



**Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
División de Ciencias Básicas e Ingeniería**

**“Conformación y Estabilidad de  
Proteinasas Ácidas de *Aspergillus*.  
Discriminación de la Irreversibilidad  
en la Desnaturalización Térmica de la  
Proteinasa de *Aspergillus saitoi*”**

**Tesis que presenta**

**Salvador Ramón Tello Solís**

**Para la obtención del grado de Doctor en Ciencias**

**México, Abril 1995**

**#s.t.s.**

## **Jurado**

**Dr. Barbarin Arreguín Lozano**

Instituto de Química, U.N.A.M.

Presidente

**Dra. Adela Rodríguez Romero**

Instituto de Química, U.N.A.M.

**Dra. D. Silvia Solís Mendiola**

Área de Biofísicoquímica, Departamento de Química,  
División de Ciencias Básicas e Ingeniería,

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Vocal

**Dr. Rafael A. Zubillaga Luna**

Área de Biofísicoquímica, Departamento de Química,  
División de Ciencias Básicas e Ingeniería,

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Secretario

**Dr. Andrés Hernández Arana**

Área de Biofísicoquímica, Departamento de Química,  
División de Ciencias Básicas e Ingeniería,

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Asesor

Esta tesis se realizó en el Área de Biofísicoquímica del Departamento de Química, División de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del ***Dr. Andrés Hernández Arana***, a quien expreso mi agradecimiento y admiración.

**A mis padres**

**Carmen y Salvador**

**A mis hermanas**

**Verónica y Nora**

## **Agradecimientos**

Al personal administrativo de la Unida Iztapalapa.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo financiero al Área de Biofísicoquímica, convenio 4731000-5-3771N.

Al Dr. Sergio Revah y a la M. en I. Elba Cristina Villegas.

A mis amigos del Departamento de Química.

A mis compañeros del área de Biofísicoquímica.

A mis alumnos.

#s.t.s.

A

Héctor y Esther Osalde.

*A mis profesores...*

Ricardo Pérez, Agustín Miranda, Adolfo Navarro y Clementina Piña.

*En especial a los doctores*

Manuel Barceló, Antonio Campero, Carlos Damián, Enrique Fernández, José Luis Gázquez, Ricardo Gómez, Felipe Peredo y Vicente Mayagoitia.

*A mis amigos...*

Malisa Romo, Héctor Romo Sr., Norma Herrera; Maricarmen, Pilar y Paloma Dosal, Ana Victoria Pérez del Valle, Tania Teherán, Eugenia Cantú, Olivia Leyva, Andrea del Valle, Addy Esther Osalde Solís, Héctor, Paty y Jorge Alberto Romero, Victoria Eugenia Lara; Victoria Eugenia, Georgina, Jorge y Beatriz Duarte; Josefina, María y Mercedes Valenzuela, Estela Cervantes, Irma Franco, Maricruz Figueroa, Isabel Rosales, Isabel Briones, Carmen Torres, Viviane Schack, Claudia Benítez, Gabriela Careaga, Cristina Alvarez, Rodolfo Esquivel, Rosalía Velázquez, Maricarmen Bertín, Georg Schwarz, Arturo Rojo, Nancy Martín, Rafael Zubillaga, Margarita Viniegra., Armando Domínguez, Rubén Ornelas, Isaac Kornhauser, Alejandro López Gaona, Irma Rodríguez y Patricia Villamil.

*De manera especial:*

Rafael Culebro Siles y Carmen Pérez César.

y

*a mi profesor y amigo*

Fernando Rojas.

**#s.t.s.**

*Abril, 1995*

# Índice

## Capítulo 1

1.1	Introducción	10
1.2	Proteinasas ácidas	13
1.3	Objetivos	16

## Capítulo 2

### Parte Experimental

2.1	Enzimas	18
2.2	Purificación	19
2.3	Actividad proteolítica	21
2.4	Determinación de la concentración de proteína	21
2.5	Determinación de carbohidratos	22
2.6	Electroforesis en gel de poliacrilamida	22
2.7	Dicroísmo circular	22
2.8	Calorimetría diferencial de barrido	24

## Capítulo 3

### Tratamiento de Datos

3.1	Modelo de dos estados	27
3.2	Modelos para procesos irreversibles	29

## Capítulo 4

### Caracterización por dicroísmo circular de las proteinasas ácidas de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus saitoi*

4.1	Purificación	33
4.2	Masas moleculares	39
4.3	Contenido de carbohidratos	41
4.4	Dicroísmo circular	41
4.5	Efecto del pH en la actividad y conformación de las proteinasas	46

Capítulo 5  
Desnaturalización térmica de la proteinasa ácida de  
*Aspergillus saitoi*

5.1	Dicroísmo circular	51
5.2	Efecto de la velocidad de calentamiento en la desnaturalización térmica	53
5.3	Cálculo de la entalpía de van't Hoff, para la reacción irreversible del modelo de Lumry-Eyring	61
5.4	Estimación directa de la entalía de van't Hoff	64
5.5	Cálculo de la energía de activación para la reacción irreversible del modelo de Lumry-Eyring	68
5.6	Fracciones de los estados N, U y D en función de la temperatura, de acuerdo al modelo de Lumry-Eyring	71
5.7	Calorimetría diferencial de barrido	83
	Conclusiones y Perspectivas	88
	Apéndice A	91
	Apéndice B	94
	Referencias	97

# Capítulo 1

## 1.1 Introducción

Hoy en día, el desciframiento del código de plegamiento de las proteínas es uno de los temas más estudiados, ya que por su importancia se le ha denominado la segunda mitad del código genético (1). Consiste en la interpretación de la información contenida en la secuencia de aminoácidos (estructura primaria) para construir la conformación tridimensional de una proteína. Esta estructura tridimensional, altamente específica, es la llamada estructura nativa, la cual posee la actividad biológica de la proteína.

