 1979).

La fracción microsomal ha sido la más estudiada para identificar MFO ya que la actividad NADPH citocromo C reductasa es alta dentro del retículo endoplásmico (Solé y Livingstone 2005). El valor de referencia para microsomas determinado en el presente estudio ($2,961 \pm 0,19$ nmol de citocromo C reducido min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) está dentro

del intervalo informado para cnidarios por (Heffernan y Winston 1998), quienes encontraron valores de $3,4 \pm 0,5$, $2,0 \pm 0,2$ y $2,1 \pm 0,3$ nmol de citocromo C reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína para los microsomas de *A. elegantissima*, *A. xantogrammica* y *Bunodosoma cavernata* respectivamente. Estos datos sitúan a los cnidarios en la parte más baja de los valores obtenidos para los invertebrados ya que el rango de actividad NADPH citocromo C reductasa para la mayoría de los invertebrados se reporta entre 2 y 10 nmol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Las actividades más cercanas son las del erizo *Echinus esculentus* (5.6 ± 1.9 nmol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$), aunque se han reportado valores más altos para otros equinodermos (den Besten et al., 1990). Se han encontrado actividades superiores a 10 nanomol-1 $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ en organismos como el percebe *Balanus eberneus* (Stegeman y Kaplan 1981) y el mejillón *Mytilus edulis* (Livingstone et al. 1985). Estos valores altos son de esperar, dado que los percebes y los moluscos bivalvos tienen órganos especializados donde la NADPH citocromo C reductasa debe estar activa. Por el contrario, los cnidarios tienen un menor desarrollo evolutivo con una baja especialización.

La actividad basal encontrada en la fracción mitocondrial fue mayor que la actividad basal en núcleos y microsomas. Este resultado podría explicarse por la presencia de tejido lipídico no eliminado, añadiendo moléculas lipídicas al tejido columnar carente de grasa. La capa grasa observada tras la primera centrifugación en las muestras del grupo GC y GS sugiere la presencia de ácidos grasos. Además, NADPH podría haber estado presente debido a su papel como cofactor necesario para la síntesis de ácidos grasos. Por otro lado, se podría esperar una gran actividad en las mitocondrias ya que el NADH se encuentra en grandes cantidades en estos orgánulos debido al ciclo de Krebs. Este nucleótido, al igual que el NADPH, puede actuar como donador de electrones y, por tanto, aumentar la actividad enzimática. Para evitar la interferencia de NADH en la función de NADPH, se agrega KCN en el ensayo enzimático para inhibir el suministro de NADH por transporte electrónico (síntesis de ATP), específicamente en el complejo de citocromo C oxidasa. Sin embargo, los altos niveles de NADH podrían exceder la acción del inhibidor, provocando un valor elevado de actividad enzimática.

En cuanto a los organismos expuestos a B(a)P, la fracción nuclear presentó un aumento del 71,16% en el grupo expuesto a una concentración de 2 mM. Esta actividad

no es significativamente diferente de la encontrada en organismos expuestos a B(a)P 4 mM. En el grupo B(a)P 6mM (G6), la actividad disminuyó sin diferencias significativas entre este grupo y el grupo control. Esta disminución da $r = 0,06$ entre la actividad enzimática y la concentración de B(a)P. Por lo tanto, la NADPH citocromo C reductasa es independiente de la concentración del tóxico. Cabe mencionar que la fracción nuclear contiene elementos celulares que sedimentan a la misma velocidad que los núcleos, como células enteras, citoesqueletos y membranas plasmáticas. Debido a la presencia de estos componentes, podríamos decir que el núcleo celular no es práctico en la búsqueda de biomarcadores.

Para las anémonas de mar bajo B(a)P, encontramos la mayor actividad en las fracciones mitocondriales de organismos expuestos a concentraciones de 2 y 4 mM de B(a)P, sin diferencia significativa entre ellas ($\alpha = 0.05$). Por el contrario, los animales por debajo de 6 mM de B(a)P mostraron una disminución de la actividad enzimática con respecto a las concentraciones de los grupos G2 y G4. La comparación entre los grupos GC y GS fue difícil debido a las anomalías encontradas en este último. Suponiendo una sobreestimación proporcional en la actividad enzimática de las fracciones mitocondriales de los grupos G2, G4 y G6, encontramos una correlación lineal entre la concentración de B(a)P y la actividad de la reductasa del citocromo C de NADPH ($r = -0.78$). El coeficiente de correlación también indica que el citocromo P450 no aumenta su actividad en presencia del xenobiótico utilizado en el bioensayo. Este valor negativo implica que no se cumple la función de degradación, y no se justifica la biotransformación de B(a)P en esta fracción celular a una concentración alta.

