



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE UNA CELULASA ENDÓGENA  
DEL ABULÓN ROJO (*Haliotis rufescens*)**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**Maestro en Ciencias**

PRESENTA:  
**Luis Joshua Hernández Benítez**

TUTOR PRINCIPAL

**Dra. Adela Rodríguez Romero**  
Instituto de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dr. Alfredo Torres Larios**  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

**Dr. Rogelio Rodríguez Sotres**  
Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México, noviembre, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**Hernández Benítez Luis Joshua**  
**Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas**  
**Presente**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión extraordinaria del día **08 de octubre** del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Estudio de las propiedades de una celulasa endógena del abulón rojo (Haliothis rufescens)**", dirigida por el/la Dr(a). **Adela Rodríguez Romero**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Rosario Muñoz Clares
VOCAL	José Federico del Río Portilla
VOCAL	Ismael Bustos Jaimés
VOCAL	María Eugenia Hidalgo Lara
SECRETARIO	Enrique García Hernández

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarte un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 08 de octubre de 2020  
Coordinadora



**Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez**



Este trabajo se desarrolló en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la supervisión de la Dra. Adela Rodríguez Romero. Durante la realización de esta investigación se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica IN-208418. El sustentante recibió la beca 927348 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Se reconoce el apoyo técnico de M en C. Lucero Ríos Ruiz, Dra. Annia Rodríguez Hernández y Dra. Patricia Cano Sánchez. Se agrade al LANEM-IQ por su infraestructura.

A mi mamá...

Por el apoyo incondicional

Derivado de esta investigación se concibió el manuscrito:

**“A trimeric glycosylated GH45 cellulase from the red abalone (*Haliotis rufescens*) exhibits endo and exoactivity”**

L. Joshua Hernández-Benítez, Alejandra Hernández-Santoyo and Adela Rodríguez-Romero

El cual continúa en preparación para su publicación en *FEBS Letters*.

## RESUMEN

El abulón rojo (*Haliotis rufescens*) representa la especie más importante para la acuicultura en América del Norte. Aunque su hepatopáncreas es rico en celulasas y otras enzimas que degradan polisacáridos, sus sistemas celulolíticos están poco explorados. En este trabajo se informa el aislamiento y caracterización de una endoglucanasa endógena glicosilada de *H. rufescens*. Esta celulasa, nombrada HrGH45, mostró una masa molecular de 23.4 kDa, determinada por espectrometría de masas MALDI-TOF. Además, su pureza se corroboró por cromatografía de fase reversa C<sub>18</sub> porque exhibió un comportamiento electroforético anómalo durante SDS-PAGE. La detección de motivos de carbohidratos en gel SDS-PAGE, empleando la tinción del ácido periódico-reactivo de Schiff, confirmó que HrGH45 es una glicoproteína. HrGH45 se comportó como un homotrímero, según lo observado por cromatografía de filtración en gel y zimogramas. La máxima actividad enzimática sobre 0.5 % (*p/v*) carboximetilcelulosa, a 45 °C y pH 6.0, fue de  $53.9 \pm 1.0$  U/mg. La hidrólisis sobre celo-oligosacáridos y *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosidos confirmó la multiespecificidad de la celulasa purificada. En los ensayos de desplazamiento térmico basados en fluorescencia se encontró que su temperatura de fusión es de 46.5 °C en 50 mM acetato de sodio pH 6.0. Los experimentos de dicroísmo circular en la región del UV-lejano revelaron que HrGH45 es una proteína rica en hojas  $\beta$ . Además, los estudios de identificación por huella peptídica arrojaron la secuencia de una proteína madura de 177 aminoácidos con una masa molecular teórica de 19.1 kDa, misma que pertenece a la familia 45 de las glicosil-hidrolasas. Tomados en conjunto, estos hallazgos proporcionarán la base para la sobreexpresión de esta biomacromolécula.

## ABSTRACT

The red abalone (*Haliotis rufescens*) represents the most important aquaculture species in North America. Although its hepatopancreas is rich in cellulases and other polysaccharide-degrading enzymes, its cellulolytic systems are poorly explored. This work describes the isolation and characterization of an endogenous glycosylated endoglucanase from *H. rufescens*. This cellulase, named HrGH45, showed a molecular mass of 23.4 kDa, as determined by MALDI-TOF mass spectrometry. Its purity was corroborated by C<sub>18</sub>-reversed-phase HPLC because it exhibited an anomalous electrophoretic behavior on SDS-PAGE. According to the periodic acid-Schiff reagent staining, detection of sugar moieties in SDS-PAGE gel confirmed that HrGH45 is a glycoprotein. HrGH45 behaved as a homotrimer, as observed by gel filtration chromatography and zymograms. A maximum enzyme activity on 0.5 % (w/v) carboxymethylcellulose of  $53.9 \pm 1.0$  U/mg was achieved at 45 °C and pH 6.0. The hydrolysis of cello-oligosaccharides and *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranosides confirmed the abalone cellulase multispecificity. Fluorescent-based thermal shift assays indicated a melting temperature value of 46.5 °C in 50 mM sodium acetate buffer pH 6.0. Far-UV circular dichroism experiments revealed that HrGH45 is a  $\beta$ -sheet rich protein. Peptide mass fingerprinting studies yielded the sequence of a 177-residue mature protein with a theoretical molecular mass of 19.1 kDa, which was classified into the glycosyl-hydrolase family 45. These findings will provide the basis for this enzyme's over-expression and subsequent studies of its physiological role.

# C O N T E N I D O

	Resumen	<i>vi</i>
	Abstract	<i>vii</i>
<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
	Celulosa: estructura, accesibilidad y reactividad	1
	Las celulasas son glicosil-hidrolasas con versatilidad de estructura y función	3
	Estudios previos sobre celulasas de abulones ( <i>Haliotis</i> sp.)	7
	Propósito de la investigación	9
	Objetivos del presente trabajo	10
	Diseño experimental	11
<b>2</b>	<b>Métodos experimentales</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>22</b>
	Purificación	23
	HrGH45 es una glicoproteína y se comporta como un homotrímero	28
	HrGH45 exhibe endo/exoactividad y reconoce celopentaosa en regiones amorfas de celulosa	31
	Efecto del pH y temperatura sobre la actividad enzimática	34
	Estabilidad térmica	36
	Una celulasa rica en hojas $\beta$	37
	HrGH45 es una glicosil-hidrolasa de la familia 45	39
	Ensayos de cristalización	42
	Comentarios finales	43
<b>4</b>	<b>Conclusión y perspectiva</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>Anexos</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>Referencias</b>	<b>47</b>

## T A B L A S

Tabla 1.	Origen, familias y plegamiento tridimensional de las celulasas	6
Tabla 2.	Celulasas de <i>Haliotis</i> sp.	8
Tabla 3.	Resumen de purificación	27
Tabla 4.	Resumen del experimento de secuenciación	39

## F I G U R A S

Fig. 1.	Celulosa	2
Fig. 2.	Despolimerización de la celulosa	4
Fig. 3.	Purificación	24
Fig. 4.	Pureza	26
Fig. 5.	Detección de glicosilaciones	28
Fig. 6.	Determinación del estado oligomérico	30
Fig. 7.	Modo de unión y disposición de los residuos en el sitio activo	33
Fig. 8.	Efecto del pH y temperatura sobre la actividad enzimática	35
Fig. 9.	Estabilidad térmica	37
Fig. 10.	Estructura secundaria	38
Fig. 11.	HrGH45	41

## ABREVIACIONES

A	Absorbancia
Aprox.	Aproximadamente
CBH(s)	Celobiohidrolasa(s)
CBH I	Celobiohidrolasa tipo I
CBH II	Celobiohidrolasa tipo II
CBM	Módulo de unión a carbohidratos
CD	Dominio catalítico
CMC	Carboximetilcelulosa
DC	Dicroísmo circular
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EG(s)	Endoglucanasa(s)
G1	Glucosa
G2	Celobiosa
G3	Celotriosa
G4	Celotetraosa
G5	Celopentaosa
GH(s)	Glicosil-hidrolasa(s)
GH9	Familia 9 de las glicosil-hidrolasas
GH45	Familia 45 de las glicosil-hidrolasas
MM	Masa molecular
<i>p</i> NPC	<i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-celobiósido
<i>p</i> NPG	<i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusión
TSA	Ensayo de desplazamiento térmico basado en fluorescencia
$\beta$ G(s)	$\beta$ -Glucosidasa(s)

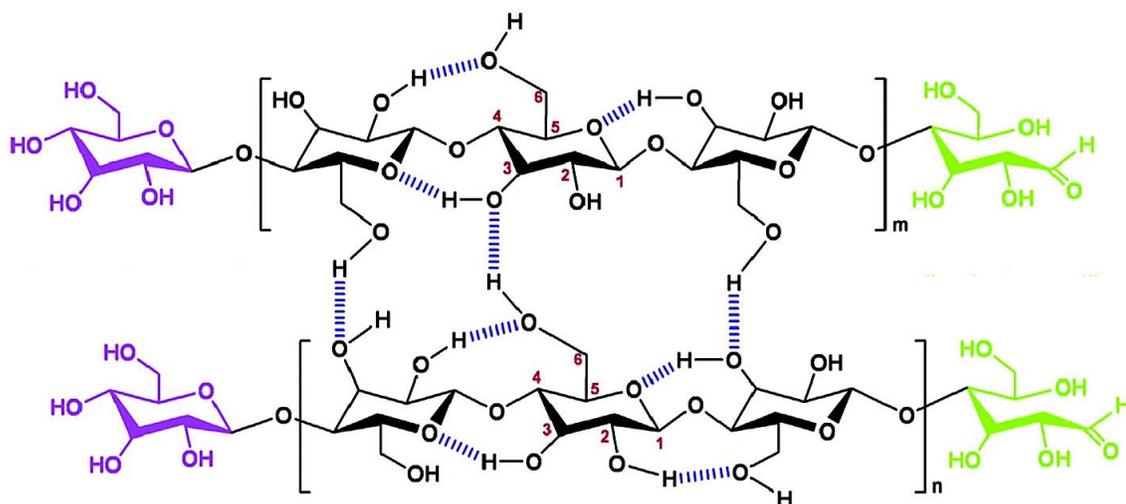
# INTRODUCCIÓN

*“J'ai appris que la voie du progrès n'était ni rapide ni facile...”*

**Marie Curie**

## *Celulosa: estructura, accesibilidad y reactividad*

La celulosa es el homopolisacárido estructural más abundante en la biosfera. Se compone de unidades repetitivas de anhidro- $\beta$ -D-glucosa ((C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub>;  $n = 10,000$  a  $15,000$  dependiendo de la fuente) unidas por enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos y representa un suministro abundante de energía para cualquier organismo que tenga la capacidad de asimilarla [1]. Dada su prevalencia natural, así como su atractiva utilidad como precursor de biocombustibles y otros productos químicos y materiales, su estudio es vasto y diverso. Independientemente de su origen, cada cadena de celulosa es químicamente asimétrica y adquiere una conformación similar a una cinta plana [2,3], Un extremo tiene funcionalidad reductora (carbono anomérico C1 en equilibrio estructural hemiacetal-aldehído) y el otro es de carácter no reductor (carbono C4 con hidroxilo libre) [4], Fig. 1.



**Fig. 1.**

**Celulosa.** Representación esquemática de la celulosa con el monómero de anhidro- $\beta$ -D-glucosa en conformación de silla, numerado y unidos por enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos. En morado se representa el extremo no reductor y en verde el reductor; en este último tiene lugar el equilibrio hemiacetal-aldehído. En azul se muestran las interacciones de hidrógeno que se establecen de manera intracadena (intramoleculares) e intercadena (intermoleculares). Adaptado de [5].

Los puentes de hidrógeno intramoleculares estabilizan al enlace  $\beta$ -1,4-glicosídico y resultan en una conformación lineal [2]. Interacciones intermoleculares (fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno) promueven el apilamiento paralelo de múltiples cadenas de celulosa, formando así microfibrillas elementales que posteriormente se agregan en fibrillas de mayor tamaño (5-50 nm de diámetro y de varios micrómetros de longitud) [5]. Dentro de las fibrillas de celulosa hay regiones donde las cadenas están dispuestas en una estructura altamente ordenada (*celulosa cristalina*); asimismo, existen regiones con fibrillas desordenadas o agregadas (*celulosa amorfa*) [2]. Si la hidrólisis de la celulosa ocurre en la superficie de las agregaciones, el área superficial disponible es un determinante de la velocidad máxima de degradación. Se ha propuesto que las regiones de celulosa estrechamente empaquetadas son el principal factor que contribuye a la resistencia de este polisacárido a la hidrólisis enzimática [6].

### ***Las celulasas son glicosil-hidrolasas con versatilidad de estructura y función***

Las enzimas que degradan celulosa se denominan colectivamente como *celulasas*. La hidrólisis completa de este polisacárido requiere una colección de tres tipos de celulasas; endoglucanasas, celobiohidrolasas y  $\beta$ -glucosidasas, mismas que actúan en un sistema secuencial y sinérgico. El mecanismo enzimático propuesto para la despolimerización de la celulosa se indica en la Fig. 2.

#### *Endoglucanasas (endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa, EC 3.2.1.4)*

Las endoglucanasas (EGs) hidrolizan de forma aleatoria los enlaces  $\beta$  en regiones amorfas de celulosa, provocando así una rápida disminución en la longitud de la cadena con un incremento lento de los grupos reductores [7]. Suelen ser enzimas monoméricas en solución con una masa molecular (MM) que oscila entre 20 y 70 kDa. Además, pueden estar decoradas con sacáridos estructurales (1-20 % glicosilaciones) y tienen máxima actividad enzimática a pH ácido y temperatura entre 35 y 70 °C [8].

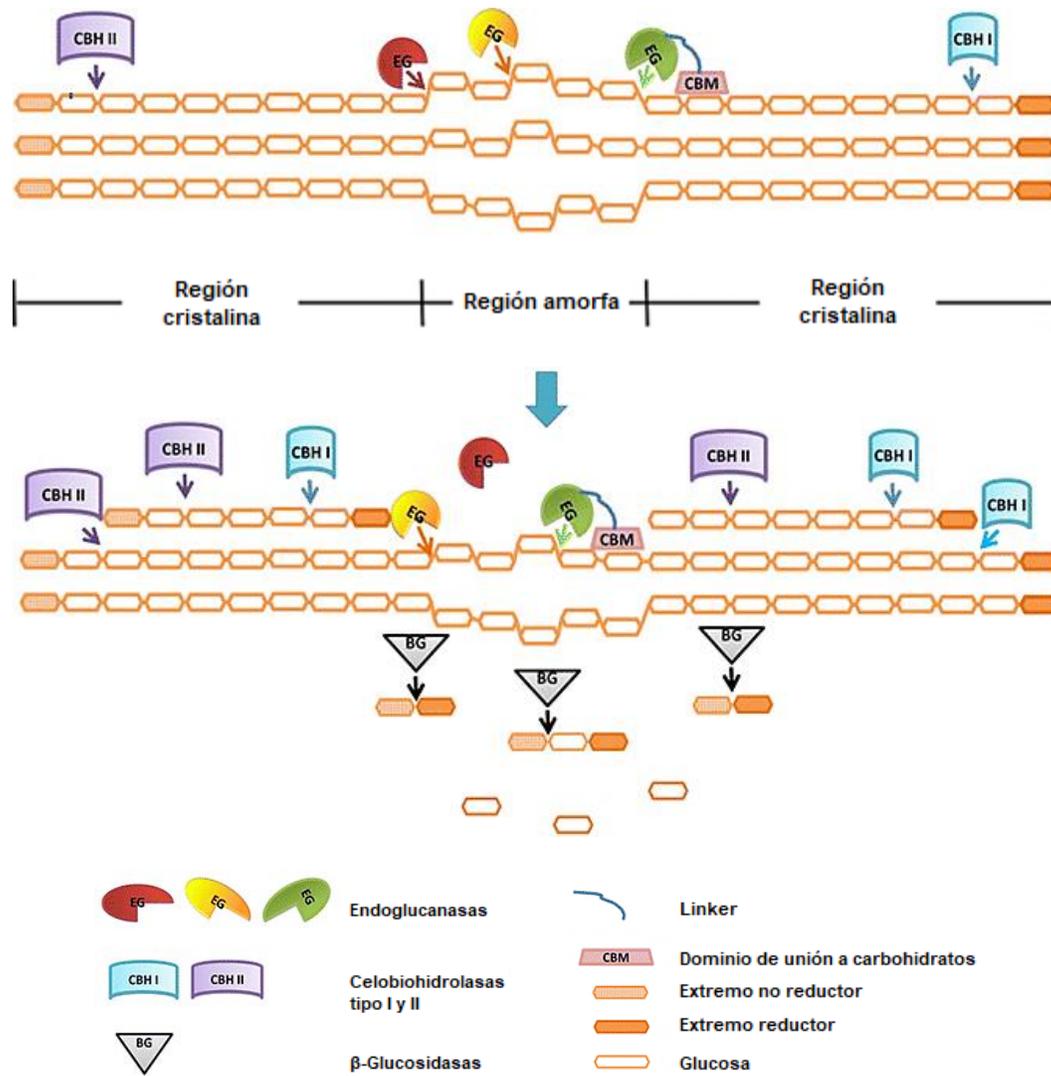
#### *Celobiohidrolasas (exo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa)*

Las celobiohidrolasas tipo II (CBHs II, EC 3.2.1.91) escinden unidades de celobiosa a partir del extremo no reductor de la cadena de celulosa, mientras que las celobiohidrolasas tipo I (CBHs I, EC 3.2.1.176) lo hacen a partir del extremo reductor [7]. Las CBHs son proteínas monoméricas cuya MM varía entre 50 y 75 kDa, pueden presentar glicosilaciones (< 10 %) y generalmente su máxima actividad de hidrólisis es a pH ácido y temperatura de 37-60 °C [8].