A pesar de un gran número de trabajos de investigación en el tema, la mayor parte del código de plegamiento permanece aún indescifrado. Aunque se sabe que dicho código está regido por aspectos termodinámicos (2, 3), hasta la fecha se desconoce como el arreglo de aminoácidos dicta la estructura nativa de la proteína. El estudio de la estabilidad termodinámica de las proteínas proporciona información muy importante, que puede ser empleada en el trabajo de desciframiento del código de plegamiento (4).

Al proceso por el cual es alterada la conformación nativa de una proteína se le denomina desnaturalización, y puede ser inducido por cambios en los valores de pH, fuerza iónica, por la presencia de sales inorgánicas o disolventes orgánicos o por la variación en la temperatura (5). El proceso de desnaturalización puede estudiarse observando los cambios que ocurren en diferentes propiedades de la proteína, tales como características espectroscópicas o actividad biológica. Entre las técnicas utilizadas para los estudios de desnaturalización tenemos: proteólisis, pérdida de la actividad enzimática, cromatografía de

exclusión, fluorescencia, espectroscopía diferencial ultravioleta, resonancia magnética nuclear, dicroísmo circular y calorimetría diferencial de barrido (6).

En el estudio de la estabilidad termodinámica de las proteínas, los principales resultados obtenidos indican que la desnaturalización de proteínas pequeñas (masa molecular menor a 35 000 Da) es generalmente un proceso reversible de una sola etapa, que involucra dos estados termodinámicos estables, el estado nativo y el estado desnaturalizado. (7, 8). En estos casos es posible caracterizar termodinámicamente el proceso de desnaturalización a través de la determinación de los cambios de entalpía, energía libre, entropía y capacidad calorífica (4, 7, 9). El proceso de desnaturalización puede estudiarse en condiciones de equilibrio, bajo las cuales la transición es reversible; la información que se obtiene a partir de estos estudios sirve también, para interpretar el proceso de adquisición de la estructura nativa (10).

Para proteínas de masa molecular mayor a 35 000 Da se ha observado que el proceso de desnaturalización es más complejo, ya que se pueden detectar especies intermediarias estables (11, 12). Además, dicho proceso incrementa su complejidad en el caso de proteínas oligoméricas (13); sin embargo, es necesario trabajar con estos sistemas, ya que la mayoría de las proteínas involucradas en los fenómenos biológicos caen dentro de este grupo de proteínas.

La calorimetría diferencial de barrido se ha utilizado ampliamente en las últimas dos décadas para el estudio de las transiciones térmicas en proteínas. Esta técnica proporciona información sobre la energía y mecanismo del proceso de plegamiento/desplegamiento de

las proteínas (7). Por ejemplo, la calorimetría diferencial de barrido, permite probar la validez del modelo de dos estados para el análisis de la desnaturalización térmica de una proteína. Esta prueba se basa en la comparación del cambio en la entalpía calorimétrica,  $DH_{cal}$ , con la entalpía de van't Hoff,  $DH_{vH}$ , determinada de la dependencia de la constante de equilibrio con la temperatura (9, 14). Se ha observado que para muchas proteínas globulares pequeñas el proceso de desnaturalización es simple, teniendo como resultado que la relación  $DH_{cal}/DH_{vH}$ , es igual a 1 (7, 9). Sin embargo, proteínas con multidominios muestran procesos más complejos en su desnaturalización, donde dos o más transiciones individuales de dos estados pueden estar presentes (15,16). Para procesos que se desvían del modelo de dos estados se observa que la relación  $DH_{cal}/DH_{vH}$  es mucho mayor que la unidad, más aún, se considera que dicha relación establece el número de regiones cooperativas, dominios termodinámicos, que están presentes en la macromolécula (7,15). Este tipo de análisis, sin embargo, solamente es posible cuando la transición es reversible y no está controlada cinéticamente. Cuando hay irreversibilidad en el proceso de desnaturalización, es necesario realizar un estudio calorimétrico más completo para poder extraer cierta información termodinámica.

## 1.2 Proteinasas ácidas

Las proteinasas ácidas se encuentran ampliamente distribuídas en la naturaleza, tanto en plantas, como en animales y microorganismos. Se consideran proteinasas ácidas a aquellas enzimas proteolíticas que:

- i) Su pH óptimo se encuentra en la región de pH de 2 a 5
- ii) Son insensibles al diisopropilfosforidato (DFP)
- iii) Son insensibles a agentes metálicos quelatantes
- iv) Son insensibles a venenos sulfhidrúlicos.

A este tipo de enzimas corresponden, por ejemplo, la pepsina y renina de origen animal (18-21). 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 (60), lo que permite su utilización en el cuajado de la leche, sin continuar con una proteólisis extensiva de los fragmentos de caseína (19, 21).