Se observó una alta correlación en la fracción microsomal entre la actividad de NADPH citocromo C reductasa y la concentración de PAH ($r = 0,961$). Parece que se produce estimulación microsomal, favoreciendo una mayor actividad de la MFO. Este hecho no asegura la biotransformación completa de B(a)P en la anémona por las mismas rutas propuestas para otros organismos marinos (Jørgensen et al. 2008; Mitchelmore et al. 1998), pero la correlación indica la inducibilidad de la MFO- sistema reductasa asociado. También se han encontrado aumentos en la actividad de las reductasas asociadas con MFO, así como de las enzimas involucradas en la fase II de

biotransformación, para otras especies marinas expuestas a petróleo, HPAH y PAH. Se han reportado efectos de este tipo para poliquetos marinos (Lee et al. 1981), peces mesopelágicos (Bozinovic et al. 2021; García-Segura et al. 2018), bígaros, mejillones y almejas (Livingstone et al. 1985; Solé y Livingstone 2005).

MFO no solo participa en la biotransformación xenobiótica, sino que también participa en procesos de desarrollo como la producción de hormonas. Para los cangrejos, se han encontrado variaciones en las enzimas dependientes de MFO relacionadas con la etapa de desarrollo de los organismos (Rewitz, Styris have y Andersen 2003; Singh et al. 2021). A pesar de estar en un nivel evolutivo más bajo, asumimos posibles fluctuaciones de actividad por este factor. Recolectamos organismos de diámetros de copa similares y medimos el peso después de la expulsión del agua. El coeficiente de correlación ($r = 0,9257$) muestra un aumento lineal del peso en función del tamaño. Por lo tanto, el tamaño de los organismos utilizados en nuestro experimento se estima correctamente. No se observaron diferencias significativas ($\alpha = 0,001$) entre los valores medios de talla de los grupos experimentales; por lo tanto, el tamaño de los organismos no afecta la actividad de la NADPH citocromo C reductasa.

Bajo factores estresantes, las anémonas de mar hacen contracciones corporales que podrían expulsar el tóxico a los alrededores. En un bioensayo, se debe descartar una pérdida de B(a)P por parte de los organismos o aplicar una corrección de factor. Por esta razón, exploramos los frascos de exposición buscando el hidrocarburo en el agua de mar de los contenedores. Ninguno de los espectros UV (Fig. 2) mostró picos máximos de absorbancia de B(a)P (Chen y Chen 2001). Todos los matraces de exposición, excepto uno de G4, mostraron absorbancias negativas en el rango de 200 a 280 nm. El blanco fue agua de los contenedores del grupo GC, que presentó absorbancias máximas a 234 y 272 nm. Por lo tanto, cuando se restó el blanco, se obtuvieron absorbancias negativas. En el espectro con diferencias de absorbancia máxima a 244 nm y 272 nm, no hay concordancia con los máximos de B(a)P. Estas absorbancias podrían provenir de los desechos metabólicos de las anémonas. Según los espectros, no había B(a)P residual en ninguno de los matraces de exposición, lo que excluye la expulsión.

7. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se identificó una unidad proteolítica (proteasa) en el hepatopáncreas del mejillón *Mytilus californianus* tiene una unidad proteolítica con capacidad de degradar proteínas a pH 8 y pH 9 siendo la del pH 8 la que presenta mayor actividad. Como resultado de la electroforesis se identificaron proteínas con pesos moleculares similares a los reportados para otras proteasas; sin embargo, las imágenes no son concluyentes y es necesario concentrar la muestra para obtener resultados significativos. Por otra parte, se identificó NADPH citocromo C reductasa, específica para P450, en las tres fracciones subcelulares estudiadas. Este hallazgo confirma que el complejo enzimático MFO está presente en la región columnar de *A. elegantissima* (Heffernan y Winston 1998). Nuestro trabajo anterior mostró que B(a)P induce un aumento de la reductasa en animales inyectados con dosis crecientes del contaminante (Gómez-Gutiérrez y Guerra-Rivas 2010). Además, informamos en el presente trabajo la presencia de este sistema enzimático en el núcleo, mitocondrias y microsomas de organismos administrados aumentando las concentraciones de B(a)P. Juntos, estos hechos implican que *A. elegantissima* puede responder a los xenobióticos orgánicos de su entorno. La alta correlación entre el contaminante y el efecto observado solo en la fracción microsomal sugiere que esta es la única con un citocromo P450 dependiente de MFO funcional. Por lo tanto, la fracción microsomal es potencialmente útil como biomarcador sensible de PAH en anémonas. La abundancia, tamaño, movilidad y simplicidad morfológica de las anémonas de mar dentro de su nicho las convierten en un bioindicador adecuado para programas de monitoreo ambiental.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alan J. Barrett, J. Fred Woessner, N. D. (Ed.). (2013). *Handbook of Proteolytic Enzymes. Handbook of Proteolytic Enzymes* (Second Edi, Vol. 1–3). London: Elsevier Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2009-1-60990-4>
- Anwar, A., & Saleemuddin, M. (1998). Alkaline proteases: A review. *Bioresource Technology*, 64(3), 175–183. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00182-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00182-X)
- Barrett, A. J., & McDonald, J. K. (1986). Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *The Biochemical Journal*, 237(3), 935. <https://doi.org/10.1042/bj2370935>
- Barzkar, N. (2020). Marine microbial alkaline protease: recent developments in biofilm n ideal choice for industrial application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1216–1229. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.072>
- Barzkar, N., Khan, Z., Tamadoni Jahromi, S., Poormozaffar, S., Gozari, M., & Nahavandi, R. (2021). A critical review on marine serine protease and its inhibitors: A new wave of drugs? *International Journal of Biological Macromolecules*, 170, 674–687. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.134>
- Bayne, B. L., Bayne, C. J., Carefoot, T. C., & Thompson, R. J. (1976). The physiological ecology of *Mytilus californianus* Conrad - 1. Metabolism and energy balance. *Oecologia*, 22(3), 211–228. <https://doi.org/10.1007/BF00344793>
- Bohdziewicz, J. (1996). Ultrafiltration of technical amylolytic enzymes. *Process Biochemistry*, 31(2), 185–191. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(95\)00047-x](https://doi.org/10.1016/0032-9592(95)00047-x)
- Bökle, B., Galunsky, B., & Müller, R. (1995). Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10), 3705–3710. <https://doi.org/10.1128/aem.61.10.3705-3710.1995>

- Bozinovic, Goran, Damian Shea, Zuying Feng, David Hinton, Tim Sit, and Marjorie F. Oleksiak. 2021. "PAH-Pollution Effects on Sensitive and Resistant Embryos: Integrating Structure and Function with Gene Expression." *PLoS ONE* 16(4 April). doi: 10.1371/journal.pone.0249432
- Braia, M., Loureiro, D., Tubio, G., Lienqueo, M. E., & Romanini, D. (2017). Interaction between trypsin and alginate: An ITC and DLS approach to the formation of insoluble complexes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 155, 507–511. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.04.033>
- Chauhan, J. V., Mathukiya, R. P., Singh, S. P., & Gohel, S. D. (2021). Two steps purification, biochemical characterization, thermodynamics and structure elucidation of thermostable alkaline serine protease from *Nocardiosis alba* strain OM-5. *International Journal of Biological Macromolecules*, 169, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.061>
- Connor, K. M., Sung, A., Garcia, N. S., Gracey, A. Y., & German, D. P. (2016). Modulation of digestive physiology and biochemistry in *Mytilus californianus* in response to feeding level acclimation and microhabitat. *Biology Open*, 5(9), 1200–1210. <https://doi.org/10.1242/bio.019430>
- Chen, Y. C., and B. H. Chen. 2001. Stability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons during Heating. Vol. 9.
- Chimjarn, Supansa, Olivier Delhomme, and Maurice Millet. 2021. "Temporal Distribution and Gas/Particle Partitioning of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Atmosphere of Strasbourg, France." *Atmosphere* 12(3). doi: 10.3390/atmos12030337.
- De Ugarte, D. A., Alfonso, Z., Zuk, P. A., Elbarbary, A., Zhu, M., Ashjian, P., ... Fraser, J. K. (2003). Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunology Letters*, 89(2–3), 267–270. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(03\)00108-1](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(03)00108-1)