#### *$\beta$ -Glucosidasas (1,4- $\beta$ -D-glucosidasa, EC 3.2.1.21)*

Las  $\beta$ -glucosidasas ( $\beta$ Gs) degradan celobiosa y celo-oligosacáridos a glucosa [7]. Son las celulasas más versátiles, ya que presentan MM entre 35 y 640 kDa y pueden ser monómeros u homo-oligómeros en solución. Además, la mayoría de las  $\beta$ Gs son glicosiladas y en algunos casos el porcentaje de glicosilaciones puede llegar a ser del 90 %. De manera general, los máximos de actividad son pH 3.5-5.5 y temperatura 45-75 °C [8].

Además del desafío de la purificación de las celulasas, está la determinación de su especificidad sobre múltiples sustratos. Muchas de las celulasas que han sido reportadas hasta ahora son activas sobre una gran variedad de sustratos además de celulosa; *e.g.*, xilano, liquenano y manano [9].



**Fig. 2.** **Despolimerización de la celulosa.** Mecanismo enzimático propuesto para la degradación de celulosa a glucosa. Nótese la participación secuencial y sinérgica de los tres tipos de celulasas. Adaptado de [10].

Las celulasas son producidas principalmente por hongos y bacterias. No obstante, también se encuentran en arqueas, plantas y animales invertebrados herbívoros terrestres y acuáticos [11]. El dogma tradicional de la asimilación de celulosa en metazoarios llevó a los investigadores a centrarse en el estudio de celulasas provenientes de microorganismos. De cualquier forma, múltiples informes bioquímicos y genómicos han demostrado la existencia de sistemas celulolíticos endógenos en animales, particularmente en invertebrados herbívoros [12]. Por lo que estas especies representan una enorme fuente de nuevas y diversas celulasas potencialmente activas.

En vista de que la celulosa es insoluble, las celulasas tienen que difundir hacia el sustrato y unir y mover el segmento del polisacárido a sus sitios activos. Por esta razón, la mayoría de las celulasas son proteínas modulares que consisten de un dominio catalítico discreto usualmente asociado con uno o más módulos de unión a carbohidratos (*carbohydrate-binding modules*, CBMs) enlazados entre sí por conectores flexibles [13].

El dominio catalítico tiene distintos arreglos tridimensionales; en forma de túnel para una exodegradación (como en las CBHs) o en forma de hendidura para una endodegradación (como en las EGs). Algunas celulasas tienen sitios activos intermedios entre los túneles cerrados de las CBHs y las hendiduras abiertas de las EGs, lo que les provee amplia especificidad sobre múltiples sustratos [14]. El dominio catalítico generalmente es *N*-glicosilado y es el responsable de la escisión del enlace glicosídico, mismo que se produce a través de un mecanismo de catálisis covalente. Por su parte, los CBMs permiten una asociación íntima y prolongada de la enzima con el sustrato, lo que facilita la hidrólisis y aumenta la rapidez de la catálisis. Generalmente, los CBMs son *O*-glicosilados, existen como un dominio simple, doble o triple en una celulasa y su ubicación puede ser tanto *N*- como *C*-terminal. Finalmente, el conector es una secuencia polipeptídica que une al dominio catalítico con el(los) CBM(s) y funge como una bisagra flexible. Su composición es rica en Pro, Thr y Ser; los últimos dos aminoácidos están altamente *O*-glicosilados para protegerse de proteólisis [8]. Aunque se han descrito muchas celulasas multimodulares formadas por un dominio catalítico y uno o varios CBMs, también se ha encontrado una vasta y diversa cantidad de celulasas cuyas estructuras comprenden únicamente el dominio catalítico. Ejemplos se pueden encontrar en [7], [13] y [14]. Es probable que existan razones fisiológicas y evolutivas para explicar la carencia de los CBMs en algunas celulasas. De cualquier forma, el verdadero significado aún es oscuro.

Hace treinta años, las celulasas se clasificaron en varias familias de glicosil-hidrolasas (GHs) según su similitud en la secuencia de aminoácidos del dominio catalítico [15]. Tiempo después, el sistema de clasificación, ahora basado en similitudes de secuencia y de estructura, reclasificó a las celulasas en diversas familias y clanes [16]. Tal clasificación se encuentra disponible en la base de datos CAZy. De las 169 familias de GHs, las celulasas se agrupan en dieciocho de ellas (1, 3, 5-10, 12, 30, 39, 44, 45, 48, 51, 74, 116 y 124). Algunas familias (*e.g.*, 5, 6, 7, 9 y 48) comprenden enzimas con actividades y modos de acción completamente diferentes, otras (*e.g.*, 1 y 3) contienen una gran cantidad de ejemplares (> 30 000) con esencialmente la misma actividad. Las celulasas que pertenecen a la familia 9 de las GHs parecen ser de naturaleza más generalizada y están mejor caracterizadas. Las EGs producidas por animales invertebrados se inscriben en cinco familias de GHs (5, 6, 9, 10 y 45). Entre ellas, las EGs de la familia 45 se caracterizan por su bajo peso molecular y su amplia especificidad sobre múltiples sustratos. La Tabla 1 resume lo antes descrito.

**Tabla 1.**  
**Origen, familias y plegamiento tridimensional de las celulasas.** Adaptado de [7], [12] y base de datos CAZy.

GH	Tipo de celulasa	Bacteria	Archaea	Eukarya			Nu / B	Plegamiento
				Fungi	Plantae	Animalia		
1	βG	+	+	+	+	+	Glu / Glu	(β/α) <sub>8</sub>
3	βG	+	+	+	+	+	Asp / Glu	ND
5	EG, CBH II, βG	+	+	+	+	+	Glu / Glu	(β/α) <sub>8</sub>
6	EG, CBH II	+	-	+	-	+	Asp / Asp	ND
7	EG, CBH I	+	-	+	-	+	Glu / Glu	β-jelly roll
8	EG	+	-	+	-	+	Asp / Glu	(α/α) <sub>6</sub>
9	EG, CBH II, βG	+	+	+	+	+	Asp / Glu	(α/α) <sub>6</sub>
10	EG	+	+	+	+	+	Glu / Glu	(β/α) <sub>8</sub>
12	EG	+	+	+	+	+	Glu / Glu	β-jelly roll
30	βG	+	-	+	-	+	Glu / Glu	(β/α) <sub>8</sub>
39	βG	+	+	+	-	+	Glu / Glu	(β/α) <sub>8</sub>
44	EG	+	-	-	-	+	Glu / Glu	(β/α) <sub>8</sub>
45	EG	+	-	+	-	+	Asp / Asp	β <sub>6</sub> -barrel
48	EG, CBH I	+	-	+	-	+	ND / Glu	(α/α) <sub>6</sub>
51	EG	+	+	+	+	-	Glu / Glu	(β/α) <sub>8</sub>
74	EG	+	-	+	-	-	Asp / Asp	7-fold β-propeller
116	βG	+	+	-	+	+	Glu / Asp	(α/α) <sub>6</sub>
124	EG	+	-	-	-	-	ND	ND

**GH**, Familia de glicosil-hidrolasa; **Nu / B**, Nucleófilo / Base; **βG**, β-Glucosidasa; **CBH I**, Celobiohidrolasa tipo I; **CBH II**, Celobiohidrolasa tipo II; **EG**, Endoglucanasa; **ND**, No Determinado.

Los símbolos (+) y (-) indican la presencia o ausencia (respectivamente) de estas enzimas en los diferentes dominios de la vida.

## ESTUDIOS PREVIOS SOBRE CELULASAS DE ABULONES (*Haliotis* sp.)

Suzuki *et al.* lograron la purificación y caracterización de una celulasa a partir del hepatopáncreas de *Haliotis discus hannai* [17]. Dicha enzima presentó especificidad de endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa y una MM de 66 kDa. Experimentos de digestión e identificación por huella peptídica elucidaron su estructura primaria, la cual perteneció a la familia 9 de las GHs y exhibió una MM de 63.2 kDa. Resultados similares reportaron Rahman *et al.* con una celulasa de *Aplysia kurodai* [11] (gasterópodo evolutivamente relacionado con *Haliotis*). La enzima fue una endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa de 21 kDa que se clasificó como una GH45 y cuya cadena polipeptídica mostró una MM de 19.8 kDa. Ambos grupos concluyeron que la diferencia en MM de las celulasas nativas con respecto a sus secuencias aminoacídicas se debía a la presencia de modificaciones postraduccionales, en particular a *N*-glicosilaciones en el sequon N-X-T/S. Además, demostraron que estas enzimas eran productos génicos de los organismos estudiados ya que lograron identificar a los genes que las codificaban, refutando así la teoría largamente creída sobre el origen simbiote de las celulasas en gasterópodos marinos.

Por su parte, Tao *et al.* estudiaron otra celulasa presente en el hepatopáncreas de *H. discus hannai* [18]. Dicha enzima fue una endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa de 45 kDa. Después de los experimentos de digestión e identificación, los péptidos resultantes coincidieron con el dominio catalítico de la celulasa de *H. discus hannai* reportada, anteriormente, por Suzuki *et al.* La cobertura de la detección fue del 100 %. Se concluyó que se trataba de la misma endoglucanasa, sólo que la aislada por Suzuki era una proteína multimodular y la informada por Tao contenía únicamente el dominio catalítico. El significado fisiológico de esta versatilidad estructural en celulasas nativas de moluscos gasterópodos aún se desconoce.

Finalmente, Hernández-Santoyo *et al.* estudiaron el estado de asociación en solución de tres celulasas de *Haliotis fulgens* [19]. Encontraron que estas enzimas tendían a formar oligómeros de gran tamaño y que su actividad glicohidrolítica era mayor en estos estados multiméricos. Asimismo, observaron que las celulasas en su forma monomérica eran inactivas e inestables. La Tabla 2 resume algunas propiedades estructurales y funcionales de celulasas que se han purificado a partir del hepatopáncreas de diferentes especies del género *Haliotis*.

**Tabla 2.**  
**Celulasas de *Haliotis* sp.** Propiedades estructurales y funcionales.

Organismo	Propiedad					Referencia
	Estructural			Clasificación CAZy	Funcional	
	MM (kDa)	MPT	Estado de asociación		Especificidad	
<i>H. discus hannai</i>	66	Glicosilación	Monómero	GH9 (CD + CBM)	EG <sup>§</sup>	[17]
<i>H. discus hannai</i>	45	Glicosilación	Monómero	GH9 (CD)	EG	[18]
<i>H. fulgens</i>	17.9 22.5 30.3	Glicosilación	Multímeros	ND	EG EG + CBH <sup>†</sup> EG + CBH + $\beta$ G <sup>‡</sup>	[19]

**MM**, Masa molecular; **MPT**, Modificación postraduccional; **GH**, Familia de glicosil-hidrolasa; **CD**, Dominio catalítico; **CBM**, Módulo de unión a carbohidratos; **EG**, Endoglucanasa; **CBH**, Celobiohidrolasa;  **$\beta$ G**,  $\beta$ -Glucosidasa; **ND**, No Determinado.

Los ensayos de especificidad se realizaron empleando los sustratos §) carboximetilcelulosa, †) *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-celobiósido y ‡) *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranósido.

## PROPÓSITO DE LA INVESTIGACIÓN

El creciente interés en las micro y macroalgas marinas como fuente de biomasa para la producción de bioetanol ha aumentado la necesidad de nuevas celulasas más sofisticadas capaces de hidrolizar completamente los enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos en las moléculas de celulosa. De hecho, existen muy pocos informes en la literatura sobre el estudio de celulasas de moluscos marinos, por lo que estas especies representan una relevante fuente de nuevas y diversas celulasas potencialmente activas.

El abulón rojo (*Haliotis rufescens*) es el molusco gasterópodo más importante para la acuicultura en América del Norte. Su hepatopáncreas es rico en celulasas; sin embargo, durante su procesamiento industrial de enlatado las vísceras se remueven y descartan sin ningún esfuerzo de recuperación, por lo que es de interés estudiar dichas enzimas e investigar su aplicación. Además, debido a su importancia comercial se han realizado estudios ecológicos sobre este organismo, no así investigaciones bioquímicas.

## **OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO**

### **General**

Conocer algunos aspectos estructurales y funcionales de una enzima celulasa de *H. rufescens*, misma que hasta este momento no ha sido investigada.

### **Específicos**

※ Extraer y purificar a homogeneidad una celulasa de *H. rufescens* a partir de su hepatopáncreas.

※ Caracterizar algunas propiedades estructurales de la enzima.

Determinar la presencia de glicosilaciones.

Analizar su estado de asociación en solución.

Evaluar su estabilidad térmica.

Conocer su estructura primaria, secundaria y terciaria.

※ Caracterizar algunas propiedades funcionales de la celulasa.

Investigar su especificidad de sustrato.

Analizar el modo de unión y la disposición de los residuos en el sitio activo.

Evaluar el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

En el Esquema 1 se muestra la estrategia experimental empleada para lograr uno a uno los objetivos planteados en esta investigación. A continuación se describen los métodos experimentales.



**Esquema 1.** Estrategia experimental global.

## MÉTODOS EXPERIMENTALES

*“Science is curiosity, testing and experimenting...”*

**Venkatraman Ramakrishnan**

### ***Materiales***

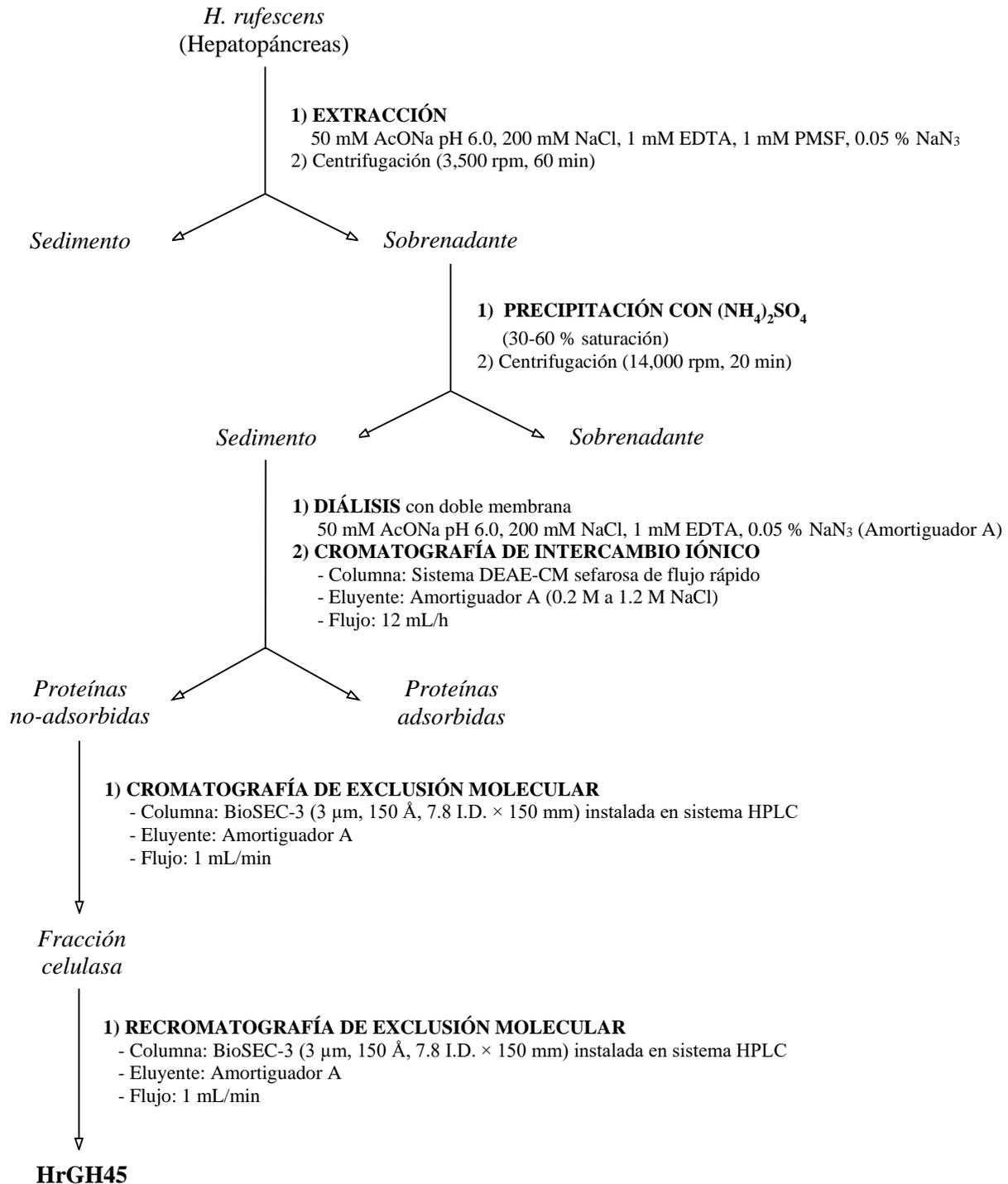
Abulones de la especie *H. rufescens* fueron cultivados en la costa de Ensenada, Baja California, México y se enviaron al Instituto de Química (UNAM) donde se mantuvieron a -55 °C hasta su uso. La clasificación taxonómica fue corroborada por la Dra. Martha Reguero Reza (Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM). Todos los reactivos y disolventes fueron de grado analítico, bioquímico o cromatográfico; se adquirieron de diferentes proveedores comerciales y se utilizaron sin purificación adicional.