La mayor parte de las proteinasas ácidas de origen microbiano se obtienen de forma extracelular, a partir de sus medios de cultivo. Se encuentran ampliamente distribuídas 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. 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 proteinasas 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 proteinasas ácidas se encuentran en valores de pH de 3 a 3.8 (22, 23). Tanto las proteinasas ácidas microbianas, como las de origen animal, tienen un total de aminoácidos que varía entre 290 y 340 residuos, con una masa molecular promedio de 35 000 a 42 000 Da. El contenido de cisteína y metionina es menor que en las pepsinas (24). 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 proteinasas ácidas se caracteriza por la presencia de dos residuos de ácido aspártico, uno de los cuales es sensible a compuestos epóxicos (25) mientras que el otro es sensible a compuestos diazo en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  (26), produciendo ambos tipos de compuestos inhibición en la actividad catalítica.

Estudios por difracción de rayos X, revelan que las proteinasas ácidas de *Penicillium jantinelum*, *Rhizopus chinensis* y la pepsina, poseen estructura secundaria y terciaria muy similares (27-29). La estructura molecular presenta dos lóbulos aproximadamente del mismo tamaño. En uno de los lóbulos se encuentra el extremo N-terminal y en el otro el extremo C-terminal. La molécula completa presenta, esencialmente, estructura de hoja  $\beta$ -antiparalela. Solamente se observan tres o cuatro regiones helicoidales de 1.5 a 2.5 giros (30).

En estudios de la desnaturalización térmica de la pepsina (a diferentes valores de pH), por microcalorimetría diferencial de barrido, Privalov et al. (16) observaron que el proceso de desnaturalización es complejo y que ocurre en dos distintas etapas a diferentes temperaturas, siendo el dominio correspondiente al lóbulo C-terminal el más estable y presentando además reversibilidad. El análisis de las transiciones calorimétricas mostró que cada dominio estructural de la molécula de pepsina consta de dos unidades cooperativas o dominios energéticos quasi-independientes. Makarov et al. (59), han sugerido que el número de regiones cooperativas o dominios energéticos en la pepsina son función del pH del medio ambiente de la molécula.

A la fecha, se han aislado varias proteinasas ácidas de *Aspergilli*, principalmente a partir de *Aspergillus saitoi* (22), *Aspergillus niger* (31), *Aspergillus awamori* (32) y *Aspergillus oryzae* (33). Los estudios reportados para estas enzimas son, principalmente, sobre producción, aislamiento y purificación, algunas propiedades físicas y su perfil de actividad en función del pH frente a caseína y hemoglobina. Sin embargo, no se ha encontrado información sobre su estructura tridimensional o su estabilidad térmica, sobre su mecanismo de desnaturalización en función de la temperatura. De ellas la más estudiada es la proteinasa ácida de *Aspergillus saitoi* o aspergillopeptidasa A (34), la cual tiene una masa molecular de 34 200 Da, un punto isoeléctrico de 3.6, una absorbencia específica  $A_{1cm}^{1\%} = 13.15$  y una composición de aminoácidos de 283 a 289 residuos: Arg<sub>1</sub>, His<sub>3</sub>, Lys<sub>11</sub>, Tyr<sub>17-18</sub>, Try<sub>1</sub>, Phe<sub>13</sub>, Cys<sub>1</sub>, Ser<sub>42-43</sub>, Thr<sub>25</sub>, Leu<sub>19-20</sub>, Ileu<sub>11-12</sub>, Val<sub>22</sub>, Glu<sub>22</sub>, Asp<sub>34-35</sub>, Gly<sub>31-32</sub>, Ala<sub>20</sub>, Pro<sub>10</sub>, amonia-amida<sub>31-32</sub> (no contiene metionina).

### 1.3 Objetivos

En este trabajo se plantearon dos líneas de investigación que aportaron información sobre la estructura y la estabilidad de algunas proteinasas ácidas microbianas. Los objetivos particulares que se perseguían eran los siguientes:

1.- Determinación de la estructura secundaria, por dicroísmo circular, de las proteinasas ácidas de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus saitoi*, y de la estabilidad estructural y su relación con la actividad enzimática en función del pH.

2.- Estudio de la desnaturalización térmica de la proteinasa ácida de *Aspergillus saitoi* por dicroísmo circular y calorimetría diferencial de barrido, para determinar el mecanismo de desplegamiento y la posible existencia de algún intermediario estable durante el proceso. Así mismo, al comparar los resultados obtenidos por dicroísmo circular y calorimetría diferencial de barrido, poder establecer la presencia de dominios termodinámicos en la macromolécula.

# **Capítulo 2**

## **Parte Experimental**

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico (Merck, Alemania).

## 2.1 Enzimas

a) Proteinasas ácidas de *Aspergillus awamori* y *Aspergillus niger* .

La proteinasas fueron producidas por una fermentación en medio sólido (Koji culture) conteniendo harina de trigo (60g), soya desengrasada (40g) y cloruro de amonio (1g) (35). La mezcla fue amasada con 70 ml de agua destilada y sometida al autoclave durante 30 min a una presión de 30 psi. El pH del medio fue ajustado a un valor de 5.5, con HCl 1 M. Se inoculó el medio con el microorganismo correspondiente: *Aspergillus awamori* cepa IFO 4888 y *Aspergillus niger* cepa ANH-15. La fermentación se llevó a cabo en una columna de vidrio (2.5 x 30 cm) por 36 horas a 30 °C y un flujo de aire de 4 l/h.

b) Proteinasa ácida de *Aspergillus saitoi*.

La proteinasa se obtuvo de un extracto comercial (EC 3.4.23.6) de Sigma Chemical Co, San Luis E.U.A.