- den Besten, P.J., H.J. Herwig, E.g. van Donse, and D.R. Livingstone. 1990. Cytochrome P-450 Monooxygenase System and Benzo(a)Pyrene Metabolism in Echinoderms. Vol. 107.
- Duan, Jun, Wen Liu, Xiao Zhao, Yuling Han, S. E. O'Reilly, and Dongye Zhao. 2018. "Study of Residual Oil in Bay Jimmy Sediment 5 Years after the Deepwater Horizon Oil Spill: Persistence of Sediment Retained Oil Hydrocarbons and Effect of Dispersants on Desorption." *Science of the Total Environment* 618:1244–53. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.09.234.
- El-Shanshoury, A. E. R. R., El-Sayed, M. A., Sammour, R. H., & El-Shouny, W. A. (1995). Purification and partial characterization of two extracellular alkaline proteases from *Streptomyces corchorusii* ST36. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(1), 99–104. <https://doi.org/10.1139/m95-013>
- Elgendy, A. S., & Abdelrasool, M. K. A Literature Review on Trypsin Enzyme (2016). Qatar.
- Ellaiah, P., Srinivasulu, B., & Adinarayana, K. (2002). A review on microbial alkaline proteases. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 61(9), 690–704.
- Flores Ramos, L., & Ruiz Soto, A. (2017). Implementación de una metodología analítica para la cuantificación de proteínas en la microalga *Arthrospira platensis*. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 83(4), 371–381. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v83i4.219>
- García-Segura, David, Isis Maviel Castillo-Murrieta, Froylán Martínez-Rabelo, Antonio Gomez-Anaya, Jacobo Rodríguez-Campos, Benito Hernández-Castellanos, Silvia M. Contreras-Ramos, and Isabelle Barois. 2018. "Macrofauna and Mesofauna from Soil Contaminated by Oil Extraction." *Geoderma* 332:180–89. doi: 10.1016/j.geoderma.2017.06.013.
- Gassman, N. J., and C. J. Kennedy. 1992. Cytochrome P-450 Content and Xenobiotic Metabolizing Enzyme Activities In The Scleractinian Coral, *Favia Fragum*(Esper).

Vol. 50.

Gioia, M., Ciaccio, C., Calligari, P., De Simone, G., Sbardella, D., Tundo, G., ... Coletta, M. (2020). Role of proteolytic enzymes in the COVID-19 infection and promising therapeutic approaches. *Biochemical Pharmacology*, 182, 114225. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114225>

Gómez-Gutiérrez, Claudia Mariana, and Graciela Guerra-Rivas. 2010. "Uptake and Biochemical Response to B[a]P in the Sea Anemone *Anthopleura Elegantissima*." Pp. 42–48 in *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*. Vol. 45.

Haddar, A., Agrebi, R., Bougatef, A., Hmidet, N., Sellami-Kamoun, A., & Nasri, M. (2009). Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *Bioresource Technology*, 100(13), 3366–3373. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.061>

Hammami, A., Fakhfakh, N., Abdelhedi, O., Nasri, M., & Bayoudh, A. (2018). Proteolytic and amylolytic enzymes from a newly isolated *Bacillus mojavensis* SA: Characterization and applications as laundry detergent additive and in leather processing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 56–68. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.148>

Han, J., Park, C. H., & Ruan, R. (1995). Concentrating alkaline serine protease, subtilisin, using a temperature-sensitive hydrogel. *Biotechnology Letters*, 17(8), 851–852. <https://doi.org/10.1007/BF00129016>

Harmsen, Joop, and René P. J. J. Rietra. 2018. "25 Years Monitoring of PAHs and Petroleum Hydrocarbons Biodegradation in Soil." *Chemosphere* 207:229–38. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.05.043.

Heffernan, L. M., M. H. Mayeaux, M. Vasquez, and G. W. Winston. 1998. "In Vitro Xenobiotic Metabolism by Sea Anemone Microsomes." *Marine Environmental*

Research 46(1–5):534–35. doi: 10.1016/s0141-1136(98)00090-7.

