


Efecto simultáneo de la temperatura y el pH en la actividad proteolítica de la proteasa ácida de *Aspergillus oryzae*

Dávalos Martínez Juana Monserrat, Tello-Solís Salvador Ramón*

Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Química. Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco # 186, Iztapalapa, Ciudad de México, C.P. 09310. México.

*Autor para correspondencia: srts@xanum.uam.mx

ORCID : 0000-0001-9172-4730

Recibido:

27/mayo/2023

Aceptado:

04/noviembre/2023

Palabras clave:

Aspergillus oryzae,
actividad,

Keywords:

Aspergillus oryzae,
activity

RESUMEN

En este trabajo se purificó, a partir de una muestra comercial, una proteasa ácida de *Aspergillus oryzae*. Se determinó por el método de DuBois que la proteasa, es una glicoproteína, que contiene aproximadamente 15% en masa de hexosas neutras. Se estudió la actividad enzimática de la proteasa ácida de *Aspergillus oryzae* en función del pH y la temperatura de manera simultánea, empleando un plan de trabajo basado en el método de análisis de superficie de respuesta utilizando un polinomio de segundo orden. Se determinaron los valores de los coeficientes del polinomio a partir de los valores codificados y de los resultados de la medición de la actividad enzimática (específica o en porcentaje). Se observó que la dependencia de la temperatura y el pH en la actividad es muy importante y que las condiciones óptimas de actividad de la proteasa ácida de *Aspergillus oryzae*, fueron a pH 2.5 y una temperatura de 40 °C.

ABSTRACT

In this work, an acid protease from *Aspergillus oryzae* was purified from a commercial sample. It was shown by the DuBois method that the protease is a glycoprotein that contains approximately 15% by mass of neutral hexoses. The enzymatic activity of the acid protease of *Aspergillus oryzae* was studied as a function of pH and temperature simultaneously, employing a work plan based on the response surface analysis method using a second order polynomial. The values of the coefficients of the polynomial from the coded values and from the results of the measurement of the enzymatic activity (specific or in percentage). It was observed that the dependence of the temperature and the pH in the activity is very important and that the optimal conditions of activity of the acid protease of *Aspergillus oryzae*, were at pH 2.5 and a temperature of 40 °C.

Introducción

Proteasas ácidas

Las proteasas ácidas se encuentran distribuidas en la naturaleza, tanto en plantas, como en animales y microorganismos. Se consideran proteasas ácidas a aquellas enzimas proteolíticas que: i) Su pH óptimo se encuentra en el intervalo de pH de 2 a 5, ii) Son insensibles al diisopropilfosfofluoridato (DFP), iii) Son insensibles a compuestos metálicos quelantes, y iv) Son insensibles a venenos sulfhidrúlicos (Tello-Solís, 1995). A este tipo de enzimas corresponden, por ejemplo, la pepsina y renina de origen animal (Bovey y Yanari, 1960; Jøllès y Jøllès, 1968). La característica principal de estas enzimas es su especificidad hacia la hidrólisis de ciertos enlaces peptídicos, principalmente: Glu-Asn, Glu-Lys, Asp-Pro, Phe-Phe, Ala-Leu, Ser-Thr, Phe-Tyr (Fruto, 1971), lo que permite su utilización en el cuajado de la leche, sin continuar con una proteólisis extensiva de los fragmentos de caseína (Jollès *et al.*, 1962).

La mayor parte de las proteasas ácidas de origen microbiano se obtienen de forma extracelular, a partir de sus medios de cultivo. Se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes organismos correspondientes a los géneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Paecilomyces* y *Trametes*. Los procedimientos de purificación de estas enzimas se basan en varias combinaciones de precipitación fraccionada, extracción con disolventes, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y electroforesis (Tello-Solís, 1995). Las etapas de purificación generalmente se llevan a cabo en la zona de pH donde estas enzimas presentan su actividad proteolítica, es decir, en intervalos de pH de 2 a 6.