### ***Purificación de HrGH45***

La purificación de la celulasa de *H. rufescens* se realizó según el procedimiento indicado en el Esquema 2. La enzima se nombró HrGH45. A continuación se detalla la estrategia empleada.

Todos los pasos de purificación se realizaron a 4 °C para evitar proteólisis y desnaturalización. El hepatopáncreas (aprox. 14 g) de un abulón se homogenizó mecánicamente utilizando un homogeneizador de inmersión (Oster FPSTHB2610W) con 200 mL de amortiguador 50 mM acetato de sodio pH 6.0 con 200 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA y 0.05 % (*p/v*) NaN<sub>3</sub>. El homogenizado se centrifugó a 3,500 rpm durante 60 min (Z 300 K, Hermle) y las proteínas en el sobrenadante se precipitaron utilizando sulfato de amonio. Se realizó una precipitación fraccionada de dos pasos (30 y 60 % de saturación) y el precipitado formado entre el 30-60 % de saturación se colectó por centrifugación (14,000 rpm durante 20 min, Avanti J-30I, Beckman Coulter), se resuspendió con un volumen mínimo de amortiguador 50 mM acetato de sodio pH 6.0 con 200 mM NaCl, 1 mM EDTA y 0.05 % (*p/v*) NaN<sub>3</sub> (*amortiguador A*) y se dializó contra el mismo. La diálisis se realizó con doble membrana (MWCO: 3,500 Da, Spectra/Por, Spectrum) porque la actividad celulasa era tan grande que provocaba la perforación de la bolsa interna.

El dializado de la fracción 30-60 % de saturación se filtró ( $\emptyset$  0.45  $\mu$ m, Durapore, Millipore) y se inyectó en un sistema que constaba de dos columnas (8.8 O.D.  $\times$  145 mm) conectadas en serie y empacadas con las resinas DEAE-Sepharose (Pharmacia Biotech) y CM-Sepharose (Sigma-Aldrich), ambas de flujo rápido. El sistema de columnas se equilibró con amortiguador A y se lavó con el mismo amortiguador hasta que las proteínas no-adsorbidas lo atravesaron. Las proteínas adsorbidas se eluyeron de manera independiente con un gradiente lineal de 0.2-1.2 M NaCl en amortiguador A. La cromatografía se realizó a flujo de 12 mL/h. Se colectaron fracciones de 1 mL y se observó que las proteínas no-adsorbidas presentaban actividad celulasa, por lo que se realizó una mezcla de éstas. La mezcla con actividad se filtró ( $\emptyset$  0.22  $\mu$ m, Durapore, Millipore) y se aplicó en una columna de exclusión molecular Bio SEC-3 (3  $\mu$ m, 150 Å, 7.8 I.D.  $\times$  150 mm, Agilent Technologies) instalada en un sistema HPLC (HP Agilent 1100 series, Agilent Technologies). La cromatografía se realizó a flujo de 1 mL/min usando amortiguador A como eluyente. Tras repetidas cromatografías, la fracción con actividad se colectó, se concentró por ultrafiltración (Amicon MWCO 3 000, Millipore) y se re-cromatografió bajo las mismas condiciones. Esta última fracción, HrGH45, se usó para estudios posteriores. En todos los pasos de purificación la concentración de proteína se determinó según el método del ácido bicinonínico [20] utilizando el Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo-Fisher Scientific) y albúmina de suero bovino como estándar. Los ensayos se realizaron por triplicado.



**Esquema 2.** Purificación de HrGH45.

La pureza de HrGH45 se analizó mediante varias técnicas. (i) La electroforesis SDS-PAGE se realizó según el método descrito por Laemmli [21] utilizando geles separadores de 12 % (p/v) poliacrilamida y condiciones desnaturalizantes (SDS) y reductoras ( $\beta$ -mercaptoetanol) en una cámara electroforética Mini-PROTEAN (Bio-Rad). Después de la electroforesis, las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250. La referencia de migración fue el marcador Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad). (ii) Para los estudios espectrométricos, HrGH45 se concentró por precipitación con etanol (EtOH) de la siguiente manera: se adicionaron cuatro volúmenes de EtOH a un volumen de la solución de celulasa, se mezclaron y luego se mantuvieron a  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 60 min. Después, la mezcla se centrifugó (13,000 rpm durante 15 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y el sobrenadante se descartó; el precipitado se secó al vacío y se resuspendió con 10  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q. HrGH45 se colocó en una placa MALDI en una relación muestra-matriz de 1:5. La matriz utilizada fue una solución saturada de Super-DHB (Sigma-Aldrich) disuelta en 0.1 % (v/v) ácido trifluoroacético (TFA) y 30 % (v/v) acetonitrilo (ACN). Se empleó un espectrómetro de masas MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics) operado en modo lineal positivo y el software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics) para el registro de espectros y detección de picos, respectivamente. Antes de la adquisición, el equipo se calibró con taumatina (22.2 kDa), glucosa isomerasa (43.25 kDa) y albumina de suero bovino (66.6 kDa). (iii) Finalmente, una solución de proteína (0.1 mg/mL en amortiguador A) se filtró ( $\emptyset$  0.22  $\mu\text{m}$ ) y se inyectó en una columna de fase reversa Zorbax 300SB-C18 (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 I.D.  $\times$  150 mm, Agilent Technologies) instalada en un sistema HPLC (HP Agilent 1100 series, Agilent Technologies). La fase móvil, que constaba de 0.1 % (v/v) TFA en agua Milli-Q (*fase A*) y 0.12 % (v/v) TFA en ACN (*fase B*), se liberó a flujo de 1 mL/min. El gradiente de elución se realizó como sigue: 0 min, 0 % *fase B*; 5 min, 0 % *fase B*; 6 min, 44 % *fase B*; 15 min, 44.5 % *fase B*; 16 min, 100 % *fase B*; 18 min, 100 % *fase B*. La detección se fijó a 280 nm y el experimento se llevó a cabo a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### ***Ensayos enzimáticos***

La actividad celulasa se determinó mediante la cuantificación de azúcares reductores liberados por la hidrólisis sobre carboximetilcelulosa (CMC) empleando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) [22]. Se realizaron tres determinaciones como sigue: (i) blanco de enzima, 50  $\mu\text{L}$  de HrGH45 (0.01-0.1 mg/mL) en amortiguador A + 450  $\mu\text{L}$  de amortiguador A; (ii) blanco de sustrato, 250  $\mu\text{L}$  de 1 % (p/v) CMC disuelto en amortiguador A + 250

$\mu\text{L}$  de amortiguador A; (iii) reacción de hidrólisis, 50  $\mu\text{L}$  de HrGH45 (0.01-0.1 mg/mL) en amortiguador A + 250  $\mu\text{L}$  de 1 % (p/v) CMC disuelto en amortiguador A + 200  $\mu\text{L}$  de amortiguador A. Después de incubar a 45 °C durante 30 min [23] (Incubadora Excella E24, New Brunswick), las reacciones se detuvieron añadiendo 500  $\mu\text{L}$  de DNS<sup>1</sup>, se llevaron a ebullición durante 15 min y se enfriaron a temperatura ambiente. La concentración de azúcares reductores liberados fue determinada interpolando su absorbancia a 550 nm ( $A_{550}$ ) en una curva de calibración con estándares de glucosa a diferentes concentraciones. Los ensayos se realizaron por triplicado. Una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima que libera azúcares reductores equivalentes a 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa por min. La actividad específica se definió como U/mg de proteína.

Se emplearon varios sustratos, incluido el papel filtro Whatman 1 (50 mg, 1  $\times$  6 cm), 1 % (p/v) celulosa microcristalina y 1 % (p/v) algodón comercial, con el fin de evaluar la capacidad de HrGH45 para hidrolizar diferentes tipos de celulosa. Los experimentos se llevaron a cabo como se detalló anteriormente, pero con ligeras modificaciones: las muestras de papel filtro se incubaron por 60 min [22,23] mientras que las de celulosa microcristalina y algodón durante 24 h [22,23]. Se incluyeron blancos de enzima y de sustrato y se trataron de la misma manera. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se usó una celulosa comercial de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich) como control positivo de cada determinación.

Las actividades de celobiohidrolasa y  $\beta$ -glucosidasa se determinaron mediante la cuantificación de *p*-nitrofenol liberado por la hidrólisis de *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-celobiósido (*p*NPC) y *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (*p*NPG), respectivamente, según lo descrito en [24]. Las reacciones de hidrólisis, así como los blancos de reacción, se realizaron con 250  $\mu\text{L}$  de 5 mM *p*NPC o *p*NPG disuelto en amortiguador A y 250  $\mu\text{L}$  de HrGH45 (0.1 mg/mL) en amortiguador A o 250  $\mu\text{L}$  de amortiguador A, según corresponda. Después de incubar a 45 °C durante 30 min [24], las reacciones se detuvieron añadiendo 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (500  $\mu\text{L}$ ). La cantidad de *p*-nitrofenol liberado se calculó a partir de su coeficiente de extinción molar de 18,500  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 410 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado. Una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol por min. La actividad específica se definió como U/mg de proteína.

---

<sup>1</sup> El reactivo DNS se preparó disolviendo DNS (3.53 g) e NaOH (6.6 g) en H<sub>2</sub>O destilada (472 mL). Posteriormente, se adicionó tartrato mixto de sodio y potasio (102 g), fenol fundido (2.3 mL) y metabisulfito de sodio (2.76 g).

El modo de unión y la disposición de los residuos en el sitio activo se sugirieron después de analizar los hidrolizados de HrGH45 sobre diferentes celo-oligosacáridos. Las reacciones de hidrólisis, así como los blancos de reacción, se realizaron con 1 mg de sustrato y 1 mL de HrGH45 (0.1 mg/mL) en amortiguador A o 1 mL de amortiguador A, según corresponda. Después de incubar a 45 °C durante 24 h [11], las reacciones se detuvieron llevándolas a ebullición por 10 min. Los hidrolizados se analizaron por cromatografía en capa fina (TLC) según lo descrito en [25] con ligeras modificaciones: se mezclaron 10 µL de cada muestra con 10 µL de EtOH [26] y luego se colocaron sobre una cromatoplaaca (ALUGRAM Xtra SIL G/UV<sub>254</sub>, Macherey-Nagel) cada 0.5 µL con micropipeta. La TLC se realizó a temperatura ambiente utilizando el método doble ascendente y una mezcla de acetato de etilo-ácido acético glacial-agua destilada en relaciones 3:2:1 como fase móvil. Después de la doble elución, la cromatoplaaca se secó al aire en una campana de extracción, se roció con una solución reveladora de 10 % (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en EtOH y se calentó a 120 °C hasta que se visualizaron los carbohidratos resueltos [11]. Se usaron glucosa (G1), celobiosa (G2), celotriosa (G3), celotetraosa (G4) y celopentaosa (G5) como estándares.

### ***Detección de glicosilaciones***

La tinción de glicoproteínas en gel SDS-PAGE, empleando el método del ácido periódico-reactivo de Schiff, se logró con el Pierce Glycoprotein Staining Kit (Thermo-Fisher Scientific) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Después de la electroforesis, el gel se fijó, oxidó y tiñó. Finalmente, se lavó exhaustivamente con 3 % (v/v) ácido acético hasta que se visualizaron bandas color magenta. Por otra parte, se utilizó el método del fenol-sulfúrico [27] para estimar el contenido de carbohidratos totales en la estructura de HrGH45. Brevemente, 250 µL de proteína (0.2 mg/mL) en amortiguador A se mezclaron con 7.5 µL de 5 % (p/v) fenol y se dejaron interaccionar a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, se les adicionó 750 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se incubaron a 27 °C durante 20 min. La cantidad de sacáridos estructurales se determinó interpolando su A<sub>490</sub> en una curva de calibración con estándares de glucosa a diferentes concentraciones. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### ***Estado de asociación en solución***

La masa molecular y el estado oligomérico en solución de HrGH45 se establecieron después de calibrar una columna de filtración en gel. Una solución de proteína (0.1 mg/mL) recién purificada se inyectó en una columna Bio SEC-3 (3  $\mu\text{m}$ , 150 Å, 7.8 I.D.  $\times$  150 mm, Agilent Technologies) instalada en un sistema HPLC (HP Agilent 1100 series, Agilent Technologies). La cromatografía se realizó a flujo de 1 mL/min usando amortiguador A como eluyente. Las proteínas de referencia fueron glucosa isomerasa tetramérica (173 kDa), albúmina de suero bovino (66.6 kDa), quitinasa (31.9 kDa), taumatina (22.2 kDa) y lisozima (14 kDa).

### ***Zimografía***

Las formas oligoméricas activas de HrGH45 se determinaron a través de zimogramas, se siguieron los protocolos descritos en [28] y [29] con ligeras modificaciones: se cargó una muestra de enzima sin calentar y sin agentes reductores en un gel concentrador al 4 % (p/v) poliacrilamida. Además, se incorporó CMC con una concentración final de 0.1 % (p/v) en la fase de resolución al 12 % (p/v) poliacrilamida. Después de la electroforesis, el gel se sumergió durante 30 min en 5 % (v/v) Triton X-100 disuelto en amortiguador A; se lavó exhaustivamente con agua Milli-Q y se incubó por una noche a 37 °C en amortiguador A. Luego, el gel se tiñó con una solución etanólica saturada de rojo Congo durante 60 min y se destiñó con 1.5 M NaCl hasta que se observaron bandas claras y traslúcidas. Un segundo gel, preparado de manera idéntica, se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 después de la electroforesis. El control positivo del experimento fue una celulasa comercial de *A. niger*.

### ***Efecto del pH y temperatura sobre la actividad enzimática***

La dependencia del pH se analizó a 45 °C en mezclas de reacción ajustadas a pH 3.0-10.0 empleando el amortiguador universal Britton-Robinson (40 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 40 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y 40 mM CH<sub>3</sub>COOH [30]). La influencia de la temperatura se examinó con el amortiguador 40 mM Britton-Robinson pH 7.0 de 4 a 75 °C. La actividad enzimática se determinó como se detalla en *Ensayos enzimáticos*. Se incluyeron blancos de enzima y de sustrato y se trataron de la misma manera. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### ***Ensayos de desplazamiento térmico***

La estabilidad térmica de HrGH45 se analizó por fluorimetría diferencial de barrido, se utilizó el fluoróforo SYPRO Orange ( $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 569 \text{ nm}$ ; Thermo-Fisher Scientific) para monitorear el proceso de desplegamiento de la enzima [31]. Las soluciones, que consistían de 10  $\mu\text{L}$  de 3  $\mu\text{M}$  HrGH45 en amortiguador A y 10  $\mu\text{L}$  de los kits a evaluar (pH Screen, HR2-241; Polymer, HR2-227; Hampton Research), se colocaron en una placa de 96 pozos (MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate), misma que se selló con una película ópticamente inerte (Greiner VIEWseal, Jena Bioscience) y se centrifugó a 300 rpm durante 2 min a 25 °C. Después, la placa se colocó en un equipo qPCR (StepOne Real-Time PCR System) y se calentó en un paso continuo de 25 a 98 °C (2 min a 25 °C seguido del incremento de 1 % en la temperatura en forma continua hasta 98 °C, donde se mantuvo por 15 s). Todos los termofluorogramas obtenidos fueron inspeccionados con el software StepOne 2.3 para analizar su calidad. Los datos se normalizaron y se ajustaron al modelo sigmoide de Boltzmann empleando el software Origin 2018. La composición química de cada kit, así como su concentración final después de la dilución con la proteína, se indica en el Anexo 1.

### ***Experimentos de dicroísmo circular***

El contenido de elementos de estructura secundaria de HrGH45 se determinó por su espectro de dicroísmo circular (DC) en la región del UV-lejano (190-260 nm). Las mediciones de DC se realizaron a 25 °C en un espectropolarímetro J-1500 (JASCO) equipado con un Peltier como sistema de control de temperatura, empleando una celda de cuarzo de 1 mm de longitud de paso de luz y los siguientes parámetros espectrales de adquisición: rapidez de barrido, 10 nm/min; ancho de banda, 1.0 nm; tiempo de respuesta, 1 s. La muestra fue una solución de celulasa en agua destilada (0.2 mg/mL). Los datos de DC, obtenidos en grados, fueron normalizados y corregidos de las contribuciones del disolvente. Los espectros se colectaron por triplicado y se promediaron para obtener el espectro final de la enzima. Este último se expresó en unidades de elipticidad molar del residuo medio ( $\theta$  [=]  $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ), misma que se calculó utilizando una masa molecular de 110 g/mol/residuo [32]. El contenido de elementos estructurales se estimó empleando  $\Delta\epsilon$  ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) con el servidor BeStSel [33,34].

### ***Digestión e identificación por huella peptídica***

Se determinó parte de la secuencia aminoacídica de HrGH45 mediante la identificación de los péptidos obtenidos posterior a la proteólisis con el Protease Profiler Kit (Sigma-Aldrich), el cual incluye las proteasas Asp-N (metalo-endoproteasa de *Pseudomonas fragi*; E.C. 3.4.24.33), Lys-C (serin-endoproteasa de *Lysobacter enzymogenes*; E.C. 3.4.21.50), Glu-C (serin-endoproteasa de *Staphylococcus aureus*; E.C. 3.4.21.19), Arg-C (serin-endoproteasa de la glándula submaxilar de ratón; E.C. 3.4.21.40) y tripsina (serin-endoproteasa pancreática; E.C. 3.4.21.4). Se empleó el método de digestión en gel (*In-Gel Digestion*) siguiendo las especificaciones del proveedor.