## 2.2 Purificación

a] Aislamiento y purificación de las proteinasas ácidas de *Aspergillus awamori* y *Aspergillus niger*.

En ambos casos las proteinasas fueron extraídas del medio de cultivo (Koji culture), por agitación con 5 volúmenes de regulador de McIlvaine 0.1 M, pH 4 a 35 °C durante una hora. Posteriormente, la mezcla de extracción se dejó en reposo durante 24 horas a 4 °C, el precipitado fue removido por filtración a través de gasa, papel Whatman y celita 545. Las últimas trazas de precipitado fueron eliminadas por centrifugación a 3000 g durante 20 min a 4 °C.

La enzima fue entonces precipitada, del sobrenadante, por adición de etanol frío a una concentración final del 70 % en volumen. La enzima se dejó precipitar durante 24 horas a 4 °C. La enzima precipitada fue separada por centrifugación a 3000 g (0°C) durante 30 min y redisoluelta en regulador de acetatos 0.05 M, pH 4.0.

Veinte mililitros de la disolución anterior, conteniendo aproximadamente 2.5 mg de proteína/ml, fueron aplicados a una columna de Ultrogel ACA 54 (2.5 x 74 cm) (Pharmacia, Francia) acoplada a un colector de fracciones multirac 2111 (LKB), con bomba peristáltica Varioperpex 2120 (LKB) y detector uvicord s 2138 (LKB). La columna fue previamente equilibrada con regulador de acetatos 0.05 M, pH 4.0. La elución (40 ml/h) se llevó a cabo con el mismo regulador y las fracciones con actividad proteolítica fueron unidas en una nueva fracción, concentradas y recromatografiadas bajo las mismas condiciones.

La purificación final se llevó a cabo por intercambio iónico en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Disoluciones de aproximadamente 1.5 mg de proteína/ml fueron inyectadas en una columna Bio-Gel DEAE 5PW (0.75 x 7.5 cm) (Bio-Rad, E.U.A.), acoplada a un cromatógrafo Varian 5020B. Los componentes proteicos fueron eluidos de la columna con una velocidad de flujo de 1 ml/min empleando un gradiente lineal de Na Cl en regulador de acetatos 0.05 M, pH 4.0.

b] Purificación de la proteinasa ácida de *Aspergillus saitoi*.

Un gramo del extracto comercial de la proteinasa ácida de *Aspergillus saitoi* fue disuelto en 25 ml de regulador de fosfatos 0.05 M, 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 al sistema de colección. La columna fue equilibrada con regulador de fosfatos 0.05 M, pH 4.0. La elución se llevó a cabo en el mismo regulador y las fracciones con actividad proteolítica fueron unidas en una nueva fracción, concentradas y recromatografiadas bajo las mismas condiciones.

La purificación final se llevó a cabo por intercambio iónico en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Disoluciones de un mililitro de aproximadamente 1.0 mg de proteína/ml fueron inyectadas en una columna Bio-Gel DEAE 5PW (0.75 x 7.5 cm) (Bio-Rad, E.U.A.), acoplada a un cromatógrafo Varian 9000. Los componentes proteicos fueron eluidos de la columna con una velocidad de flujo de 0.7 ml/min empleando un gradiente lineal de KCl en regulador de fosfatos 0.05 M, pH 4.0.

### 2.3 Actividad proteolítica

La actividad proteolítica fue rutinariamente ensayada a pH 2.84 por una modificación del método de Anson (36), usando como sustrato hemoglobina (Sigma) al 2% (desnaturalizada por calentamiento), en un regulador universal 0.05 M (0.05 M de ácido acético, 0.05 M de ácido bórico y 0.05 M de ácido fosfórico) (37). Un mililitro de sustrato fue incubado con 150 µl de la disolución de la enzima durante 10 minutos a 35 °C. La reacción fue detenida por adición de 2 ml de ácido tricloroacético al 5 %. El precipitado resultante fue removido por filtración a través de papel filtro Whatman No. 40. La absorbencia del sobrenadante fue medida a 280 nm en celdas 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.

El efecto del pH en la actividad proteolítica frente a hemoglobina fue ensayado similarmente en el intervalo de pH de 1 a 6. Se utilizó un regulador 0.05 M KCl/HCl para preparar la hemoglobina a pH 1 y 1.5, y el regulador universal para pH 2 a 6.

### 2.4 Determinación de la concentración de proteína

Durante las diferentes etapas de purificación, la concentración de proteína total fue determinada por el método de Lowry (38). En los estudios de caracterización, actividad, diroísmo circular y calorimetría diferencial de barrido la cantidad de proteína fue calculada de la absorbencia a 280 nm.

a] Proteinasas ácidas de *Aspergillus awamori* y *Aspergillus niger*.

Para estas enzimas se determinó la absorbencia específica,  $A_{1cm}^{1\%}$  de 10.0, según el método de Robinson (39).

b]Proteinasa ácida de *Aspergillus saitoi*.

Para esta enzima se utilizó la absorbencia específica,  $A_{1cm}^{1\%}$  de 13.15, reportada por Ichishima et al (34).

## **2.5 Determinación de carbohidratos**

El contenido de carbohidratos (hexosas neutras) fue determinado por el método de Dubois et al. (40).

## **2.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida**

Se calculó la masa molecular a partir de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS). Se utilizaron geles comerciales de 0.45 x 43 x 50 mm con un gradiente de poliacrilamida de 8-25 % en un sistema PhastSystem de Pharmacia.