En general, las proteasas ácidas de origen microbiano, presentan las siguientes propiedades: El contenido de aminoácidos básicos es menor que el de aminoácidos ácidos, lo que origina el fuerte carácter ácido de la proteína. Los puntos isoeléctricos para la mayoría de las proteasas ácidas se encuentran en valores de pH de 3 a 3.8 (Ichishima y Yoshida, 1965a). Tanto las proteasas ácidas microbianas, como las de origen animal, tienen un total de aminoácidos que varía entre 290 y 340 residuos, con una masa molar en el intervalo de 35 000 a 42 000 Da. El contenido de cisteína y metionina es menor que en las pepsinas (Ichishima y Yoshida, 1965b). No se ha observado que contengan fósforo inorgánico, mientras que la pepsina tiene un grupo fosfato por molécula. La especificidad es principalmente hacia la hidrólisis de enlaces peptídicos, especialmente los adyacentes a alanina, leucina y tirosina.

El sitio activo de las proteasas ácidas se caracteriza por la presencia de dos residuos de ácido aspártico, uno de los cuales es sensible a compuestos epóxicos (Hartsuk y Tang, 1972), mientras que el otro es sensible a compuestos diazo en presencia de Cu^{2+} (Rajagopalan *et al.*, 1966), produciendo ambos tipos de compuestos inhibición en la actividad catalítica.

En nuestro laboratorio se han aislado, purificado y caracterizado, tanto en estudios de actividad como de estructura secundaria, proteasas ácidas de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger* (Tello-Solís *et al.*, 1994; Tello-Solís, 1995) y *Aspergillus saitoi* (Tello-Solís, 2003).

En este trabajo se determinó la actividad enzimática de la proteasa ácida de *Aspergillus oryzae* frente a hemoglobina, variando simultáneamente la temperatura y el pH, examinando el proceso por un método de superficie de respuesta.

Metodología

Enzima

La proteasa ácida de *Aspergillus oryzae*, se obtuvo de un extracto comercial lote 27F0297 de Sigma Chemical Co, San Luis E.U.A. Los demás reactivos fueron grado analítico de J.T. Baker, Merck o Sigma-Aldrich. Se utilizó agua desionizada rutinariamente.

Purificación de la proteasa ácida de *Aspergillus oryzae*

Una masa de 0.2 gramos del extracto comercial de proteasa ácida de *Aspergillus oryzae* fue disuelto en 20 mL de regulador de acetatos 0.05M, pH 4.0, filtrado por membrana Millipore y aplicado a una columna de filtración en gel TSK-HW 50 F (2.5 x 54 cm) (Merck, Alemania), acoplada a un sistema de colección LKB. La columna fue equilibrada con regulador de acetatos 0.05 M, pH 4.0. La elución se llevó a cabo en el mismo regulador y las fracciones con actividad proteolítica, frente a hemoglobina al 2% (m/v), en regulador de acetatos 0.05M pH4, fueron unidas en una nueva fracción, concentradas y recromatografiadas bajo las mismas condiciones, las nuevas fracciones con actividad se juntaron en una sola fracción llamada RFG y concentradas por ultrafiltración. (Resultados no mostrados).

Actividad proteolítica

La actividad proteolítica fue rutinariamente ensayada por una modificación del método de Anson (Anson, 1938), usando como sustrato hemoglobina (Sigma) al 2% (m/v) (desnaturalizada previamente por calentamiento a 60 °C), pH 2.5 en un regulador de fosfatos 0.05 M.

Un mililitro de sustrato fue incubado con 150 μ L de la disolución de la enzima durante 10 minutos a 40 °C. La reacción fue detenida por adición de 2 mL de una disolución acuosa de ácido tricloroacético al 10 % (m/v). El precipitado resultante fue removido por centrifugación a 500 rpm, seguido de filtración a través de papel filtro Whatman No. 40. La absorbencia del sobrenadante fue medida a 280 nm en una celda de 1 cm de recorrido óptico. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que produce un aumento en 0.001 unidades de absorbencia por minuto, bajo las condiciones del ensayo.

La actividad enzimática fue determinada de la siguiente manera:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\Delta \text{abs}(280\text{nm})(1000)}{C \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)(10 \text{ min})(V \text{ mL})}$$

$$\text{Actividad Específica} = \frac{U}{\text{mg}}$$

donde: Δ abs = absorbencia muestra a 280 nm - absorbencia testigo a 280 nm, C concentración de la enzima en mg/mL, V volumen en mL de la disolución de enzima añadido.