Después de la electroforesis, las bandas de proteína teñidas se escindieron cuidadosamente del gel y se colocaron dos por cada tubo eppendorf de 1.5 mL, se cortaron en fragmentos más pequeños y se destiñeron con una solución de 250 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  en 50 % (v/v) ACN durante 30 min a 25 °C. Posteriormente, se redujeron con 50 mM TCEP durante 10 min a 60 °C, se alquilaron con 100 mM Iodoacetamida por 1 h a 25 °C en la oscuridad y se lavaron dos veces con 250 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  en 50 % (v/v) ACN. Finalmente, se deshidrataron completamente con ACN y se llevaron a sequedad total. Las reacciones de proteólisis se efectuaron con 0.4 µg de proteasa en 120 µL de 40 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  en 9 % (v/v) ACN y se incubaron a 30 °C por 20 h. Se extrajo el amortiguador de reacción, que contenía a los péptidos de interés, y a los remanentes de las bandas se les adicionó una solución de extracción (0.1 % v/v TFA y 30 % v/v ACN), ésta se realizó durante 1 h a 25 °C. Por último, se mezcló el amortiguador de reacción con la solución de extracción y se dejó secar al vacío. Los péptidos se resuspendieron con 10 µL de matriz, la cual fue una solución saturada de  $\alpha$ -ciano (Sigma-Aldrich) disuelta en 0.1 % (v/v) TFA y 30 % (v/v) ACN, y se colocaron en una placa MALDI para su análisis. Se empleó un espectrómetro de masas MALDI-TOF Microflex operado en modo reflectrón positivo y el software FlexAnalysis 3.0 para el registro de espectros y detección de picos, respectivamente. Antes de la adquisición, el equipo se calibró con el “Tube 4: Peptide Calibration Standard” del Starter Kit for MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics). Para la identificación de los péptidos se emplearon las bases de datos de UniProt. El análisis se realizó con Mascot 2.4 (Matrix Science) instalado en un servidor local asumiendo los siguientes parámetros: modificación fija, carbamidometilación (C); modificación variable, oxidación (M); tolerancia, 0.1 %; escisiones permitidas, hasta 2.

### ***Ensayos de cristalización***

Una solución de proteína recién purificada se dializó (MWCO: 3,500 Da) contra 20 mM ácido cítrico-citrato de sodio pH 6.0 con 150 mM NaCl, se filtró ( $\varnothing$  0.22  $\mu$ m) y se concentró por ultrafiltración (MWCO 3000) hasta 7.2 mg/mL. Los ensayos de cristalización se realizaron con el método de difusión en fase de vapor en la modalidad de gota colgante con 0.6  $\mu$ L de solución de proteína y 0.6  $\mu$ L de agente precipitante. Las gotas se equilibraron con 70  $\mu$ L de solución precipitante. Se usaron placas Intelli-Plate 96-3 well LVR (Hampton Research) y se incubaron a 18 °C. Los kits evaluados fueron PEG RX, PEG ION, Index y Crystal Screen I y II (Hampton Research), así como PACT Suite NeXTal (QIAGEN).

### ***Análisis estadístico***

Los ensayos se llevaron a cabo al menos tres veces. El análisis de datos y el ajuste de curvas se realizaron con el software Origin 2018. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (DE). Las barras de error en las figuras representan DE.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*“It was like a jigsaw puzzle... I felt that if I had only one more piece of the puzzle, everything would fall into place. I found the piece, and everything became clear...”*

**Maria Goepfert Mayer**

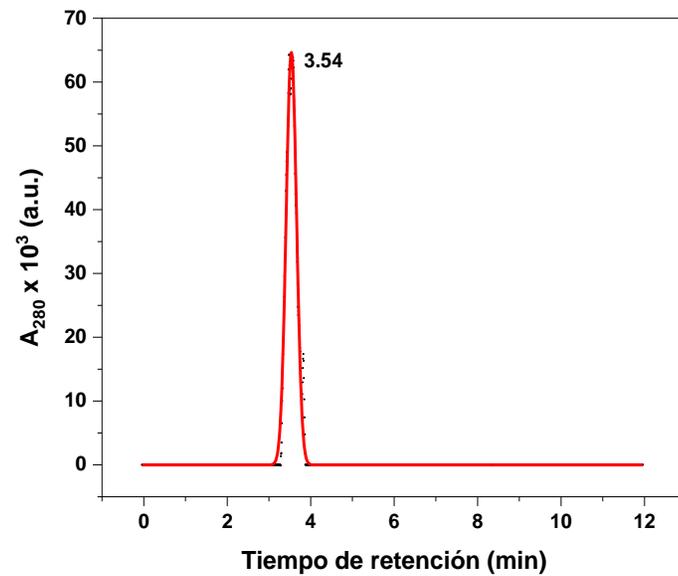
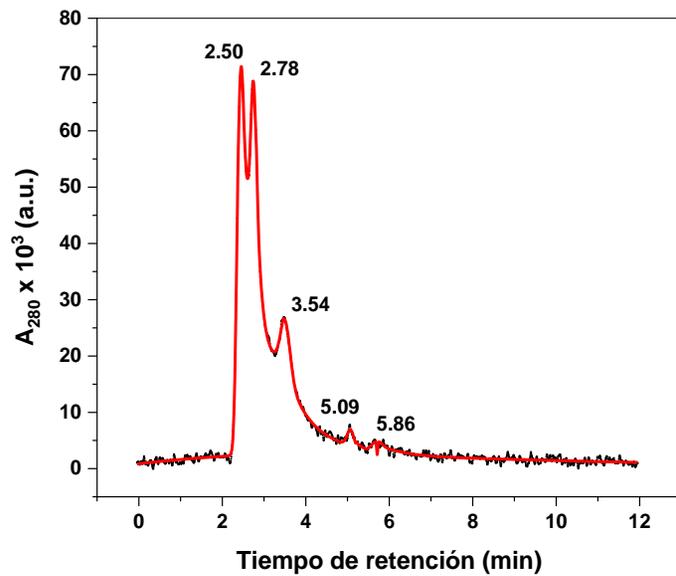
El interés por las celulasas detectadas en metazoarios antes de 1998 era escaso, ya que estas enzimas fueron consideradas productos de relaciones simbiotes con microorganismos celulolíticos presentes en el tracto digestivo del hospedero [35]. El descubrimiento de un gen de celulasa en la termita *Reticulitermes speratus* [36] refutó la teoría largamente creída sobre el origen simbiote de estas enzimas en animales. Desde entonces, se han aislado y caracterizado celulasas endógenas a partir de diversos invertebrados herbívoros terrestres y marinos [7]. Como sea, pocas investigaciones se han centrado en el estudio de celulasas provenientes de *Haliotis* sp. [17–19].

En los últimos años, las micro y macroalgas marinas se han convertido en una excelente fuente de biomasa para la producción de bioetanol. No obstante, su explotación sigue siendo costo-prohibitiva ya que la celulosa es resistente a la despolimerización y las celulasas conocidas no pueden reutilizarse. Por tanto, se requieren nuevas celulasas más baratas y sofisticadas.

## ***Purificación***

En este trabajo se purificó a homogeneidad una celulasa presente en el tracto digestivo de *H. rufescens*, la enzima se nombró HrGH45. Para lograr el aislamiento, el hepatopáncreas de un abulón se homogenizó mecánicamente con un amortiguador de acetato de sodio y el extracto se centrifugó para remover restos de tejidos y proteínas precipitadas. La actividad endoglucanasa se encontró en el sobrenadante, mismo que se sometió a una precipitación fraccionada con sulfato de amonio. El precipitado formado entre el 30 y 60 % de saturación contenía la mayor actividad glicohidrolítica, por lo que se aplicó a un sistema de columnas de intercambio iónico conectado en serie. La actividad celulasa se detectó en las fracciones correspondientes a los lavados del sistema de columnas, razón por la cual se realizó una mezcla (*pool*) de éstas. La mezcla con actividad se resolvió en una columna de exclusión molecular instalada en un sistema HPLC. Tras repetidas cromatografías, la fracción con actividad endoglucanasa se colectó, se concentró por ultrafiltración y se re-cromatografió. La Fig. 3 muestra el perfil cromatográfico registrado antes y después de la recirculación de HrGH45 en la columna de filtración en gel.

A pesar de que la cromatografía de exclusión molecular no es un criterio de pureza, se ha considerado que si la distribución de picos es estrecha y se observa un perfil de dispersión gaussiano, se puede inferir que la muestra está pura. Sin embargo, no se debe asumir como tal [37]. El perfil gaussiano registrado para HrGH45 después de su recromatografía en la columna de filtración en gel sugirió fuertemente su homogeneidad. De cualquier manera, se procedió a verificar su pureza empleando técnicas electroforéticas, espectrométricas y cromatográficas.

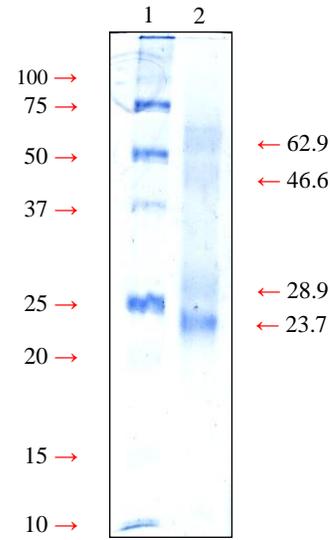
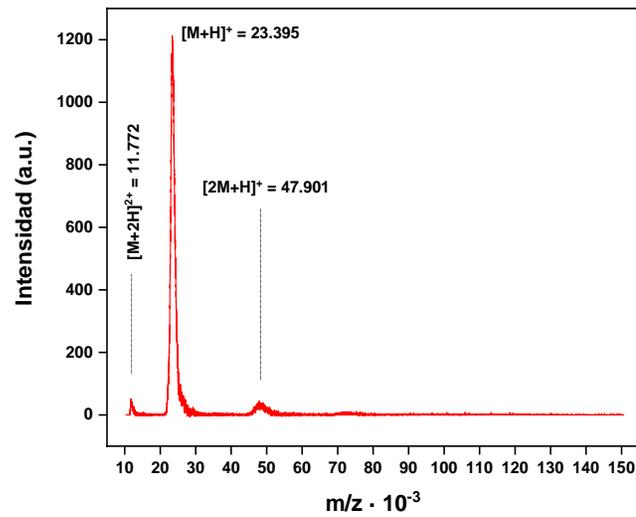
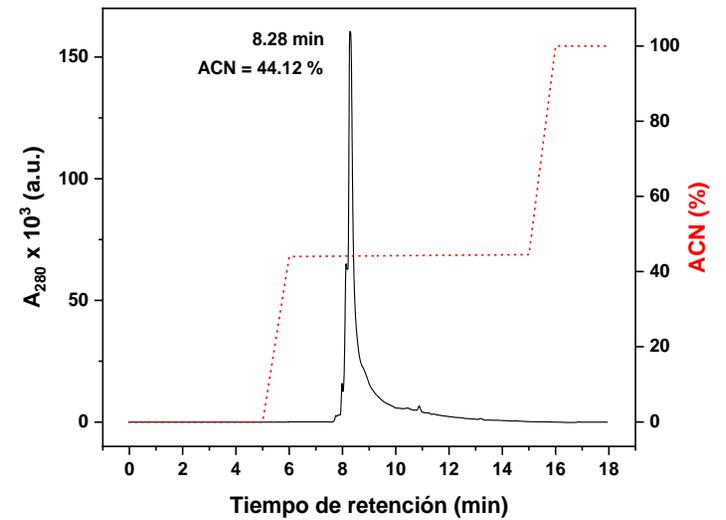


**Fig. 3.**

**Purificación.** *Izquierda:* Cromatograma obtenido después de inyectar la mezcla de las fracciones con actividad celulasa (proteínas no-adsorbidas en las resinas de intercambio iónico) en una columna de exclusión molecular instalada en un sistema HPLC. La fracción con actividad endoglucanasa eluyó con un tiempo de retención de 3.54 min. *Derecha:* Perfil de elución registrado después de recircular HrGH45 en la columna de filtración en gel. Columna, Bio SEC-3 (3  $\mu\text{m}$ , 150  $\text{\AA}$ , 7.8 I.D.  $\times$  150 mm); Eluyente, Amortiguador A; Flujo, 1 mL/min.

HrGH45 apareció como cuatro bandas de proteína en geles SDS-PAGE con masas moleculares estimadas en 23.7, 28.9, 46.6 y 62.9 kDa. Todas las bandas presentaron un ligero barrido en el gel, Fig. 4A. Notablemente, no se observó ninguna señal alrededor de  $m/z = 29$  kDa cuando la enzima se analizó por espectrometría de masas MALDI-TOF. En estos estudios, el ion molecular ( $[M+H]^+$ ) fue el pico base y se registró en  $m/z = 23.395$  kDa. También se detectó el ion doblemente cargado ( $[M+2H]^{2+} = 11.772$  kDa) y un agregado de proteína ( $[2M+H]^+ = 47.901$  kDa), Fig. 4B. Con base en estos resultados, se asumió que *i*) la masa molecular de HrGH45 era 23.395 kDa y que *ii*) las bandas de proteína en el gel con masas de 46.6 y 62.9 kDa correspondían a agregados de la enzima, ya que se ha reportado que, en algunos casos, las condiciones desnaturalizantes de la electroforesis inducen oligomerización [38,39]. De cualquier forma, la pureza de HrGH45 se analizó inequívocamente por cromatografía de fase reversa  $C_{18}$ , ya que ésta es capaz de separar desde proteínas de estructura casi idéntica [40] hasta diastereómeros polipeptídicos [41,42]. El perfil de elución de la celulasa se muestra en la Fig. 4C. Aquí, se observó un pico único y agudo en la fracción eluída con aprox. 44 % (v/v) ACN. Lo anterior demostró la pureza de HrGH45.

Como se mencionó anteriormente, HrGH45 exhibió una banda difusa en geles SDS-PAGE con masa molecular de 28.9 kDa. Sin embargo, no se registró ningún ion en el espectro de masas con dicha relación  $m/z$ . Esto sugirió la posibilidad de un comportamiento electroforético anómalo de la proteína en el gel, mismo que podría deberse a la presencia de modificaciones postraduccionales. Varios tipos de proteínas, incluidas las glicoproteínas y las fosfoproteínas, migran de forma anómala en estudios electroforéticos. En particular, las glicoproteínas presentan movilidad disminuida en geles SDS-PAGE porque los carbohidratos no se unen al SDS. El motivo hidrofílico de glicano reduce las interacciones hidrofóbicas entre el esqueleto de la proteína y el SDS, evitando así la unión correcta del tensioactivo. Esto reduce la relación carga neta-masa del complejo proteína-SDS, dando como resultado un aumento aparente del peso molecular. Lo anterior podría justificar las bandas en 23.7 y 28.9 kDa, siendo 23.7 kDa la *masa real* de HrGH45 y 28.9 kDa la migración anómala de la proteína en el gel. También puede deberse a diferentes grados de glicosilación [43,44].

**A****B****C****Fig. 4.**

**Pureza.** (A) Electroforesis en gel. 1, Precision plus protein unstained standards; 2, HrGH45. (B) Espectrometría de masas MALDI-TOF. Muestra, Precipitado de proteína; Matriz, Super-DHB; Calibradores: Taumatina (22.2 kDa), Glucosa isomerasa (43.25 kDa), Albúmina de suero bovino (66.6 kDa). El espectro se registró en modo lineal positivo. (C) Cromatografía de fase reversa C<sub>18</sub>. Columna, Zorbax 300SB-C18 (HPLC); Fase A, 0.1 % (v/v) TFA en agua Milli-Q; Fase B, 0.12 % (v/v) TFA en ACN; Flujo, 1 mL/min. Gradiente: 0 min, 0 % fase B; 5 min, 0 % fase B; 6 min, 44 % fase B; 15 min, 44.5 % fase B; 16 min, 100 % fase B; 18 min, 100 % fase B.

El fenómeno de migración anómala se ha reportado para varias glicoproteínas, donde los comunes denominadores son *i*) la estimación errónea del peso molecular debido a glicosilaciones (aumento aparente) y *ii*) la presencia de múltiples bandas [45]. Cabe destacar que el registro del espectro de masas MALDI-TOF de HrGH45 sólo fue posible empleando la matriz Super-DHB que, acorde con la literatura, es una matriz ampliamente utilizada para adquirir espectros de masas de proteínas y péptidos glicosilados, así como de oligo y polisacáridos [46]. Estas observaciones sugirieron la presencia de glicosilaciones en la estructura de HrGH45.

La cromatografía de fase reversa demostró la pureza de HrGH45, por lo que el resumen de la purificación se muestra en la Tabla 3. Ahí se indican los rendimientos y las actividades específicas en cada uno de los diferentes pasos de purificación. La principal etapa de asilamiento se logró mediante la cromatografía de exclusión molecular en el sistema HPLC. HrGH45 se purificó con un rendimiento del 2 % y una actividad específica sobre 0.5 % (*p/v*) CMC de 53.5 U/mg a 45 °C y pH 6.0. Estos valores fueron muy similares a los informados para una endoglucanasa de la liebre marina (*A. kurodai*), 3.3 % y 67.3 U/mg, respectivamente [11].