Heffernan, Linda M., and Gary W. Winston. 1998. Spectral Analysis and Catalytic Activities of the Microsomal Mixed-Function Oxidase System of the Sea Anemone (Phylum: Cnidaria) 1. Vol. 121.

Höfte, H., & Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, 53(2), 242–255. <https://doi.org/10.1016/j.ipm.2005.03.026>

Homaei, A., Lavajoo, F., & Sariri, R. (2016). Development of marine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 542–552. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.023>

Ibrahim, A. S. S., Elbadawi, Y. B., El-Toni, A. M., Almaary, K. S., El-Tayeb, M. A., Elagib, A. A., & Maany, D. A. F. (2021). Stabilization and improved properties of *Salipaludibacillus agaradhaerens* alkaline protease by immobilization onto double mesoporous core-shell nanospheres. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 557–566. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.213>

Jørgensen, Anne, Anders M. B. Giessing, Lene Juel Rasmussen, and Ole Andersen. 2008. “Biotransformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Marine Polychaetes.” *Marine Environmental Research* 65(2):171–86. doi: 10.1016/j.marenvres.2007.10.001.

Khan, M. A. Q., A. Kamal, R. J. Wolin, and J. Runnels. n.d. In Vivo and In Vitro Epoxidation of Aldrin by Aquatic Food Chain Organisms.

Klein, T., Eckhard, U., Dufour, A., Solis, N., & Overall, C. M. (2018). Proteolytic Cleavage - Mechanisms, Function, and “omic” Approaches for a Near-Ubiquitous Posttranslational Modification. *Chemical Reviews*, 118(3), 1137–1168. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00120>

Kudryashov, L. S., Uzakov, Y. M., Tikhonov, S. L., Tikhonova, N. V., & Diachkova, A. V. (2020). Microencapsulation of proteolytic enzymes for industrial application. *News of*

the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, Series of Geology and Technical Sciences, 3(441), 161–169. <https://doi.org/10.32014/2020.2518-170X.67>

Kumar, A., Prerna, Bilal, M., Singh, A. K., Ratna, S., Talluri Rameshwari, K. R., ... Iqbal, H. M. N. (2022). Enzyme cocktail: a greener approach for biobleaching in paper and pulp industry. In S. S. Rajeev Bhat, Tuan Anh Nguyen, Ashok Kumar (Ed.), *Nanotechnology in Paper and Wood Engineering* (pp. 303–328). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85835-9.00007-6>

Lakshmi, B. K. M., Muni Kumar, D., & Hemalatha, K. P. J. (2018). Purification and characterization of alkaline protease with novel properties from *Bacillus cereus* strain S8. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.05.009>

Lawson, M. Chase, Joshua A. Cullen, Clifton C. Nunnally, Gilbert T. Rowe, and David N. Hala. 2021. “PAH and PCB Body-Burdens in Epibenthic Deep-Sea Invertebrates from the Northern Gulf of Mexico.” *Marine Pollution Bulletin* 162. doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111825.

Lee, Richard F., James Stolzenbach, Sara Singer, and K. R. Tenore. 1981. “Effects of Crude Oil on Growth and Mixed Function Oxygenase Activity in Polychaetes, *Nereis* Sp.” Pp. 323–34 in *Biological Monitoring of marine pollutants*. Vol. 1, edited by J. Vernberg, A. Calabrese, F. P. Thurberg, and W. B. Vernberg. New York: Academic Press, Inc.

Lee, F. H., Wan, S. Y., Foo, H. L., Loh, T. C., Mohamad, R., Rahim, R. A., & Idrus, Z. (2019). Comparative study of extracellular proteolytic, cellulolytic, and hemicellulolytic enzyme activities and biotransformation of palm kernel cake biomass by lactic acid bacteria isolated from Malaysian foods. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 4979. <https://doi.org/10.3390/ijms20204979>

Liu, Li Lian, Chen Yun Hsieh, Meng Ying Kuo, Chienhsun Chen, Yen Hong Shau, Hon Kit Lui, Chung Shin Yuan, and Chen Tung Arthur Chen. 2020. “Evidence for Fossil