El efecto del pH en la actividad proteolítica frente a hemoglobina al 2 % en masa, fue ensayado similarmente en el intervalo de pH de 1.09 a 3.91. Se utilizó un regulador 0.05M fosfatos para preparar la hemoglobina a pH 2.5, 3.5, y 3.91, y un regulador 0.05M Glicina/HCl para preparar la hemoglobina a pH 1.09 y 1.5.

Determinación de carbohidratos

El contenido de carbohidratos (hexosas neutras) fue determinado por el método de DuBois *et al.* (1965). Para la curva estándar se preparó una disolución "madre" de glucosa 20 mg/mL. Y se prepararon, por triplicado, 25 mL de cada una de las siguientes disoluciones de glucosa: 8, 12, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70 y 80 μ g/mL. (Resultados no mostrados). Se mezclaron vigorosamente: 1000 μ L de disolución de glucosa + 100 μ L de fenol al 20% (**reacción exotérmica**) + 5mL de ácido sulfúrico concentrado (**reacción exotérmica**), la disolución resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente y se leyó la absorbencia a 490 nm.

Determinación de carbohidratos en muestra problema

Cada disolución de muestra problema se realizó por triplicado. Se mezclaron vigorosamente 1000 μ L de disolución de muestra problema + 100 μ L de fenol al 20% (**reacción exotérmica**) + 5mL de ácido sulfúrico concentrado, (**reacción exotérmica**), la disolución

resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente y se leyó absorbencia a 490 nm.

Determinación de la concentración de proteína

Durante las diferentes etapas de purificación y de la prueba de actividad, la concentración en disolución de proteína total de *Aspergillus oryzae* fue calculada con la ley de Lambert y Beer ($\text{Abs} = A_{1\text{cm}}^{1\%} bc$), a partir de la lectura de la absorbencia a 280 nm, se utilizó la absorbencia específica, $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ de 11.1, reportada por Tsujita y Endo (1976).

Ultrafiltración

La ultrafiltración se llevó a cabo utilizando una membrana 10K (PLGC) en una celda 6Q, con flujo de Nitrógeno y agitación constante. Se logró una reducción de once veces el volumen de la fracción RFG de la enzima, la concentración final fue de 0.221mg/mL.

Resultados y discusión

Modelo de Superficie de Respuesta

La metodología de superficies de respuesta (MSR), es un conjunto de técnicas estadísticas útiles para modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés es influida por varias variables, y el objetivo es optimizar esta respuesta (Montgomery, 1991).

En la mayoría de los problemas, la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes se desconocen; por ello, el primer paso consiste en determinar una aproximación apropiada a la relación funcional real entre Z_c (en este caso, Z_c es la actividad enzimática) y el conjunto de dos variables independientes X (es el pH) y Y (es la temperatura). Por lo general, se emplea un polinomio de orden bajo sobre alguna región de las variables independientes. Si la respuesta es descrita adecuadamente por una función lineal de las variables independientes, la función de aproximación es el modelo de segundo orden:

$$Z_c = b_0X^2 + b_1Y^2 + b_2XY + b_3X + b_4Y + b_5 \quad (1)$$

donde Z_c es la respuesta estimada, X y Y son los valores de las variables, por ejemplo, de los valores codificados de X y Y respectivamente, y b_0 , b_1 , b_2 , b_3 , b_4 y b_5 son los coeficientes estimados los cuales dependen del efecto de las variables y sus interacciones (Montgomery, 1991).

Determinación de Hexosas Neutras: Método DuBois

Se determinó que la proteasa ácida de *Aspergillus oryzae*, contiene aproximadamente 15 % en masa de hexosas neutras.

Actividad enzimática en función del pH y la temperatura para la proteasa ácida de *Aspergillus oryzae*

En la tabla 1 se presentan los valores codificados y reales de temperatura y pH, así como, la actividad enzimática de la proteasa ácida de *Aspergillus oryzae* medida frente a hemoglobina al 2 % en masa.

Tabla 1. Influencia del pH y la temperatura en la actividad proteolítica de la proteasa ácida de *Aspergillus oryzae*, frente a hemoglobina. E: ensayo, Vc: valor codificado, Va: valor actual, Ae: Actividad específica, %Ae: porcentaje de actividad específica.