## **2.7 Dicroísmo circular**

Los espectros de dicroísmo circular (DC) se obtuvieron en un espectropolarímetro Jasco J 500 A, calibrado con ácido (+)-10-canforsulfónico (41).

a] Los espectros en la región del ultravioleta lejano (195-250 nm), para la determinación del contenido de estructura secundaria y el estudio del cambio conformacional en función del pH, se realizaron a 25 °C y en una celda con recorrido óptico de 0.05 cm. Las concentraciones de proteína utilizadas fueron: 0.358 mg/ml para *Aspergillus awamori*, 0.425 mg/ml para *Aspergillus niger* y *Aspergillus saitoi*.

Disoluciones de cada una de las enzimas utilizadas en estos estudios, fueron inicialmente dializadas frente a agua desionizada (pH final 4.5). La variación del pH se realizó por adición de NaOH 1 M o HCl 1 M.

Los espectros de dicroísmo circular son reportados como elipticidad por residuo medio [ $\theta_{m.w.r}$ ], la cual fue calculada utilizando una masa molecular de 110 por residuo para las proteinasas ácidas de *Aspergillus awamori* y *Aspergillus niger* y de 117 por residuo para la proteínasa ácida de *Aspergillus saitoi* (34). El contenido de estructura secundaria determinado a partir de los espectros de DC se realizó por el método de Perczel et al (42), utilizando el programa LINCOMB.

b] Para los estudios de desnaturalización térmica por dicroísmo circular, se eligió la proteasa ácida de *Aspergillus saitoi*; se utilizaron disoluciones de la enzima (0.282 mg/ml) en regulador de fosfatos 0.05 M, pH 5.0. Para la obtención de los espectros se empleó una celda de 0.1 cm de recorrido óptico, con chaqueta de circulación de agua y un baño HAAKE-NK 22 para el control de la temperatura. Se midió directamente la temperatura en la celda con un termómetro digital (Cole-Parmer modelo 8402-20). La desnaturalización térmica se siguió por el cambio en la elipticidad a 230 nm. El cambio de temperatura en la muestra (de 25 °C a 80 °C), se realizó a velocidad de calentamiento constante. Se seleccionaron velocidades de calentamiento de 0.086 a 1.5 K/min (con una precisión de  $\pm$  0.02 K/min). Las elipticidades observadas fueron transformadas a fracción aparente de proteína desnaturalizada,  $f_{D,app}$ , usando la relación:

$$f_{D,app} = \frac{Q_T - Q_N}{Q_D - Q_N}$$

donde:

$Q_N$  elipticidad del estado nativo

$Q_D$  elipticidad del estado desnaturalizado

$Q_T$  elipticidad a la temperatura T

La reversibilidad de la transición se estudió también por el cambio en la elipticidad a 230 nm. El incremento de la temperatura en la muestra se realizó a velocidad constante, 1.5 K/min, desde 25 °C hasta la temperatura T' y, entonces la disolución fue enfriada rápidamente (10 K/min) hasta 25 °C. La diferencia de la elipticidad observada (a T') con respecto a la elipticidad de la proteína nativa dividida por la diferencia de la elipticidad del estado desnaturalizado y la elipticidad del estado nativo a la temperatura T' (calculada a partir de las curvas de transición), se expresó como la fracción de proteína irreversiblemente desnaturalizada,

$$f_{D,app} = \frac{\Theta_{T'} - \Theta_N}{(\Theta_D - \Theta_N)_{T'}}$$

## 2.8 Calorimetría diferencial de barrido

Los estudios calorimétricos se realizaron para la proteinasa ácida de *Aspergillus saitoi* en un microcalorímetro diferencial de barrido MicroCal MC2 (Microcal, Northampton, MA, USA). Se utilizaron disoluciones de 1 a 1.3 mg de enzima/ml, dializadas frente a regulador de fosfatos 0.05 M, pH 5.0. Todas las disoluciones fueron desgasificadas al vacío durante 20 min; posteriormente, el pH y la concentración de la enzima fueron verificados y la disolución depositada en la celda de trabajo del calorímetro. En la otra celda se depositó regulador de fosfatos 0.05 M, pH 5.0. Las endotermas calorimétricas se obtuvieron a velocidades de barrido de 0.6, 0.9 y 1.25 K/min, bajo una presión total de 2.0 Kg/cm<sup>2</sup>. Se realizaron corridas regulador-regulador, bajo las mismas condiciones que las

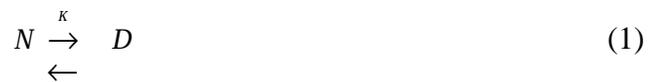
muestras proteicas, para restarlas de las endotermas de la muestra. Las curvas de capacidad calorífica de exceso se obtuvieron por substracción de líneas bases sigmoidales. La colección de datos y el análisis de los mismos se realizó utilizando el *software DA-2* y *Origin* de Microcal.