- Fuel PM1 Accumulation in Marine Biota.” *Environmental Science and Technology* 54(7):4068–78. doi: 10.1021/acs.est.9b06976.
- Livingstone, D. R. 2001. “Contaminant-Stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms.” *Marine Pollution Bulletin* 42(8):656–66.
- Livingstone, David R., Michael N. Moore, David M. Lowe, Cristina Nasci, and Suzanne v Farrar. 1985. Responses Of The Cytochrome P-450 Monooxygenase System To Diesel Oil in the Common Mussel, *Mytilus Edulis* L., and the Periwinkle, *Littorina Littorea* L. Vol. 7.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12 II), 7634–7638. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>
- Medve, J., Lee, D., & Tjerneld, F. (1998). Ion-exchange chromatographic purification and quantitative analysis of *Trichoderma reesei* cellulases cellobiohydrolase I, II and endoglucanase II by fast protein liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 808(1–2), 153–165. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00132-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00132-0)
- Mitchelmore, Carys L., Claudia Birmelin, J. Kevin Chipman, and David R. Livingstone. 1998. AOUATIC TgxlcgLgGY Evidence for Cytochrome P-450 Catalysis and Free Radical Involvement in the Production of DNA Strand Breaks by Benzo[a]Pyrene and Nitroaromatics in Mussel (*Mytilus Edulis* L.) Digestive Gland Cells. Vol. 41.
- Mirzaei, M., Pushpitha, K., Deng, L., Chitranshi, N., Gupta, V., Rajput, R., ... Gupta, V. K. (2019). Upregulation of Proteolytic Pathways and Altered Protein Biosynthesis Underlie Retinal Pathology in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Molecular*

Neurobiology, 56(9), 6017–6034. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1479-4>

Moorthy, Bhagavatula, Chun Chu, and Danielle J. Carlin. 2015. “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: From Metabolism to Lung Cancer.” *Toxicological Sciences* 145(1):5–15.

Mótyán, J., Tóth, F., & Tózsér, J. (2013). Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules*, 3(4), 923–942. <https://doi.org/10.3390/biom3040923>

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 2336, Benzo[a]pyrene. Retrieved June 14, 2022 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzo_a_pyrene.

Neurath, H. (1999). Proteolytic enzymes, past and future. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 10962–10963. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.10962>

Northrop, J. H., Kunitz, M., & Herriott, R. M. (1948). *Crystalline enzymes*. *Crystalline enzymes* (2nd Editio). London: Geoffrey Cumberledge: New York: Columbia University Press.

Ong, P. S., & Gaucher, G. M. (1976). Production, purification and characterization of thermomycolase, the extracellular serine protease of the thermophilic fungus *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea*. *Canadian Journal of Microbiology*, 22(2), 165–176. <https://doi.org/10.1139/m76-023>

Overmans, Sebastian, Mikaela Nordborg, Rubén Díaz-Rúa, Diane L. Brinkman, Andrew P. Negri, and Susana Agustí. 2018. “Phototoxic Effects of PAH and UVA Exposure on Molecular Responses and Developmental Success in Coral Larvae.” *Aquatic Toxicology* 198:165–74. doi: 10.1016/j.aquatox.2018.03.008.

Pan, D. D., Wu, Z., Liu, J., Cao, X. Y., & Zeng, X. Q. (2013). Immunomodulatory and hypoallergenic properties of milk protein hydrolysates in ICR mice. *Journal of Dairy Science*, 96(8), 4958–4964. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6758>

- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597–635. <https://doi.org/10.1128/mnbr.62.3.597-635.1998>
- Rawlings, N. D. (2013). Protease families, evolution and mechanism of action. In *Proteases: Structure and Function* (pp. 1–36). Springer-Verlag Wien. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0885-7_1
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2010). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 38(suppl_1), D227–D233.
- Rewitz, Kim, Bjarne Styris, and Ole Andersen. 2003. "CYP330A1 and CYP4C39 Enzymes in the Shore Crab *Carcinus Maenas*: Sequence and Expression Regulation by Ecdysteroids and Xenobiotics." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310(2):252–60. doi: 10.1016/J.BBRC.2003.09.063.
- Risk Information System, Integrated. 2017. Toxicological Review of Benzo[a]Pyrene (Final Report).
- Sara, G. L., & Marcela, V. A. (2014). Desventajas de la introducción de la leche de vaca en el primer años de vida. *Acta Pediátrica de México*, 31(3), 123. <https://doi.org/10.18233/apm31no3pp123-128>
- Sharma, K. M., Kumar, R., Panwar, S., & Kumar, A. (2017). Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.02.001>
- Sharma, M., Gat, Y., Arya, S., Kumar, V., Panghal, A., & Kumar, A. (2019). A review on microbial alkaline protease: An essential tool for various industrial approaches. *Industrial Biotechnology*, 15(2), 69–78. <https://doi.org/10.1089/ind.2018.0032>
- Shevchenko, L. S., Luk'yanov, P. A., & Mikhailov, V. V. (1995). Elastolytic activity of a marine isolate of *Bacillus Pumilus*. *Microbiology*, 64(5), 547–549.