E	Vc	Vc	Va	Va	Ae	%Ae
	X	Y	pH	T	(u/mg)	
				(°C)		
1	+1	+1	3.5	45	0.56	6.62
2	+1	+1	3.5	35	4.33	51.62
3	-1	-1	1.5	35	0	0
4	-1	-1	1.5	45	0.56	6.73
5	0	0	2.5	40	8.21	97.82
6	0	0	2.5	40	8.21	97.79
7	0	0	2.5	40	8.11	96.63
8	0	0	2.5	40	8.39	100.0
9	0	0	2.5	40	8.28	98.66
10	0	0	2.5	40	8.31	98.98
11	+1.41	+1.41	3.91	41.41	2.73	32.54
12	-1.41	-1.41	1.09	38.59	0	0

Como se puede observar en la tabla 1, el máximo de actividad enzimática, de la proteasa ácida de *Aspergillus oryzae*, ocurrió a una temperatura de 40 °C y un pH de 2.5.

Superficie de Respuesta

Una vez obtenidos los valores de actividad para la proteasa ácida de *Aspergillus oryzae*, es posible calcular mediante una función general de segundo orden en dos dimensiones la superficie de respuesta.

$$Z_c = b_0X^2 + b_1Y^2 + b_2XY + b_3X + b_4Y + b_5 \quad (1)$$

Donde:

X= Valor codificado (pH)

Y= Valor codificado (temperatura)

Z_c= Actividad Enzimática (U/mg ó %)

b₀, b₁, b₂, b₃, b₄ y b₅ son los coeficientes estimados los cuales dependen del efecto de los valores codificados de X y Y.

Este modelo matemático nos permitió establecer la relación de los efectos producidos por los valores codificados de X y Y sobre el grado de hidrólisis. Para obtener el valor de cada uno de los coeficientes, fue necesario resolver la siguiente matriz utilizando el programa *Mathematica* (Meader, 1991):

$$\begin{Bmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ b_4 \\ b_5 \end{Bmatrix} = \begin{bmatrix} \overline{X^4} & \overline{X^2Y^2} & \overline{X^3Y} & \overline{X^3} & \overline{X^2Y} & \overline{X^2} \\ \overline{X^2Y^2} & \overline{Y^4} & \overline{XY^3} & \overline{XY^2} & \overline{Y^3} & \overline{Y^2} \\ \overline{X^3Y} & \overline{XY^3} & \overline{X^2Y^2} & \overline{X^2Y} & \overline{XY^2} & \overline{XY} \\ \overline{X^3} & \overline{XY^2} & \overline{X^2Y} & \overline{X^2} & \overline{XY} & \overline{X} \\ \overline{X^2Y} & \overline{Y^3} & \overline{XY^2} & \overline{XY} & \overline{Y^2} & \overline{Y} \\ \overline{X^2} & \overline{Y^2} & \overline{XY} & \overline{X} & \overline{Y} & \overline{1} \end{bmatrix}^{-1} \begin{Bmatrix} \overline{X^2Z} \\ \overline{Y^2Z} \\ \overline{XYZ} \\ \overline{XZ} \\ \overline{YZ} \\ \overline{Z} \end{Bmatrix}$$

En la tabla 2 se presentan los resultados de la operación matricial para la obtención de los coeficientes utilizados en el polinomio (1), tanto para la actividad específica como para el % de actividad de la proteasa ácida de *Aspergillus oryzae*.

Tabla 2. Valores de los coeficientes del polinomio (1).