# **Capítulo 3**

## **Tratamiento de Datos**

### 3.1 Modelo de dos estato

Asumiendo un modelo de dos estados para la desnaturalización reversible de una proteína, podemos analizar los datos de algún parámetro físico ( $f$ ), que pueda sufrir un cambio debido a la modificación de la conformación de la proteína al pasar del estado nativo (N) al estado desnaturalizado (D), y a partir de dichos datos calcular la constante de equilibrio del proceso:



$$K = \frac{[D]}{[N]} \quad (2)$$

o bien en términos de la fracción nativa ( $f_N$ ) y de la fracción desnaturalizada ( $f_D$ ) de proteína:

$$K = f_D / f_N = f_D / (1 - f_D) \quad (3)$$

siendo:

$$f_N + f_D = 1 \quad (4)$$

$f_D$  puede determinarse experimentalmente si se mide dicha propiedad física ( $f$ ), en función de la temperatura, para el estado nativo ( $f_N$ ), el estado desnaturalizado ( $f_D$ ) y en cualquier punto de la transición, a la temperatura  $T(f_T)$ ,

$$f_D = (f_T - f_N) / (f_D - f_N) \quad (5)$$

Bajo este esquema la proteína posee solamente dos estados termodinámicos macroscópicos, el estado nativo y el estado desnaturalizado. La constante de equilibrio se puede expresar como:

$$K = (\mathbf{f}_T - \mathbf{f}_N) / (\mathbf{f}_D - \mathbf{f}_T) \quad (6)$$

Los parámetros termodinámicos  $\mathbf{DG}^\circ$ ,  $\mathbf{DH}^\circ$  y  $\mathbf{DS}^\circ$  se pueden obtener a partir de:

$$\mathbf{DG}^\circ = -RT \ln K \quad (7)$$

$$\mathbf{DH}^\circ = -R \left( \frac{\mathcal{J} \ln K}{\mathcal{J} 1/T} \right)_P \quad (8)$$

$$\mathbf{DS}^\circ = (\mathbf{DH}^\circ - \mathbf{DG}^\circ) / T \quad (9)$$

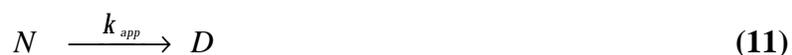
y el cambio en la capacidad calorífica a presión constante,  $\Delta C_P^0$ , está dado por:

$$\Delta C_P^0 = \left( \frac{\mathcal{J} \mathbf{DH}^0}{\mathcal{J} T} \right)_P = T \left( \frac{\mathcal{J} \mathbf{DS}^0}{\mathcal{J} T} \right)_P \quad (10)$$

El análisis del proceso utilizando el modelo de dos estados es útil aun cuando el mecanismo de la transición no corresponda exactamente a dicho modelo. En tales condiciones, se obtienen valores aparentes tanto de la constante de equilibrio ( $K_{app}$ ), como de las propiedades termodinámicas.

### 3.2 Modelos para procesos irreversibles

La desnaturalización térmica de muchas proteínas es irreversible. Para explicar los cambios ocurridos en dicho proceso se ha utilizado el modelo de dos estados:



donde  $N$  representa el estado nativo y  $D$  el estado desnaturalizado irreversible de la proteína, siendo  $k_{app}$  la constante de velocidad aparente de primer orden, que cambia con la temperatura según la ecuación de Arrhenius.

Sánchez-Ruiz et al (43) derivaron varios métodos para calcular la energía de activación aparente,  $E_{app}$ , del proceso, a partir del análisis de curvas calorimétricas. Dos de estos métodos pueden ser adaptados para utilizar la información de los estudios por dicroísmo circular.

El primero relaciona la temperatura media ( $T_m$ ) de la curva de transición del estado nativo al estado desnaturalizado, con la velocidad de calentamiento,  $v$ :

$$\ln \frac{v}{T_m} = \ln \frac{AE}{R} - \frac{E}{RT_m} \quad (12)$$

donde  $A$  es el factor pre-exponencial de la ecuación de Arrhenius. Por lo que, a partir de un gráfico del  $\ln \frac{v}{T_m}$  en función de  $1/T_m$ , se obtendrá una línea recta con pendiente igual a  $-E/R$ .

El segundo método relaciona la fracción de proteína en el estado nativo,  $f_N$ , la constante de velocidad aparente de la reacción,  $k_{app}$ , en función de la temperatura y la velocidad de calentamiento  $v$ :

$$\frac{d \ln f_N}{d T} = -\frac{k_{app}}{v} = -\frac{A}{v} \exp\left(\frac{-E}{RT}\right) \quad (13)$$

entonces, a partir de un gráfico del  $\ln k_{app}$  en función de  $1/T$  se obtendrá una línea recta con pendiente igual a  $-E/R$ .

Un segundo modelo que explica la desnaturalización irreversible de una proteína es el de Lumry-Eyring, (44) el cual involucra la presencia de un estado desdoblado ( $U$ ), además del estado nativo ( $N$ ) y el estado desnaturalizado irreversible ( $D$ )



con:

$$K = f_U / f_N \quad (15)$$

$$f_N + f_U + f_D = 1 \quad (16)$$

Donde  $K$  es la constante de equilibrio para la transición de  $N$  a  $U$ ,  $k$  la constante de velocidad de primer orden, para la reacción de  $U$  a  $D$ , que varía con la temperatura según la ecuación de Arrhenius,  $f_N$  es la fracción nativa,  $f_U$  la fracción del estado desdoblado y  $f_D$  la fracción de proteína desnaturalizada irreversiblemente. Por lo tanto, al aplicar este modelo a la desnaturalización térmica de una proteína que presente un intermediario estable, se podría, en principio, calcular de manera directa la entalpía de van't Hoff para la reacción reversible, si fuera posible estimar los valores de  $f_N$  y  $f_U$  a varias temperaturas.