**Tabla 3.**

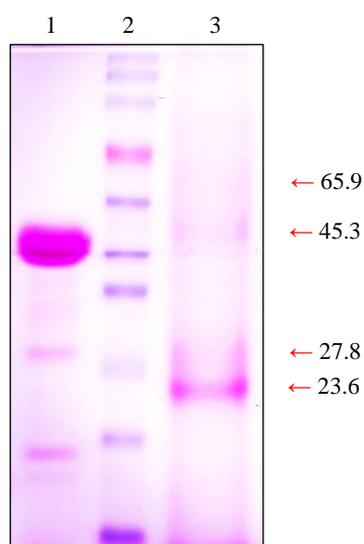
**Resumen de purificación.** La purificación se realizó a partir del hepatopáncreas (aprox. 14 g) de un abulón.

Paso de purificación	Actividad total	Actividad específica*	Rendimiento	Veces de purificación
	U	U/mg	%	
Extracción	1395	1.5	100	1
Precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	338	5.9	24	4
Intercambio iónico	263	5.7	19	4
Exclusión molecular (HPLC)	25	53.5	2	37

\* Una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima que libera azúcares reductores equivalentes a 1 µmol de glucosa por min. La actividad específica se definió como U/mg de proteína.

### ***HrGH45 es una glicoproteína y se comporta como un homotrímero***

El contenido de hexosas en la estructura de HrGH45, estimado según el método del fenol-sulfúrico [27], resultó igual a  $26 \pm 3$  %. Por otro lado, la visualización de glicoproteínas en gel SDS-PAGE se logró después de realizar la tinción del ácido periódico-reactivo de Schiff. En este experimento, HrGH45 apareció como cuatro bandas de proteína con masas moleculares estimadas en 23.6, 27.8, 45.3 y 65.9 kDa. Los oligómeros se visualizaron ligeramente, Fig. 5. El patrón de migración fue similar al observado anteriormente.



**Fig. 5.**

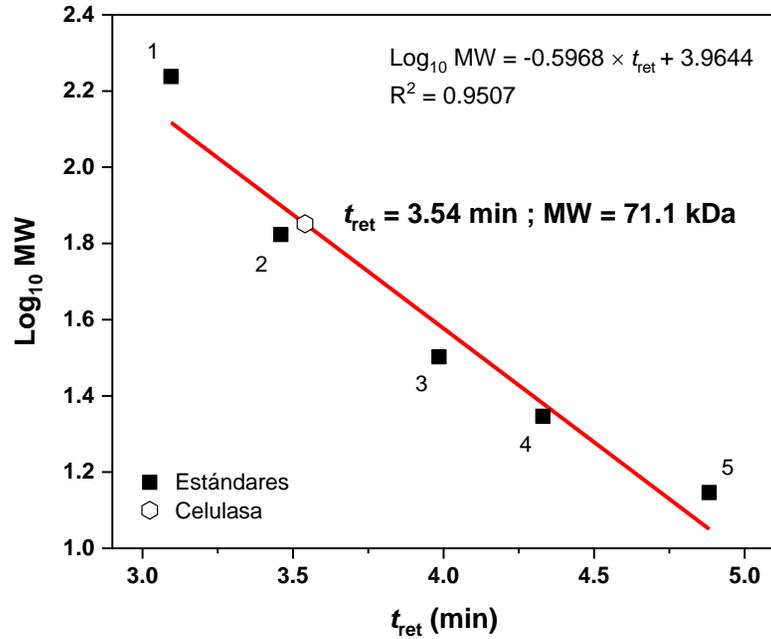
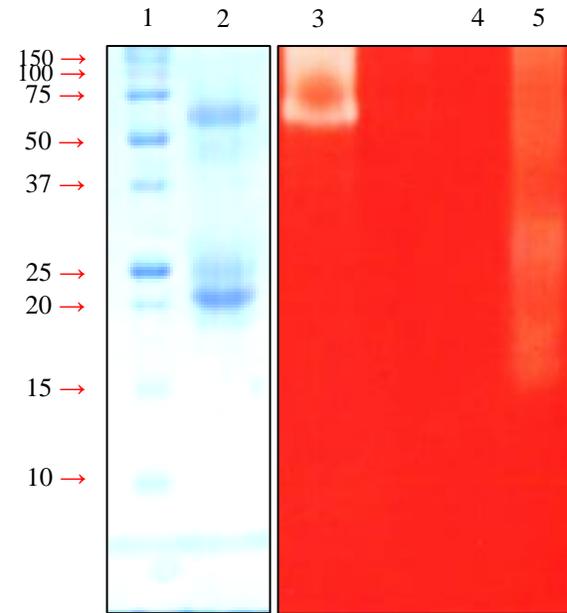
**Detección de glicosilaciones.** 1, Peroxidasa de rábano picante (control positivo); 2, Bio Basic prestained protein ladder; 3, HrGH45. Las glicoproteínas se observan como bandas color magenta.

Las celulasas de *H. discus hannai* [17] y *Strongylocentrotus nudus* [47] sugirieron contenidos de sacáridos estructurales de 4.2 y 12 %, respectivamente. No obstante, estas determinaciones se estimaron por diferencia de masa entre las encontradas experimentalmente y sus respectivas secuencias aminoacídicas, no fueron cuantificaciones experimentales. Además, se propuso que se trataban de *N*-glicosilaciones debido a la presencia del sequon N-X-T/S ( $X \neq P$ ). Por otro lado, se encontró que dos de tres celulasas de *H. fulgens* presentaban 3.8 y 4.5 % de carbohidratos estructurales [19]. Asimismo, se han detectado hexosas en todas las endoglucanasas (16.7, 3.2, 25.2 y 9.9 %) y  $\beta$ -glucosidasas (6.6 y 6.7 %) del sistema celulolítico de *A. kurodai* [48]. En eucariotas, la

glicosilación tiene lugar en las membranas del retículo endoplásmico (*N*-glicosilación unida a Asn o Arg) o directamente en el aparato de Golgi (*O*-glicosilación asociada a Ser o Thr), mientras que en arqueas sucede en la membrana plasmática [49]. Con base en lo anterior, se dedujo que HrGH45 era producida por el abulón *per se* y no por bacterias residentes simbioses, ya que los escasos informes de bacterias con capacidad para glicosilar han sido asociados a mecanismos de patogénesis [50].

Las glicosilaciones pueden influenciar la estabilidad, conformación, secreción y actividad de las proteínas. Asimismo, brindan complejidad estructural y propiedades fisicoquímicas interesantes [51]. Estas modificaciones son requeridas para procesos de plegamiento, oligomerización y solubilización adecuados. Las funciones varían de una proteína a otra. Además, mientras más alto es el grado de glicosilación, mayor es la tendencia de las glicoproteínas a oligomerizar. Esto debido a que se establecen interacciones azúcar-proteína o azúcar-azúcar entre monómeros [52]. El contenido de hidratos de carbono en la estructura de HrGH45 supera lo informado para proteínas de origen similar, razón por la cual se sugiere que estas modificaciones tienen un papel importante en las propiedades de la enzima. Es necesario examinar el significado fisiológico de estas glicosilaciones utilizando celulasas recombinantes expresadas en células procariotas donde no tenga lugar la glicosilación.

El estado oligomérico de HrGH45 en solución se determinó después de calibrar una columna de filtración en gel, Fig. 6A. En este experimento, la masa molecular de HrGH45 se estimó en 71.1 kDa. No obstante, durante las adquisiciones de espectrometría de masas MALDI-TOF, la celulasa del abulón rojo exhibió una masa molecular de 23.395 kDa. Por lo que HrGH45 se comportó como un homotrímero en sistemas acuosos. Por otra parte, las formas oligoméricas de HrGH45 con actividad en geles de poliacrilamida se detectaron mediante zimogramas. En estos estudios, el patrón de migración (Fig. 6B *izquierda*) fue similar al observado anteriormente. Además, la actividad endoglucanasa se visualizó como una banda clara y traslúcida con una masa molecular de 67 kDa (Fig. 6B *derecha*), misma que correspondió con la conformación trimérica de HrGH45. No se observó hidrólisis en la forma monomérica o dimérica.

**A****B****Fig. 6.**

**Determinación del estado oligomérico. (A)** Comportamiento en sistemas acuosos. 1, Glucosa isomerasa tetramérica (173 kDa); 2, Albúmina de suero bovino (66.6 kDa); 3, Quitinasa (31.9 kDa); 4, Taumatina (22.2 kDa); 5, Lisozima (14 kDa); Columna, Bio SEC-3 (HPLC); Eluyente, Amortiguador A; Flujo, 1 mL/min. **(B)** Análisis por zimografía. *Izquierda:* Patrón de migración en gel SDS-PAGE 12 % (p/v) poliacrilamida con 0.1 % (p/v) CMC. 1, Precision plus protein unstained standards; 2, HrGH45. *Derecha:* Ensayo en gel para la actividad endoglucanasa. 3, HrGH45; 4, Inhibidor de la tripsina de soya (control negativo); 5, Celulasa de *A. niger* (control positivo).

Estos hallazgos difirieron de otros reportados para celulasas nativas de moluscos marinos, donde fueron caracterizadas como enzimas monoméricas [11,17,18,48,53–56]. No obstante, una endoglucanasa recombinante de 22.54 kDa de *Corbicula japonica* [57], perteneciente a la familia 45 de las glicosil-hidrolasas, exhibió un comportamiento similar en zimogramas al encontrado para HrGH45. Además, a través de mediciones de dispersión dinámica de luz, se observó que tres celulasas de *H. fulgens* tendían a formar multímeros de gran tamaño y que sus formas monoméricas eran inactivas e inestables [19]. Estos resultados sugirieron que la actividad glicohidrolítica de HrGH45 estaba asociada exclusivamente con su conformación trimérica. Como sea, aún se desconoce el mecanismo molecular por el cual la enzima adquiere dicho arreglo. Estudios estructurales permitirían elucidar el proceso de oligomerización de HrGH45.

Independientemente de su origen, la mayoría de las celulasas son enzimas monoméricas [8]. *E.g.*, una endoglucanasa de la microflora intestinal de la mosca soldado negra (*Hermetia illucens*) mostró una banda de proteína de 40 kDa en gel SDS-PAGE, misma que tuvo actividad en zimogramas [58]. Un comportamiento similar se observó con una celulasa termofílica de *Geobacillus* sp. HTA426 [59].

### ***HrGH45 exhibe endo/exoactividad y reconoce celopentaosa en regiones amorfas de celulosa***

Se analizó la capacidad de HrGH45 para hidrolizar diferentes tipos de celulosa. Para ello, se probaron como sustratos 0.5 % (*p/v*) CMC, papel filtro (50 mg), 1 % (*p/v*) celulosa microcristalina y 1 % (*p/v*) algodón. Los dos primeros se emplearon como modelos de celulosa amorfa, mientras que los últimos como celulosa cristalina. Se detectó actividad glicosidasa sobre CMC ( $53.9 \pm 1.0$  U/mg) y papel filtro ( $10.6 \pm 1.2$  U/mg), no así sobre celulosa microcristalina o algodón. Resultados similares se encontraron al caracterizar una endoglucanasa, de la familia 45 de las GHs, del bivalvo *Mytilus edulis* [56] y las endocelulasas, pertenecientes a la familia 9 de las GHs, de los gasterópodos *Bellamyia chinensis laeta* [54] y *H. discus hannai* [18]. Estas observaciones confirmaron que HrGH45 era una endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa típica y sugirieron que es capaz de hidrolizar enlaces glicosídicos en regiones amorfas dentro de las moléculas de celulosa.

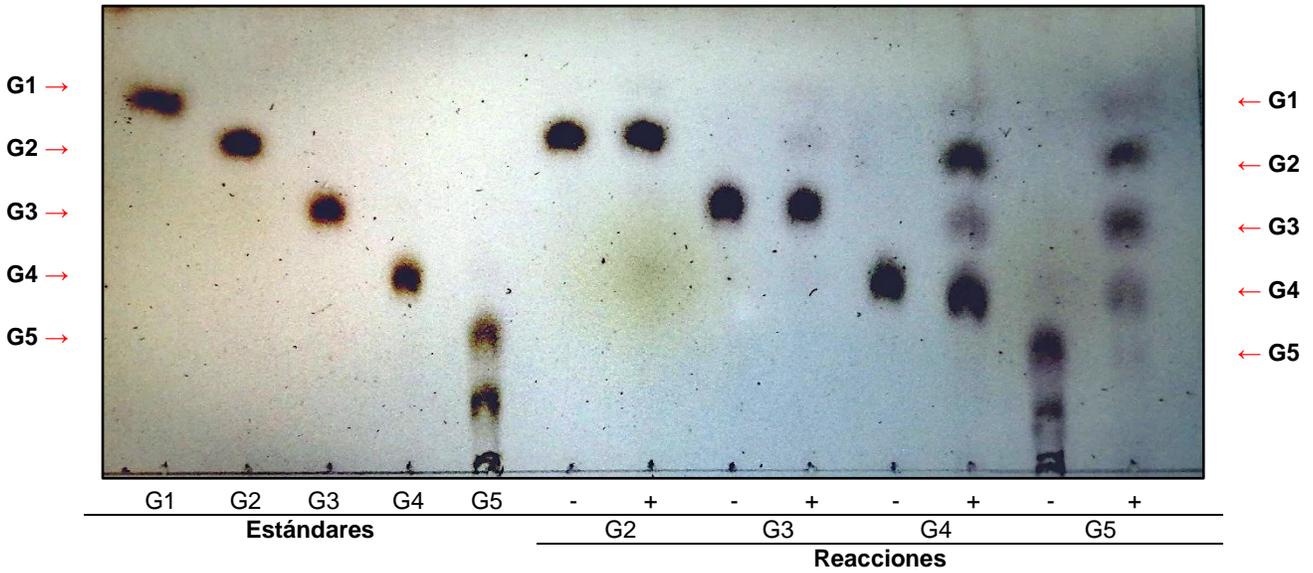
Los cromógenos sintéticos *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-celobiósido (*p*NPC) y *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (*p*NPG) se utilizaron como sustratos selectivos para medir las actividades de celobiohidrolasa y  $\beta$ -glucosidasa, respectivamente. Sorprendentemente, se detectó actividad<sup>2</sup> enzimática sobre el enlace aglucónico (heterosídico) de *p*NPC ( $6.97 \pm 0.17$  U/mg) y *p*NPG ( $1.25 \pm 0.01$  U/mg), evidenciando así las actividades de celobiohidrolasa tipo II y  $\beta$ -glucosidasa de HrGH45. Cel III, una celulasa de *H. fulgens*, mostró propiedades funcionales similares [19]. De cualquier forma, es preciso notar que las actividades de celobiohidrolasa y  $\beta$ -glucosidasa fueron menores que la de endoglucanasa. La baja velocidad de hidrólisis pudo estar asociada con mecanismos de inhibición por producto, ya que la glucosa y la celobiosa inhiben las reacciones de hidrólisis de las glucosidasas y celobiohidrolasas (respectivamente) sin comprometer la actividad de endoglucanasa [60].

Las primeras aproximaciones sobre el modo de unión de HrGH45 con su sustrato se propusieron después de identificar, mediante cromatografía en capa fina, los productos finales de reacción generados por la hidrólisis sobre diferentes celo-oligosacáridos. HrGH45 hidrolizó lentamente celobiosa y celotriosa a glucosa y a celobiosa más glucosa, respectivamente. La celotetraosa fue parcialmente hidrolizada a celobiosa y a cantidades traza de celotriosa más glucosa. En el caso de la celopentaosa, la escisión principal tuvo lugar en su segundo enlace glicosídico, liberando celotriosa más celobiosa. No obstante, una escisión menor en su primer enlace glicosídico dio como resultado celotetraosa más glucosa, Fig. 8A. El patrón de hidrólisis de los celo-oligosacáridos y la actividad detectada sobre los sustratos cromogénicos permitieron aventurar un modelo de organización del sitio activo de HrGH45 (Fig. 8B). Como la celopentaosa se hidrolizó completamente y se observaron dos patrones de hidrólisis para este sacárido, se sugiere que HrGH45 reconoce unidades de celopentaosa en las cadenas de celulosa a través de seis posibles subsitios de unión a sustrato y escinde preferentemente su segundo enlace glicosídico. En el arreglo de seis subsitios, ABCDEF, los aminoácidos catalíticos estarían situados entre B y C. En todos los casos, los extremos no reductores del polisacárido interaccionarían con A o B. Este modelo explica claramente la naturaleza de todos los productos de reacción formados.