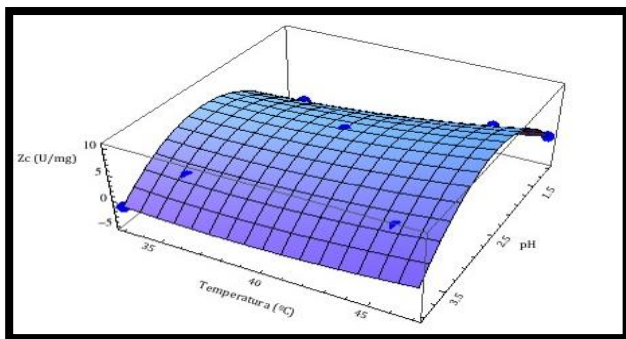
	Coeficientes (con Z en U/mg)	Coeficientes (con Z en %)
b ₀	7.69	91.65
b ₁	1.31	15.62
b ₂	-0.57	-6.83
b ₃	0.60	7.19
b ₄	0.51	32.65
b ₅	-5.14	-77.23

En la tabla 3 se presentan los resultados de la variable de respuesta estimada para la proteasa ácida de *Aspergillus oryzae* a partir de los valores de los coeficientes y los valores reales, usando la ecuación (1), para la actividad proteolítica frente a hemoglobina.

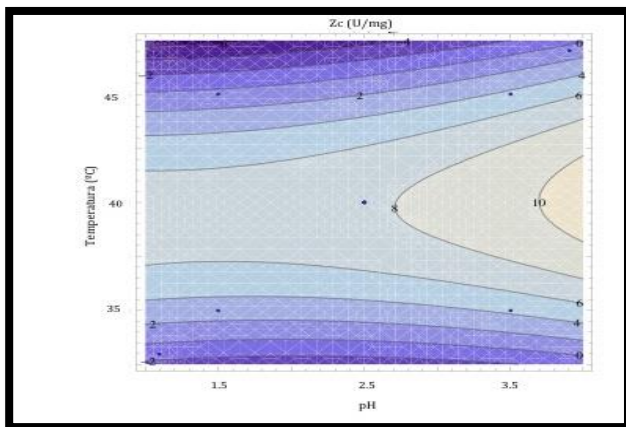
Tabla 3. Resultados de la variable de respuesta de actividad específica y % de actividad específica, los valores de coeficientes de la ecuación (1).

pH	t(° C)	Zc (U/mg)	Zc(%)
3.5	45	4.43	63.043
3.5	35	4.33	62.32
1.5	35	2.91	45.47
1.5	45	0.57	17.43
2.5	40	7.69	91.65
2.5	40	7.69	91.65
2.5	40	7.69	91.65
2.5	40	7.69	91.65
2.5	40	7.69	91.65
2.5	40	7.69	91.65
2.5	40	7.69	91.65
3.91	41.41	0.71	29.70
1.09	38.59	-1.38	4.92

Con estos resultados y con los respectivos valores de pH y temperatura, se graficó la superficie de respuesta (figuras 1 y 2).

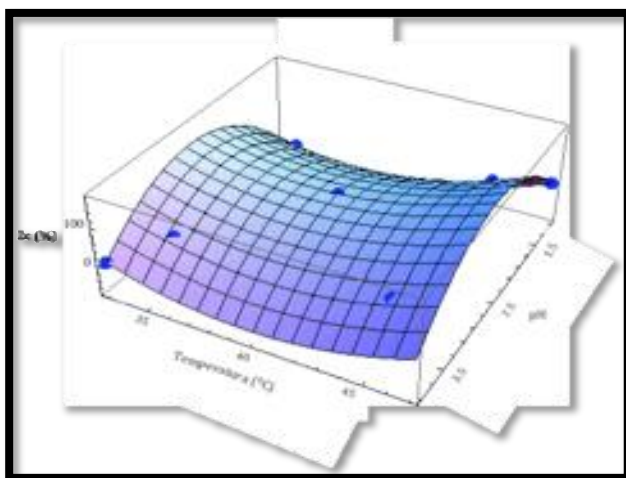


1. (A)

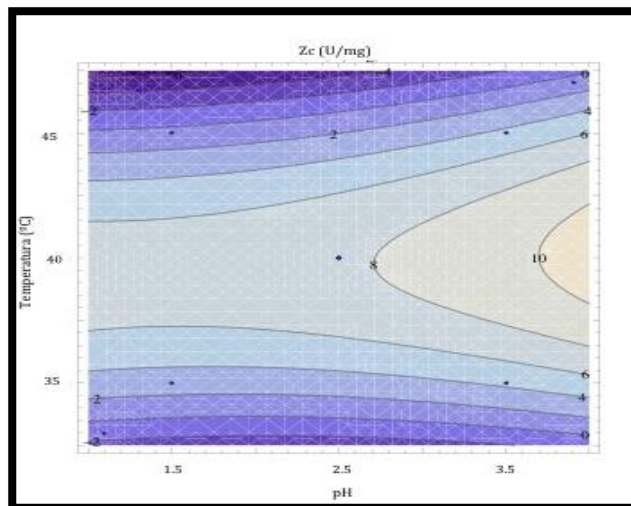


1. (B)