Capítulo 4  
**Caracterización por  
Dicroísmo Circular de las  
Proteinasas Ácidas de  
*Aspergillus awamori*,  
*Aspergillus niger* y  
*Aspergillus saitoi***

## 4.1 Purificación

### 4.1.1 Proteinasas ácidas de *Aspergillus awamori* y *Aspergillus niger*.

Los extractos obtenidos al final de la fermentación tuvieron una actividad específica de 290 a 340 U/mg. La precipitación con etanol al 70 % aumentó la pureza en factores de 2.9 a 3.7. En la figura 1A, se muestra el patrón de elución, en regulador de acetatos pH 4.0, de la filtración en gel para la proteinasa ácida de *Aspergillus niger*; las fracciones con actividad proteolítica (1 242 U/mg) fueron unidas y recromatografiadas bajo las mismas condiciones. En este caso la enzima se eluyó de la columna mostrando un perfil más definido (figura 1B). Las fracciones con actividad proteolítica (1 800 U/mg), marcadas entre barras en la figura 1B, fueron colectadas, concentradas a aproximadamente 1.5 mg/ml e inyectadas a la columna de DEAE-5PW. La figura 2 representa el patrón de elución, en regulador de acetatos pH 4.0, para la cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución. Sólo uno de los componentes separados fue activo, con actividad específica de 5 500 U/mg, los otros materiales eluidos no presentaron actividad proteolítica. Resultados similares se obtuvieron durante la purificación de la proteinasa ácida de *Aspergillus awamori*, en cuyo caso la actividad específica de la enzima pura fue de 4 900 U/mg. Las actividades específicas para estas enzimas son similares a las reportadas para otras proteinasas ácidas aspárticas, tales como pepsina (45) (4 000 U/mg) y proteinasa III de *Mucor renninus* (46) (5 500 U/mg). La homogeneidad de las enzimas purificadas fue determinada por electroforesis convencional en gel de poliacrilamida, en ausencia y presencia de dodecilsulfato de sodio, observándose una sola banda en cada caso.

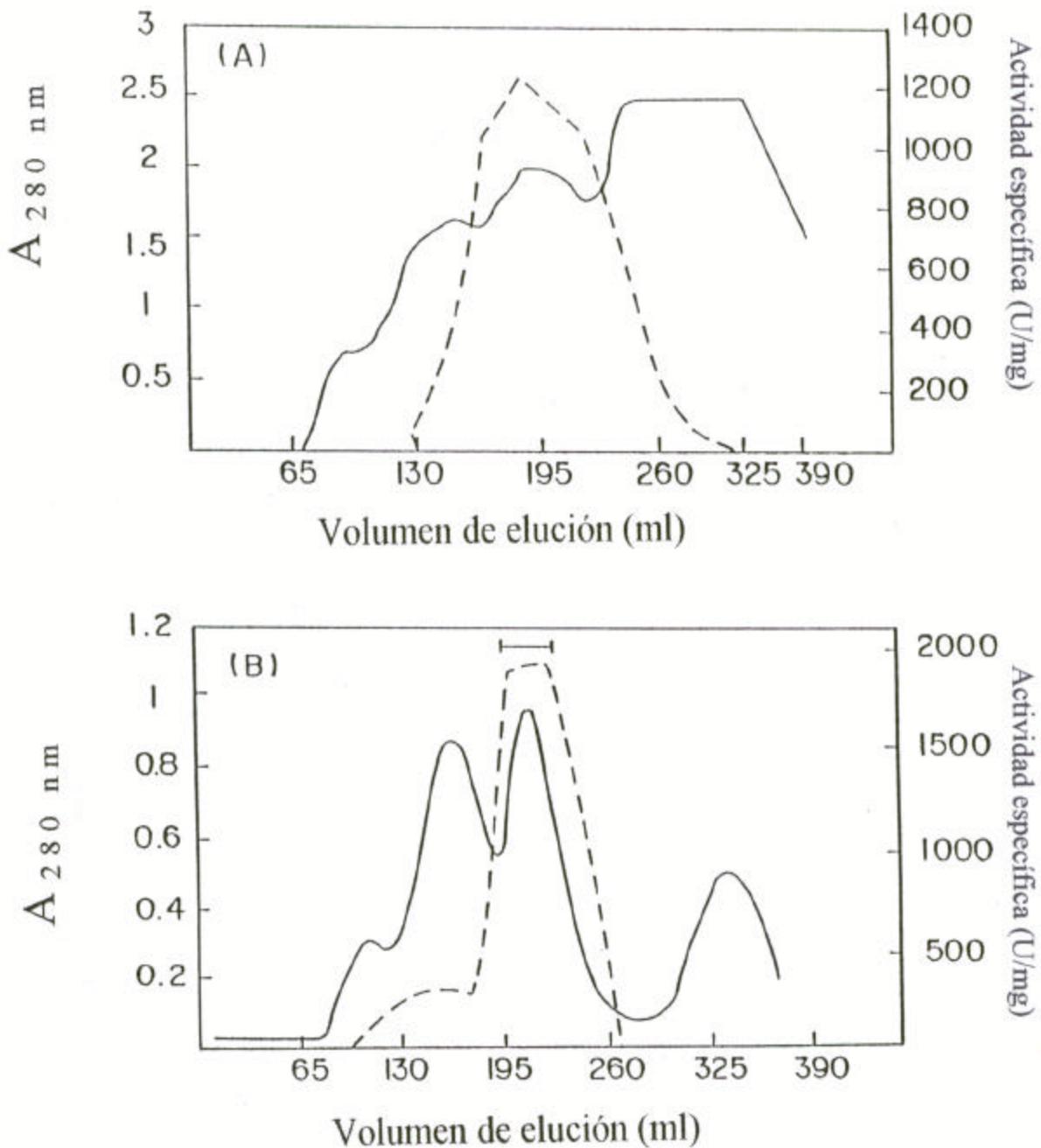


Figura 1.