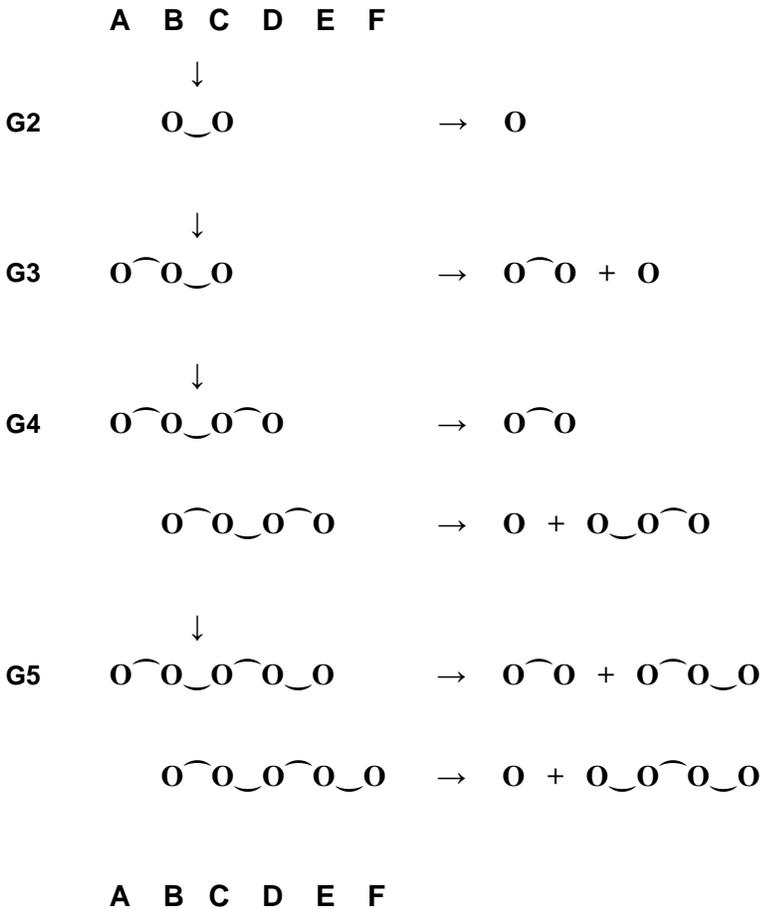
---

<sup>2</sup> Una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu$ mol de *p*-nitrofenol por min. La actividad específica se definió como U/mg de proteína.

**A**



**B**



**Fig. 7.**

**Modo de unión y disposición de los residuos en el sitio activo.** (A) Hidrólisis sobre celooligosacáridos. +, Reacción de hidrólisis; -, Blanco de reacción; Fase móvil, AcOEt-AcOH-H<sub>2</sub>O (3:2:1); Revelador, 10 % (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en EtOH y calor. (B) Modelo de organización del sitio activo. Las letras (A-F) representan los subsitios de unión a sustrato. Las flechas indican el sitio de corte entre los subsitios B y C. Los círculos abiertos ilustran residuos de glucosa, y las orientaciones hacia arriba y hacia abajo del enlace glicosídico se indican mediante <sup>~</sup> y <sub>~</sub>, respectivamente. G1, Glucosa; G2, Celobiosa; G3, Celotriosa; G4, Celotetraosa; G5, Celopentaosa.

Los productos finales de reacción generados por HrGH45 fueron muy similares a los reportados para las endoglucanasas de *H. discus hannai* y *S. nudus* [47], ambas pertenecientes a la familia 9 de las glicosil-hidrolasas. Asimismo, estos hallazgos fueron comparables con los patrones de hidrólisis observados para las endocelulasas, clasificadas como glicosil-hidrolasas de la familia 45, de *A. kurodai* [11,48] y *M. edulis* [56].

Los principales productos de reacción formados durante el experimento confirmaron el carácter endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa de HrGH45 y demostraron su especificidad sobre múltiples sustratos porque se encontró actividad residual de celobiohidrolasa tipo II y  $\beta$ -glucosidasa. No se observó evidencia de actividad glicosil-transferasa incluso después de la prolongada incubación que duró el ensayo, ya que no se detectaron celo-oligosacáridos más largos que los propios sustratos. Estas propiedades funcionales tan interesantes pueden deberse a la versatilidad estructural de los subsitios de unión a sustrato. Como sea, se requiere la determinación de la estructura tridimensional de HrGH45 para confirmar tal suposición. La multiespecificidad de HrGH45 la vuelve particularmente atractiva para aplicaciones biotecnológicas, ya que la capacidad de hidrólisis de las celulasas de interés comercial está restringida a actividad de endoglucanasa.

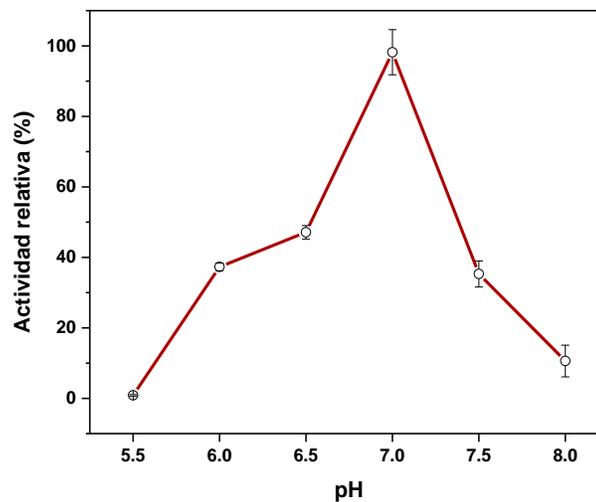
### ***Efecto del pH y temperatura sobre la actividad enzimática***

HrGH45 mostró máxima actividad glicohidrolítica a 45 °C y pH 7.0 usando 0.5 % (*p/v*) CMC como sustrato en mezclas de reacción preparadas con el amortiguador universal Britton-Robinson (40 mM acetato-fosfato-borato), Fig. 7. Bajo estas condiciones, la actividad enzimática fue dos veces menor que la encontrada cuando se determinó con el amortiguador A a 45 °C. Por esta razón y con el fin de comparar con otras celulasas, los ensayos de actividad se realizaron utilizando amortiguador A. El abatimiento de la actividad enzimática pudo deberse a la composición del medio de reacción, ya que la fuerza iónica y la(s) sal(es) del amortiguador afectan la actividad enzimática en sistemas de reacción acuosos por interacciones químicas específicas amortiguador-enzima [61,62].

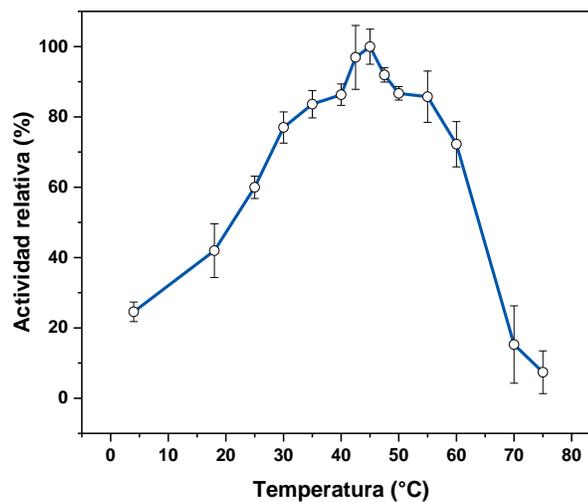
El pH *óptimo* de actividad (7.0) resultó ligeramente mayor que otros reportados para celulasas de origen similar, los cuales oscilan entre 5.5 y 6.5 [11,17–19,47,48,53–56]. En este trabajo se estudió la influencia del pH

sobre la actividad enzimática empleando el amortiguador universal Britton-Robinson, excluyendo así el efecto de diferentes sales sobre la celulasa y observando únicamente la dependencia con respecto al pH. El valor de temperatura *óptima* de actividad (45 °C) estuvo en armonía con otros previamente informados para glucanasas de origen similar, los cuales van de 35 a 50 °C [11,17–19,47,48,53–56]. Debido a su actividad a bajas temperaturas, la aplicación biotecnológica de HrGH45 es factible. De manera general, las endoglucanasas ácidas exhiben mayor actividad en el rango de pH de 4.0-5.5 y temperaturas de 35 a 55 °C, mientras que las celulasas neutras requieren de un pH que abarca de 5.5 a 8.0 y temperaturas de 40-60 °C [63].

**A**



**B**



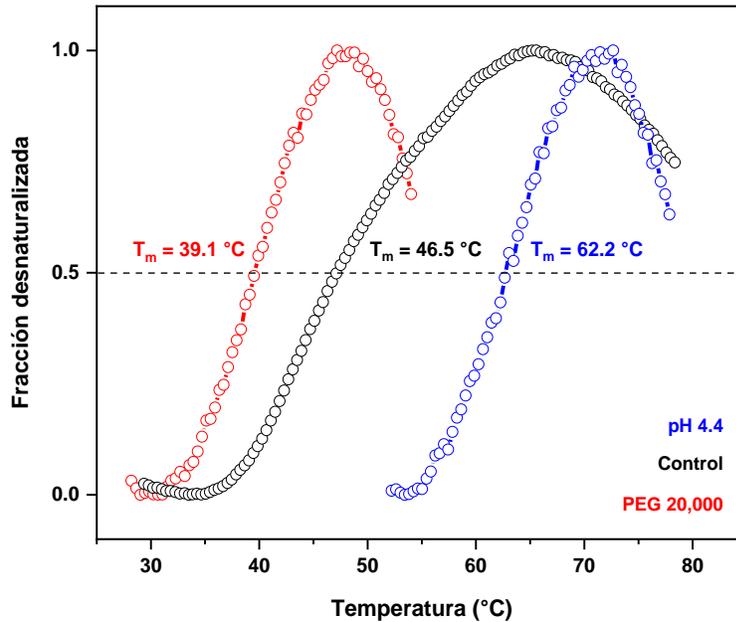
**Fig. 8.**

**Efecto del (A) pH y (B) temperatura sobre la actividad enzimática.** A pesar de que la actividad glicohidrolítica se evaluó en el intervalo de pH 3.0-10.0, no se detectó actividad de pH 3.0 a 5.0 ni de 9.0 a 10.0. Razón por la cual no se incluyen en la Fig. 8A. Los ensayos se realizaron por triplicado usando 0.5 % (p/v) CMC como sustrato. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  DE.

### ***Estabilidad térmica***

La temperatura de fusión ( $T_m$ ) de HrGH45 se determinó a través de ensayos de desplazamiento térmico basados en fluorescencia (TSA) monitoreando el despliegue de la celulasa a lo largo de una rampa de temperatura (25-98 °C) y probando sesenta y nueve ambientes químicos diferentes (Anexo 1). Los experimentos de TSA indicaron un valor de  $T_m$  de 46.5 °C para HrGH45. No obstante, la curva de fusión mostró una transición de desnaturalización lenta (35-65 °C), lo que sugirió la oligomerización de la enzima [31] (Fig. 9). Por otra parte, este valor de  $T_m$  se desplazó a 39.1 °C en 15 % (p/v) PEG 20,000 ( $\Delta T_m = -7.4$  °C) y a 62.2 °C en 0.5 M acetato de sodio pH 4.4 ( $\Delta T_m = +15.7$  °C). Estas dos condiciones influenciaron el proceso de despliegue de HrGH45 ya que sus termogramas mostraron transiciones de desnaturalización rápidas dentro de pequeños intervalos de temperatura, lo que sugirió que la proteína se encontraba fundamentalmente monodispersa [31]. No se observó transición de desnaturalización al probar el resto de los ambientes químicos. No obstante, en estos ensayos se encontró una alta señal de fluorescencia al inicio del experimento. Lo anterior sugirió que HrGH45 se desnaturalizó inmediatamente y expuso regiones hidrofóbicas que interaccionaron con el fluoróforo [31].

El valor de temperatura de fusión de 46.5 °C no fue sorprendente y estuvo en armonía con los resultados de la caracterización enzimática, donde HrGH45 mostró pérdida de actividad a temperaturas superiores que 45 °C. Aunque la mayor actividad celulolítica fue a pH 6.0, los experimentos de TSA revelaron un pH óptimo de 4.4 para la estabilidad de HrGH45. Estas observaciones sugieren que la celulasa requiere cierta flexibilidad para su actividad óptima, ya que los amortiguadores pueden aumentar el orden estructural y reducir la flexibilidad conformacional mediante la modulación del pH o la formación de interacciones químicas específicas con la proteína misma [31]. El efecto negativo del PEG 20,000 tampoco fue sorprendente, ya que se ha descrito que los polietilenglicoles desestabilizan a las proteínas en ensayos térmicos [64,65]. Comprender las bases moleculares de la termoestabilidad en las celulasas es complicado debido a la versatilidad estructural y a la gran diversidad de secuencias aminoacídicas que estas enzimas presentan. Sin embargo, se sugiere que la termoestabilidad de las endoglucanasas depende del patrón tridimensional adoptado [66].

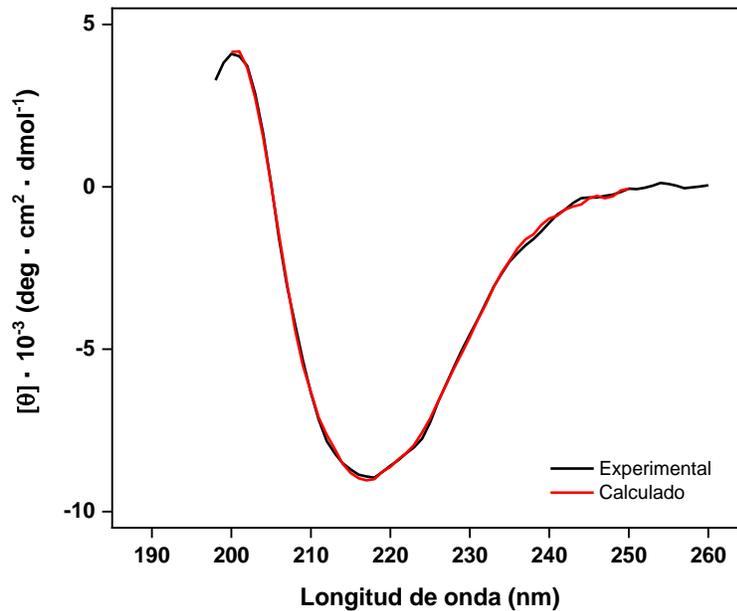


**Fig. 9.**

**Estabilidad térmica.** pH 4.4, 3  $\mu$ M HrGH45 en 0.5 M acetato de sodio pH 4.4; Control, 3  $\mu$ M HrGH45 en amortiguador A; PEG 20,000, 3  $\mu$ M HrGH45 en 15 % (p/v) PEG 20,000 en agua Milli-Q; Técnica, Termo-fluorescencia; Fluoróforo, SYPRO Orange.

### *Una celulasa rica en hojas $\beta$*

La espectroscopía de dicroísmo circular (DC) se utilizó para estudiar la estructura secundaria de HrGH45. El análisis por DC mostró un espectro en la región del UV-lejano característico de una proteína rica en hojas  $\beta$  con una banda positiva en 200 nm y una banda negativa ancha centrada en 218 nm acompañada de un pequeño hombro alrededor de 224 nm, Fig. 10. El contenido de elementos de estructura secundaria estimados a partir del espectro de DC de HrGH45, empleando el servidor BeStSel, fueron 9.1 % hélice  $\alpha$ , 38.6 % hoja  $\beta$ , 11.5 % giros y 40.8 % regiones sin estructura secundaria. Estas estimaciones fueron comparables con lo reportado para tres celulasas de *H. fulgens* [19], aunque mostraron ligeramente mayor contenido de hélice  $\alpha$  y hoja  $\beta$ .



**Fig. 10.**

**Estructura secundaria.** Muestra, Solución de proteína (0.2 mg/mL) en agua destilada; Rapidez de barrido, 10 nm/min; Ancho de banda, 1.0 nm; Tiempo de respuesta, 1 s. Los espectros se colectaron por triplicado a 25 °C y se promediaron para obtener el espectro final de HrGH45. El espectro calculado se obtuvo con el servidor BeStSel.

El servidor BeStSel predijo las propiedades de plegamiento de HrGH45 hasta el nivel de topología a partir de los resultados del análisis de DC. Este algoritmo sugirió, por analogía con su base de datos, que la clase estructural, la arquitectura y la topología de la enzima purificada eran  $\beta$ , barril- $\beta$  y endoglucanasas tipo Barwin, respectivamente. Barwin es una proteína básica con una masa molecular de 13.7 kDa que se aisló a partir de los extractos acuosos de las semillas de cebada [67]. La relación entre esta proteína y las celulasas se estableció en 1993 cuando se resolvió la estructura cristalina de la endoglucanasa V del hongo *Humicola insolens* [68]. En dicho trabajo se determinó que se trataba de una nueva celulasa cuya secuencia aminoacídica no presentaba similitud con otras reportadas. No obstante, su plegamiento tridimensional era similar a lo informado para la proteína Barwin. Con base en esta observación, la endoglucanasa V de *H. insolens* fue referida como una endoglucanasa tipo Barwin. Tiempo después, al extenderse y actualizarse la clasificación de familias de glicosil-hidrolasas de Henrissat, se estableció que la endoglucanasa V de *H. insolens* pertenecía a una nueva familia, la familia K, que posteriormente se denotó como familia 45 de glicosil-hidrolasas.

### *HrGH45 es una glicosil-hidrolasa de la familia 45*

Para elucidar la secuencia aminoacídica de HrGH45, la enzima se digirió utilizando una batería de diferentes proteasas. Los péptidos A-C (Tabla 4), generados después de la proteólisis, fueron idénticos con tres fragmentos de una endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa de 194 aminoácidos de *Haliotis discus discus* (UniProt ID: B6RB06); misma que pertenece a la familia 45 de las glicosil-hidrolasas. No se encontraron coincidencias al analizar los péptidos formados a partir de la digestión con el resto de las proteasas, ya que éstos pudieron estar decorados con glicanos estructurales o alguna otra modificación postraduccional que pudo desplazar su masa molecular fuera del intervalo de secuenciación [69].