Figura 1. (A) Superficie de respuesta de la actividad específica, Z_c (U/mg), de la proteasa ácida de *Aspergillus oryzae*, frente a hemoglobina en función del pH y la temperatura (°C). **(B)** Superficie de contorno derivado de la actividad específica, Z_c (U/mg).



2. (A)



2. (B)

Figura 2. (A) Superficie de respuesta del porcentaje de actividad específica, Z_c , de la proteasa ácida de *Aspergillus oryzae*, frente a hemoglobina en función del pH y la temperatura (°C). **(B)** Superficie de contorno derivado del porcentaje de actividad específica, Z_c .

Conclusiones

En este trabajo se estudió la actividad enzimática de la proteasa ácida de *Aspergillus oryzae* en función del pH y la temperatura de manera simultánea, utilizando un plan de trabajo basado en el método de análisis de superficie de respuesta. Se observó la importancia de la dependencia del pH y la temperatura de manera conjunta y que las condiciones óptimas de actividad de la proteasa ácida de *Aspergillus oryzae*, fueron a pH 2.5 y una temperatura de 40 °C.

Referencias

- Anson, M.L., (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 22, 79-89.
- Bovey F. A. y Yanari, S.S., (1960). The enzymes, Edited by Paul D. Boyer volume IV Academic Press,
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Fruto, J.S. (1971) The Enzymes. Edited by Paul D. Boyer volume II Academic Press,
- Hartsuck, J. A., & Tang, J. (1972). The carboxylate ion in the active center of pepsin. *Journal of Biological Chemistry*, 247(8), 2575-2580.

- Ichishima, E., Yoshida, F. (1965a). Chromatographic purification and physical homogeneity of acid proteinase of *Aspergillus saitoi*. *Biochimica et Biophysica Acta-Enzymology and Biological Oxidation*, 99(2), 360-366.
- Ichishima, E., Yoshida, F. (1965b). Molecular weight of acid proteinase of *Aspergillus saitoi*. *Nature*, 207(4996), 525-526.
- Jollès, P., Alais, C. (1962). Amino acid composition of κ -casein and terminal amino acids of κ - and para- κ -casein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 98(1), 56-57.
- Jollès, P., Alains, C., Jollès, J., (1968). The tryptic peptide with rennin-sensitive linkage of cow's κ -casein. *Biochim. Biophys. Acta*, 168 (3), 591-593.
- Maeder, R. (1991). *Programming in mathematica*. Addison-Wesley Longman Publishing Co., Inc.
- Montgomery, D.C. (1991). Diseño y análisis de experimentos. Editorial Iberoamérica. México.
- Rajagopalan, T. G., Stein, W. H., & Moore, S. (1966). The inactivation of pepsin by diazoacetylnorleucine methyl ester. *Journal of Biological Chemistry*, 241(18), 4295-4297.
- Tello-Solís, S. R., Rodríguez-Romero, A., & Hernández-Arana, A. (1994). Circular dichroism studies of acid proteinases from *Aspergillus niger* and *Aspergillus awamori*. *Biochemistry and molecular biology international*, 33(4), 759-768.
- Tello-Solís, S.R. (1995). Conformación y Estabilidad de Proteinasas Ácidas de: *Aspergillus*. Discriminación de la Irreversibilidad en la Desnaturalización Térmica de la Proteínasa Ácida de *Aspergillus saitoi* (Tesis de doctorado Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa).
- Tello-Solís, S. R. (2001). Effect of the pH in the conformation and activity of the acid protease from *Aspergillus saitoi*. *Protein and Peptide Letters*, 8(2), 101-108.
- Tsujita, Y., Endo, A. (1976). Purification and characterization of the two molecular forms of *Aspergillus oryzae* acid protease. *Biochimica et Biophysica Acta-Enzymology*, 445(1), 194-204.