- Sinha, R., Singh, S. P., Ahmed, S., & Garg, S. K. (1996). Partitioning of a bacillus alkaline protease in aqueous two-phase systems. *Bioresource Technology*, 55(2), 163–166. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(95\)00192-1](https://doi.org/10.1016/0960-8524(95)00192-1)
- Singh, Delezia Shivani, Mary Alkins-Koo, Luke Victor Rostant, and Azad Mohammed. 2021. "Sublethal Effects of Malathion Insecticide on Growth of the Freshwater Crab *Poppiana Dentata* (Randall, 1840) (Decapoda: Trichodactylidae)." *Nauplius* 29. doi: 10.1590/2358-2936e2021030.
- Solé, Montserrat, and David R. Livingstone. 2005. "Components of the Cytochrome P450-Dependent Monooxygenase System and 'NADPH-Independent Benzo[a]Pyrene Hydroxylase' Activity in a Wide Range of Marine Invertebrate Species." *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 141(1):20–31. doi: 10.1016/j.cca.2005.04.008.
- Stegeman, J. J., and R. L. Binder. 1979. "High Benzo[a]Pyrene Hydroxylase Activity in the Marine Fish *Stenotomus Versicolor*." *Biochemical Pharmacology* 28(10):1686–88.
- Stegeman, John J., and Heid1 B. Kaplan. 1981. MIXED-FUNCTION OXYGENASE ACTIVITY AND BENZO[a]PYRENE METABOLISM IN THE BARNACLE *BALANUS EBURNEUS* (CRUSTACEA" CIRRIPIEDIA). Vol. 68.
- <https://doi.org/10.1093/NAR/GKP971>
- Sumantha, A., Larroche, C., & Pandey, A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 211–220.
- Trincone, A. (2011). Marine biocatalysts: Enzymatic features and applications. *Marine Drugs*, 9(4), 478–499. <https://doi.org/10.3390/md9040478>
- Vakhlu, J., & Kour, A. (2006). Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(1), 69–85. <https://doi.org/10.2225/vol9-issue1-fulltext-9>

- Van Weel, P. B. (1974). Hepatopancreas? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 47(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(74\)90044-9](https://doi.org/10.1016/0300-9629(74)90044-9)
- Winston, Gary W., Maxwell H. Mayeaux, and Linda M. Heffernan. 1998. Benzo(a)Pyrene Metabolism by the Intertidal Sea Anemone, *Bunodosoma Cavernata*. Vol. 45.
- Wolska, Lidia, Agata Mechlińska, Justyna Rogowska, and Jacek Namieśnik. 2012. “Sources and Fate of PAHs and PCBs in the Marine Environment.” *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 42(11):1172–89.
- Xiang-hua, C. (2012). Study on the Extraction of Soluble Nitrogenous Compounds of Mushrooms with Trypsin. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 24, 114.
- Yun, G. H., Lee, E. T., & Kim, S. D. (2003). Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus amyloliquefaciens* K42 isolated from Korean soy sauce. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(3), 284–291.
- Zar Jerrold H. 2019. *Biostatistical Analysis*. 5th ed. New Jersey: Pearson Education, Inc.
- Zhang, Baiyu, Ethan J. Matchinski, Bing Chen, Xudong Ye, Liang Jing, and Kenneth Lee. 2018. “Marine Oil Spills-Oil Pollution, Sources and Effects.” Pp. 391–406 in *World Seas: An Environmental Evaluation Volume III: Ecological Issues and Environmental Impacts*. Elsevier.