Se identificó el gen que codifica a HrGH45 en el genoma de *H. rufescens* (Genome ID: 16745) [70] y se dedujo su secuencia aminoacídica. Lo anterior fue posible porque se utilizó el ARNm de la celulasa de *H. discus discus* (GenBank ID: EF103350) como referencia. Se encontraron los péptidos A-C en dicha secuencia deducida, siendo la cobertura de la detección del 27 %. La arquitectura del gen de HrGH45 constaba de tres exones y dos intrones, Fig. 11A, las uniones intrón-exón satisfacían la regla GT-AG para genes eucariontes [17]. Con base en lo anterior, se demostró que HrGH45 era biosintetizada por el abulón *per se* y no por microorganismos simbioses.

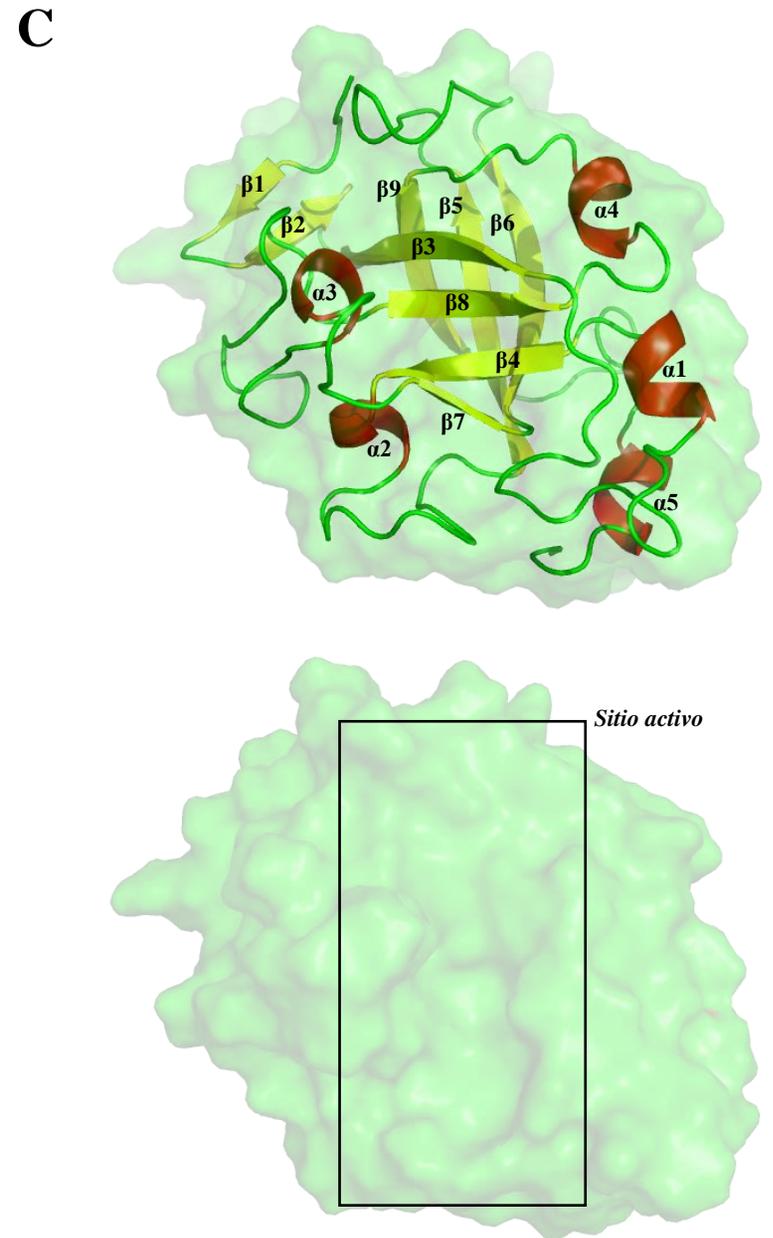
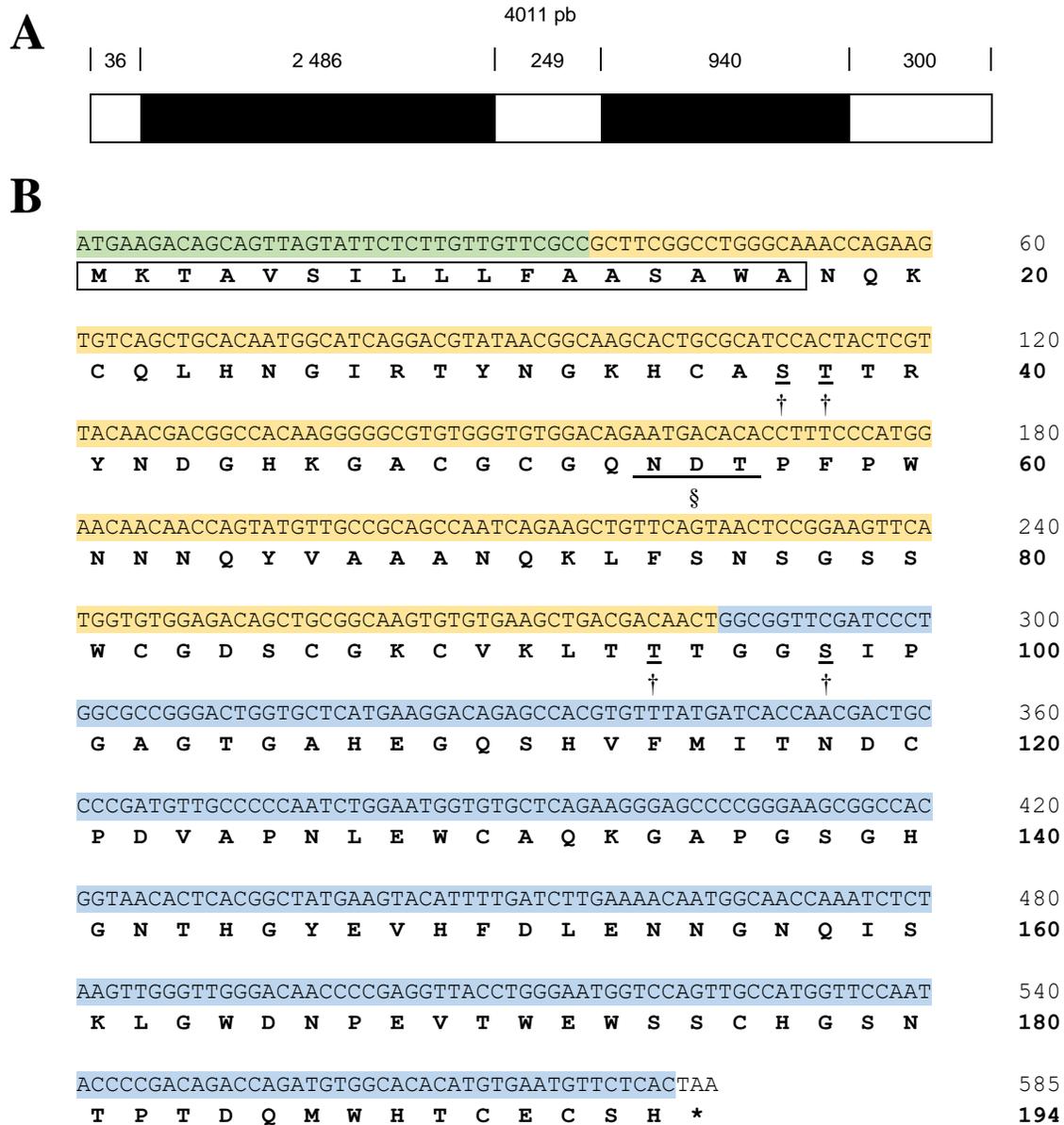
**Tabla 4.**

**Resumen del experimento de secuenciación.** Los péptidos A y B se formaron después de la digestión con tripsina. El péptido C se generó con Glu-C.

Péptido	Inicio-Fin	Secuencia	[M+H] <sup>+</sup>	Mr	
			Observado	Esperado	Calculado
A	34-46	K . HCASTTRYNDGHK . G	1487.6860	1486.6788	1488.6528
B	47-72	K . GACGCGQNDTPFPWNNNQYVAAANQK . L	2769.5900	2768.5828	2767.1867
C	154-168	E . NNGNQISKLGWDNPE . V	1684.8157	1683.8085	1684.7805

El gen de HrGH45 codifica una proteína de 194 aminoácidos con una masa molecular teórica de 20.9 kDa. No obstante, la región ubicada en el extremo N-terminal de la secuencia deducida, MKTAVSILLLLFAASAWA, fue predicha como un supuesto péptido señal de secreción por el servidor SignalP 5.0 [71]. Por tanto, se consideró que la celulasa madura constaba de 177 residuos de aminoácidos con una masa molecular calculada de 19.1 kDa y un pI teórico de 6.09. Esta masa molecular fue menor que la observada por espectrometría de masas MALDI-TOF (23.4 kDa). La inconsistencia es atribuible a la glicosilación, ya que se encontraron cuatro posibles sitios de *O*-glicosilación (Ser37, Thr38, Thr94 y Ser98) según lo predicho por el servidor NetOGlyc 4.0 [72]. Asimismo, se detectó un sequon típico de *N*-glicosilaciones (Asn-Xaa-Thr/Ser, Xaa ≠ Pro) en la secuencia de la proteína, Asn54-Asp55-Thr56. Curiosamente, el residuo Asn54 no fue predicho glicosilado según los análisis con el servidor NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). De cualquier forma, se demostró la naturaleza glicosilada de HrGH45. La Fig. 11B resume lo antes descrito.

El bajo peso molecular de HrGH45 (23.4 kDa) y las secuencias aminoacídicas de los péptidos A-C (Tabla 4) sugirieron fuertemente que la celulasa de *H. rufescens* pertenecía a la familia 45 de las glicosil-hidrolasas. Asimismo, el motivo T T X Y X D, que está involucrado en la catálisis de las GH45 [73], se conservó como T38-D43. A través de un alineamiento de secuencias se encontraron los dos residuos de Asp que funcionan como nucleófilo y base en las GH45: Asp43 y Asp151, respectivamente. Se observaron doce residuos de Cys y el servidor DISULFIND [74] los predijo como seis enlaces disulfuro. No se detectó ningún módulo de unión a carbohidratos. Estas últimas dos anotaciones son características típicas de las GH45. El punto isoelectrico teórico (pI = 6.09) no fue sorprendente. Al contrario, resultó lógico hasta cierto punto, ya que cuando se realizó la cromatografía de intercambio iónico utilizando amortiguador A (50 mM acetato de sodio pH 6.0 con 200 mM NaCl, 1 mM EDTA y 0.05 % *p/v* NaN<sub>3</sub>) como eluyente, HrGH45 no interactuó con las resinas. Ahora está claro por qué: la carga neta de la enzima era igual a cero. La secuencia deducida presentó alta identidad con las endo-1,4-β-D-glucanasas de *H. discus discus* (98 %, GenBank ID: ABO26608), *A. kurodai* (54 %, GenBank ID: BAP19116), *C. japonica* (53 %, GenBank ID: BAH23794), *Ampullaria crossean* (51 %, GenBank ID: ABR92638) y *M. edulis* (50 %, GenBank ID: CAC59694). Todas pertenecientes a la familia 45 de las glicosil-hidrolasas. En conjunto, estos hallazgos respaldaron el hecho de que HrGH45 es una GH45.



**Fig. 11.** **HrGH45.** (A) Gen de HrGH45. Los rectángulos blancos y negros indican exones e intrones, respectivamente. Los números arábigos muestran la longitud *-pb-* de cada elemento estructural del gen. (B) Secuencias nucleotídica y aminoacídica. La cadena polipeptídica deducida está representada por el código de aminoácidos de una sola letra y se muestra debajo de la secuencia de ADN. Los números de residuo de nucleótido y aminoácido se indican a la derecha de cada fila. El asterisco denota el codón de terminación de la traducción (TAA). El supuesto péptido señal de secreción está encerrado. Los sitios de glicosilación predichos están subrayados. Cada color en la secuencia nucleotídica representa un exón. (C) Modelo estructural generado por homología con el servidor Robetta [75].

### *Ensayos de cristalización*

Se montaron pruebas de cristalización de la celulosa purificada usando el método de difusión en fase de vapor en la modalidad de gota colgante. En la mayoría de las condiciones se observaron agregados que, si bien eran cristalinos, no alcanzaban a formar cristales. Se espera que con el tiempo surjan cristales adecuados para estudios por difracción de rayos X.

## COMENTARIOS FINALES

Diversas metodologías de purificación para celulasas de invertebrados marinos han sido desarrolladas en distintos grupos de investigación empleando combinaciones más o menos complejas de técnicas de separación convencionales (precipitación con sales, cromatografía en todas sus vertientes y electroforesis). Independientemente de la complejidad y el número de pasos en estos procedimientos, la estrategia de purificación empleada en este trabajo supone una alternativa sencilla y eficaz para remover una gran cantidad de proteínas contaminantes, como demuestran los análisis de pureza realizados.

El pequeño tamaño de las celulasas de la familia 45 de las glicosil-hidrolasas parece ser ventajoso en la realización de estudios de ingeniería de proteínas y cristalografía, ya que las proteínas de baja masa molecular generalmente se producen fácilmente en sistemas de expresión. De cualquier forma, obtener de manera recombinante a HrGH45 representaría una enorme ventaja para los estudios de cristalografía que se deseaban realizar en este trabajo. Asimismo, permitiría conocer el significado fisiológico de esta enzima y el papel de las glicosilaciones detectadas en su estructura.

Los invertebrados marinos biosintetizan una gran variedad de carbohidratasas; *e.g.*, mananasas, alginato liasas, laminarinasas, amilasas y celulasas. No obstante, la información general de estas enzimas en moluscos gasterópodos todavía es escasa en comparación con la de otras especies. La prevalencia de este conjunto de glicosil-hidrolasas en metazoarios marinos sugiere que estos organismos tienen una autonomía superior para la descomposición de biomasa que la pensada anteriormente.

Aunque el reemplazo de la gasolina con etanol celulósico puede disminuir notablemente el calentamiento global y los gases de efecto invernadero en la atmósfera, el elevado costo para hidrolizar polisacáridos de biomasa a azúcares fermentables sigue siendo un cuello de botella que debe resolverse antes de que el etanol celulósico pueda comercializarse de manera efectiva. Como los costos de obtención de las celulasas contribuyen sustancialmente al precio del bioetanol, son estrictamente necesarias nuevas celulasas más estables, más activas y, principalmente, más económicas.

## CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVA

*“We need science and we need the smartest minds...”*

**Frances H. Arnold**

Se desarrolló un método de purificación para HrGH45, la primera endo-1,4-β-D-glucanasa multiespecífica glicosilada trimérica y perteneciente a la familia 45 de las glicosil-hidrolasas de *H. rufescens*. HrGH45 se identificó como producto génico de este organismo, por lo que la presente investigación proporcionará las bases para su sobreexpresión. Lo anterior facilitará futuros estudios sobre la función biológica de HrGH45. Finalmente, este trabajo constituye un paso importante en el reconocimiento de biomoléculas con posible valor agregado a partir de los productos de desecho de la industria de abulón.

Como perspectiva se propone (i) elucidar la estructura tridimensional de HrGH45, (ii) caracterizar sus modificaciones postraduccionales e (iii) investigar su posible aplicación biotecnológica.

## ANEXOS

### KITS EMPLEADOS EN TERMOFLUORESCENCIA

#### Polímeros (HR2-227)

No.	Composición	Concentración inicial	Concentración final	Masa molecular
1	Jeffamine ED-2001 pH 7.0	50 % <i>p/v</i>	25 % <i>p/v</i>	~ 2 000
2	Jeffamine M-600 pH 7.0	50 % <i>v/v</i>	25 % <i>v/v</i>	~ 600
3	Etoxilato de pentaeritritol (3/4 EO/OH)	40 % <i>v/v</i>	20 % <i>v/v</i>	~ 270
4	Etoxilato de pentaeritritol (15/4 EO/OH)	50 % <i>v/v</i>	25 % <i>v/v</i>	~ 797
5	Propoxilato de pentaeritritol (5/4 PO/OH)			~ 426
6	Polietilenimina			~ 629
7	Poliacrilato de sodio 5 100	50 % <i>p/v</i>	25 % <i>p/v</i>	~ 5 100
8	PEG 200	100 %	50 % <i>v/v</i>	200
9	PEG 300			285 – 315
10	PEG 400			380 – 420
11	PEG 600			570 – 630
12	PEG 1,000	50 % <i>p/v</i>	25 % <i>p/v</i>	950 – 1 050
13	PEG 1,500			1 400 – 1 600
14	PEG 3,350			3 015 – 3 685
15	PEG 4,000			3 500 – 4 500
16	PEG 6,000			5 000 – 7 000
17	PEG 8,000			7 000 – 9 000
18	PEG 10,000			8 500 – 11 500
19	PEG 20,000	30 % <i>p/v</i>	15 % <i>p/v</i>	~ 16 000 – 24 000
20	Metoxi-PEG 550	100 %	50 %	~ 550
21	Metoxi-PEG 2,000	50 % <i>p/v</i>	25 % <i>p/v</i>	~ 2 000
22	Metoxi-PEG 5,000			~ 5 000
23	Polipropilenglicol P 400	100 %	50 % <i>v/v</i>	~ 400
24	Polivinilpirrolidona K 15	50 % <i>p/v</i>	25 % <i>p/v</i>	~ 10 000

PEG = Polietilenglicol.

**pH y sales amortiguadoras (HR2-241)**

No.	pH	Composición	Concentración inicial	Concentración final
1	2.2			
2	2.4			
3	2.6			
4	2.8			
5	3.0	H <sub>3</sub> Cit* / NaOH	1.0 M	0.5 M
6	3.2			
7	3.4			
8	3.6			
9	3.8			
10	4.0			
11	4.2			
12	4.4	AcONa 3H <sub>2</sub> O / HCl	1.0 M	0.5 M
13	4.6			
14	4.8			
15	5.0			
16	5.2			
17	5.4	Na <sub>3</sub> Cit 2H <sub>2</sub> O / HCl	1.0 M	0.5 M
18	5.6			
19	5.8			
20	6.0			
21	6.2			
22	6.4	NaCac** 3H <sub>2</sub> O / HCl	1.0 M	0.5 M
23	6.6			
24	6.8			
25	7.0			
26	7.2			
27	7.4	HEPES / HCl	1.0 M	0.5 M
28	7.6			
29	7.8			
30	8.0			
31	8.2			
32	8.4	TRIS / NaOH	1.0 M	0.5 M
33	8.6			
34	8.8			
35	9.0			
36	9.2			
37	9.4	CAPSO / NaOH	0.5 M	0.25 M
38	9.6			
39	9.8			
40	10.0			
41	10.2			
42	10.4	CAPS / NaOH	0.5 M	0.25 M
43	10.6			
44	10.8			
45	11.0			

\* Citrato, \*\* Cacodilato.

---

## REFERENCIAS

*“I believe that every defeat, every setback is a prelude to a greater achievement and victory...”*

**Shirin Ebadi**

1. Yoshioka, Y., Tanabe, T., y Iguchi, A. (2017) The presence of genes encoding enzymes that digest carbohydrates in coral genomes and analysis of their activities. *PeerJ*, **5**, e4087.
2. Moon, R.J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., y Youngblood, J. (2011) Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, **40** (7), 3941-3994.
3. Azizi-Samir, M.A.S., Alloin, F., y Dufresne, A. (2005) Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. *Biomacromolecules*, **6** (2), 612-626.
4. Islam, M.S., Chen, L., Sisler, J., y Tam, K.C. (2018) Cellulose nanocrystal (CNC)–inorganic hybrid systems: Synthesis, properties and applications. *Journal of Materials Chemistry B*, **6**, 864-883.
5. Trache, D., Hussin, M.H., Haafiz, M.K.M., y Thakur, V.K. (2017) Recent progress in cellulose nanocrystals: Sources and production. *Nanoscale*, **9** (5), 1763-1786.

6. Arantes, V., y Saddler, J.N. (2010) Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: The role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, **3** (4), 11.
7. Tanimura, A., Liu, W., Yamada, K., Kishida, T., y Toyohara, H. (2013) Animal cellulases with a focus on aquatic invertebrates. *Fisheries Science*, **79**, 1-13.
8. Quiroz-Castañeda, R.E., Folch-Mallol, J.L., y Chandel, A. (2013) Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars, in *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass. Techniques, Applications and Commercialization.*, InTech, pp. 119-155.
9. Sukharnikov, L.O., Cantwell, B.J., Podar, M., y Zhulin, I.B. (2011) Cellulases: Ambiguous nonhomologous enzymes in a genomic perspective. *Trends in Biotechnology*, **29** (10), 473-479.
10. Phitsuwan, P., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., Kyu, K.L., y Ratanakhanokchai, K. (2013) Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy. *Folia Microbiologica*, **58**, 163-176.
11. Rahman, M.M., Inoue, A., y Ojima, T. (2014) Characterization of a GHF45 cellulase, AkEG21, from the common sea hare *Aplysia kurodai*. *Frontiers in Chemistry*, **2** (60), 13.
12. Chang, W.H., y Lai, A.G. (2018) Mixed evolutionary origins of endogenous biomass-depolymerizing enzymes in animals. *BMC Genomics*, **19** (483), 10.
13. Behera, B.C., Sethi, B.K., Mishra, R.R., Dutta, S.K., y Thatoi, H.N. (2017) Microbial cellulases – diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, **15** (1), 197-210.
14. Payne, C.M., Knott, B.C., Mayes, H.B., Hansson, H., Himmel, M.E., Sandgren, M., Ståhlberg, J., y Beckham, G.T. (2015) Fungal cellulases. *Chemical Reviews*, **115** (3), 1308-1448.
15. Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, **280** (2), 309-316.
16. Henrissat, B., y Bairoch, A. (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*, **316** (2), 695-696.
17. Suzuki, K.-I., Ojima, T., y Nishita, K. (2003) Purification and cDNA cloning of a cellulase from abalone *Haliotis discus hannai*. *European Journal of Biochemistry*, **270** (4), 771-778.

18. Tao, Z.-P., Sun, L.-C., Qiu, X.-J., Cai, Q.-F., Liu, G.-M., Su, W.-J., y Cao, M.-J. (2016) Preparation, characterisation and use for antioxidant oligosaccharides of a cellulase from abalone (*Haliotis discus hannai*) viscera. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **96** (9), 3088-3097.
19. Hernández-Santoyo, A., Rojo-Domínguez, A., García-Hernández, E., y Rodríguez-Romero, A. (2000) Physicochemical properties and behavior in solution of three cellulases from *Haliotis fulgens*. *Protein and Peptide Letters*, **7** (6), 389-396.
20. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., y Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, **150** (1), 76-85.
21. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** (5259), 680-685.
22. Wood, T.M., y Bhat, K.M. (1988) Methods for measuring cellulase activities. *Methods in Enzymology*, **160**, 87-112.
23. Ghose, T.K. (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, **59** (2), 257-268.
24. Deshpande, M.V., Eriksson, K.-E., y Pettersson, L.G. (1984) An assay for selective determination of exo-1,4,- $\beta$ -glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes. *Analytical Biochemistry*, **138** (2), 481-487.
25. Pinheiro, G.L., de Azevedo-Martins, A.C., Albano, R.M., de Souza, W., y Frases, S. (2017) Comprehensive analysis of the cellulolytic system reveals its potential for deconstruction of lignocellulosic biomass in a novel *Streptomyces* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **101** (1), 301-319.
26. Yuan, S.-F., Wu, T.-H., Lee, H.-L., Hsieh, H.-Y., Lin, W.-L., Yang, B., Chang, C.-K., Li, Q., Gao, J., Huang, C.-H., Ho, M.-C., Guo, R.-T., y Liang, P.-H. (2015) Biochemical characterization and structural analysis of a bifunctional cellulase/xylanase from *Clostridium thermocellum*. *The Journal of Biological Chemistry*, **290** (9), 5739-5748.
27. DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., y Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, **28** (3), 350-356.

28. Cano-Ramírez, C., Santiago-Hernández, A., Rivera-Orduña, F.N., Pineda-Mendoza, R.M., Zúñiga, G., y Hidalgo-Lara, M.E. (2017) One-step zymogram method for the simultaneous detection of cellulase/xylanase activity and molecular weight estimation of the enzyme. *Electrophoresis*, **38** (3-4), 447-451.
29. Champasri, C., Champasri, T., y Woranam, K. (2015) Purification, biochemical characterization of a *Macrotermes gilvus* cellulase and zymogram analysis. *Asian Journal of Biochemistry*, **10** (5), 190-204.
30. Britton, H.T.S., y Robinson, R.A. (1931) Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *Journal of the Chemical Society*, **0** (0), 1456-1462.
31. Boivin, S., Kozak, S., y Meijers, R. (2013) Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. *Protein Expression and Purification*, **91** (2), 192-206.
32. Kelly, S.M., y Price, N.C. (1997) The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1338** (2), 161-185.
33. Micsonai, A., Wien, F., Bulyáki, É., Kun, J., Moussong, É., Lee, Y.-H., Goto, Y., Réfrégiers, M., y Kardos, J. (2018) BeStSel: A web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Research*, **46** (W1), W315-W322.
34. Micsonai, A., Wien, F., Kernya, L., Lee, Y.-H., Goto, Y., Réfrégiers, M., y Kardos, J. (2015) Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112** (24), E3095-3103.
35. Ojima, T., Rahman, M.M., Kumagai, Y., Nishiyama, R., Narsico, J., y Inoue, A. (2018) Polysaccharide-degrading enzymes from marine gastropods. *Methods in Enzymology*, **605**, 457-497.
36. Watanabe, H., Noda, H., Tokuda, G., y Lo, N. (1998) A cellulase gene of termite origin. *Nature*, **394**, 330-331.
37. Rhodes, D.G., y Laue, T.M. (2009) Determination of protein purity. *Methods in Enzymology*, **463**, 677-689.
38. Gotte, G., y Libonati, M. (2014) Protein oligomerization, in *Oligomerization of Chemical and Biological Compounds* (eds.Lesieur, C.), InTech, pp. 239-278.

39. Watt, A.D., Perez, K.A., Rembach, A., Sherrat, N.A., Hung, L.W., Johanssen, T., McLean, C.A., Kok, W.M., Hutton, C.A., Fodero-Tavoletti, M., Masters, C.L., Villemagne, V.L., y Barnham, K.J. (2013) Oligomers, fact or artefact? SDS-PAGE induces dimerization of  $\beta$ -amyloid in human brain samples. *Acta Neuropathologica*, **125** (4), 549-564.
40. Rivier, J., y McClintock, R. (1983) Reversed-phase high-performance liquid chromatography of insulins from different species. *Journal of Chromatography*, **268** (1), 112-119.
41. Chen, Y., Mant, C.T., y Hodges, R.S. (2002) Determination of stereochemistry stability coefficients of amino acid side-chains in an amphipathic alpha-helix. *The Journal of Peptide Research: Official Journal of the American Peptide Society*, **59** (1), 18-33.
42. Kovacs, J.M., Mant, C.T., Kwok, S.C., Osguthorpe, D.J., y Hodges, R.S. (2006) Quantitation of the nearest-neighbour effects of amino acid side-chains that restrict conformational freedom of the polypeptide chain using reversed-phase liquid chromatography of synthetic model peptides with L- and D-amino acid substitutions. *Journal of Chromatography A*, **1123** (2), 212-224.
43. Hames, B.D. (1998) *Gel electrophoresis of proteins: A practical approach*, Oxford University Press, New York.
44. Westermeier, R. (2002) *Electrophoresis in practice: A guide to methods and applications of DNA and protein separations*, Wiley-VCH, Weinheim.
45. Nguyen, M., y Strong, W. (2007) Application of the Experion<sup>TM</sup> automated electrophoresis system to glycoprotein visualization and analysis. *Bio-Rad Laboratories, Inc. Bulletin 5453*, 6.
46. Clark, A.E., Kaleta, E.J., Arora, A., y Wolk, D.M. (2013) Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, **26** (3), 547-603.
47. Nishida, Y., Suzuki, K.-I., Kumagai, Y., Tanaka, H., Inoue, A., y Ojima, T. (2007) Isolation and primary structure of a cellulase from the Japanese sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Biochimie*, **89** (8), 1002-1011.
48. Tsuji, A., Tominaga, K., Nishiyama, N., y Yuasa, K. (2013) Comprehensive enzymatic analysis of the cellulolytic system in digestive fluid of the sea hare *Aplysia kurodai*. Efficient glucose release from sea

- lettuce by synergistic action of 45 kDa endoglucanase and 210 kDa  $\beta$ -glucosidase. *PLoS ONE*, **8** (6), e65418.
49. Lombard, J. (2016) The multiple evolutionary origins of the eukaryotic N-glycosylation pathway. *Biology Direct*, **11** (36), 31.
  50. Macek, B., Forchhammer, K., Hardouin, J., Weber-Ban, E., Grangeasse, C., y Mijakovic, I. (2019) Protein post-translational modifications in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, **17** (11), 651-664.
  51. Solá, R.J., y Griebenow, K. (2009) Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **98** (4), 1223-1245.
  52. Goettig, P. (2016) Effects of glycosylation on the enzymatic activity and mechanisms of proteases. *International Journal of Molecular Sciences*, **17** (12), 24.
  53. An, T., Dong, Z., Lv, J., Liu, Y., Wang, M., Wei, S., Song, Y., Zhang, Y., y Deng, S. (2015) Purification and characterization of a salt-tolerant cellulase from the mangrove oyster, *Crassostrea rivularis*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **47** (4), 299-305.
  54. Ueda, M., Maruyama, T., Kawasaki, K., Nakazawa, M., y Sakaguchi, M. (2016) Purification, characterization, and gene cloning of a cold-adapted endo-1,4- $\beta$ -glucanase from *Bellamyia chinensis laeta*. *Molecular Biotechnology*, **58** (4), 241-250.
  55. Li, Y.-H., Guo, R., Yin, Q.-Y., Ding, M., Zhang, S.-L., Xu, G.-J., y Zhao, F.-K. (2005) Purification and characterization of two endo-beta-1,4-glucanases from mollusca, *Ampullaria crosseana*. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, **37** (10), 702-708.
  56. Xu, B., Hellman, U., Ersson, B., y Janson, J.C. (2000) Purification, characterization and amino-acid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo-beta-1,4-glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis*. *European Journal of Biochemistry*, **267** (16), 4970-4977.
  57. Sakamoto, K., y Toyohara, H. (2009) Molecular cloning of glycoside hydrolase family 45 cellulase genes from brackish water clam *Corbicula japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, **152** (4), 390-396.

58. Lee, C.M., Lee, Y.S., Seo, S.H., Yoon, S.H., Kim, S.J., Hahn, B.S., Sim, J.S., y Koo, B.S. (2014) Screening and characterization of a novel cellulase gene from the gut microflora of *Hermetia illucens* using metagenomic library. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24** (9), 1196-1206.
59. Potprommanee, L., Wang, X.-Q., Han, Y.-J., Nyobe, D., Peng, Y.-P., Huang, Q., Liu, J.-Y., Liao, Y.-L., y Chang, K.-L. (2017) Characterization of a thermophilic cellulase from *Geobacillus* sp. HTA426, an efficient cellulase-producer on alkali pretreated of lignocellulosic biomass. *PloS One*, **12** (4), e0175004.
60. Gelhaye, E., Gehin, A., Benoit, L., y Petitedemange, H. (1993) Effects of cellobiose on cellulose colonization by a mesophilic, cellulolytic *Clostridium* (strain C401). *Microbiology*, **139** (11), 2819-2824.
61. Bauduin, P., Nohmie, F., Touraud, D., Neueder, R., Kunz, W., y Ninham, B.W. (2006) Hofmeister specific-ion effects on enzyme activity and buffer pH: Horseradish peroxidase in citrate buffer. *Journal of Molecular Liquids*, **123** (1), 14-19.
62. Schmidt, J., Wei, R., Oeser, T., Belisário-Ferrari, M.R., Barth, M., Then, J., y Zimmermann, W. (2016) Effect of Tris, MOPS, and phosphate buffers on the hydrolysis of polyethylene terephthalate films by polyester hydrolases. *FEBS Open Bio*, **6** (9), 919-927.
63. Roy Choudhury, A.K. (2017) Various ecofriendly finishes, in *Principles of Textile Finishing* (eds.Roy Choudhury, A.K.), Woodhead Publishing, pp. 467-525.
64. Bhat, R., y Timasheff, S.N. (1992) Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols. *Protein Science*, **1** (9), 1133-1143.
65. Lee, L.L.Y., y Lee, J.C. (1987) Thermal stability of proteins in the presence of poly(ethylene glycols). *Biochemistry*, **26** (24), 7813-7819.
66. Yennamalli, R.M., Rader, A.J., Wolt, J.D., y Sen, T.Z. (2011) Thermostability in endoglucanases is fold-specific. *BMC Structural Biology*, **11** (1), 10.
67. Ludvigsen, S., y Poulsen, F.M. (1992) Three-dimensional structure in solution of barwin, a protein from barley seed. *Biochemistry*, **31** (37), 8783-8789.
68. Davies, G.J., Dodson, G.G., Hubbard, R.E., Tolley, S.P., Dauter, Z., Wilson, K.S., Hjort, C., Mikkelsen, J.M., Rasmussen, G., y Schülein, M. (1993) Structure and function of endoglucanase V. *Nature*, **365**, 362-464.

69. Parker, C.E., Mocanu, V., Mocanu, M., Dicheva, N., y Warren, M.R. (2010) Mass spectrometry for post-translational modifications, in *Neuroproteomics* (eds. Alzate, O.), CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).
70. Masonbrink, R.E., Purcell, C.M., Boles, S.E., Whitehead, A., Hyde, J.R., Seetharam, A.S., y Severin, A.J. (2019) An annotated genome for *Haliotis rufescens* (red abalone) and resequenced green, pink, pinto, black, and white abalone species. *Genome Biology and Evolution*, **11** (2), 431-438.
71. Almagro-Armenteros, J.J., Tsirigos, K.D., Sønderby, C.K., Petersen, T.N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., y Nielsen, H. (2019) SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, **37** (4), 420-423.
72. Steentoft, C., Vakhrushev, S.Y., Joshi, H.J., Kong, Y., Vester-Christensen, M.B., Schjoldager, K.T., Lavrsen, K., Dabelsteen, S., Pedersen, N.B., Marcos-Silva, L., Gupta, R., Bennett, E.P., Mandel, U., Brunak, S., Wandall, H.H., Levery, S.B., y Clausen, H. (2013) Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *The EMBO journal*, **32** (10), 1478-1488.
73. Girard, C., y Jouanin, L. (1999) Molecular cloning of cDNAs encoding a range of digestive enzymes from a phytophagous beetle, *Phaedon cochleariae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **29** (12), 1129-1142.
74. Ceroni, A., Passerini, A., Vullo, A., y Frasconi, P. (2006) DISULFIND: A disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic Acids Research*, **34**, W177-W181.
75. Kim, D.E., Chivian, D., y Baker, D. (2004) Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Research*, **32**, W526-W531.