Cromatografía de filtración en gel, del extracto crudo obtenido por precipitación con etanol, de la proteinasa ácida *Aspergillus niger*. (A) 20 ml de la disolución de la proteína (aproximadamente 2.5 mg/ml), fueron inyectados en una columna de Ultrogel ACA 54 (2.5 x 74 cm) y eluida con regulador de acetatos 0.1 M, pH 4.0. (B) Las fracciones colectadas en (A) con actividad específica mayores que 400 U/mg fueron unidas en una sola fracción, y recromatografiada bajo las mismas condiciones. La línea sólida representa la absorbencia a 280 nm y la línea punteada la actividad proteolítica.

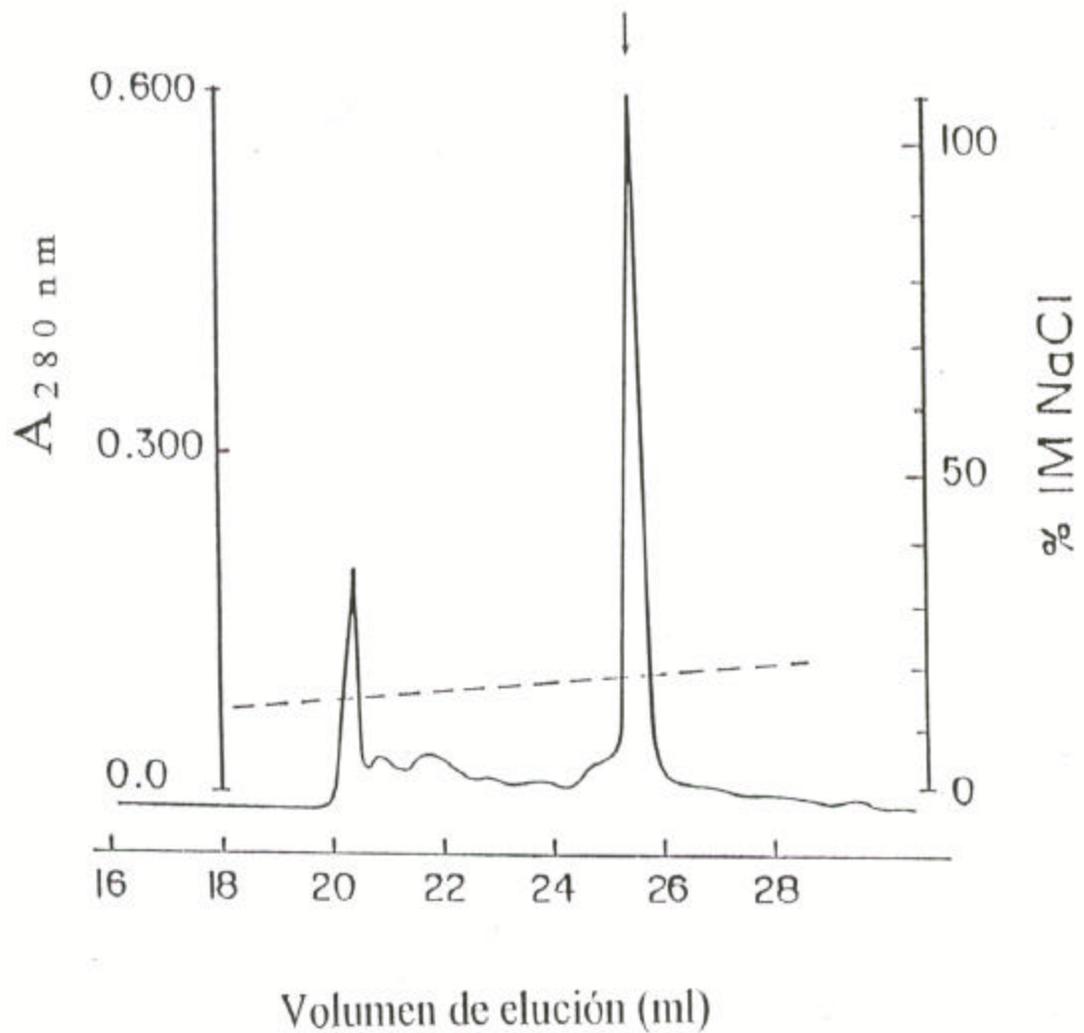


Figura 2.

Purificación de la proteinasa de *Aspergillus niger* por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución. El material marcado por las barras en la Figura 1 B fue concentrado e inyectado en una columna de DEAE 5-PW (0.75 x 7.5 cm) y eluido con un gradiente lineal (línea punteada) de NaCl en regulador de acetatos 0.05 M, pH 4.0. Los componentes proteicos presentes en el volumen eluido fueron detectados por medición de la absorbencia a 280 nm (línea sólida). La flecha indica el componente con actividad proteolítica.

#### **4.1.2 Proteinasa ácida de *Aspergillus saitoi***

En la figura 3, se muestra el patrón de elución, en regulador de fosfatos pH 4.0, para la filtración en gel del extracto comercial de la proteasa ácida de *Aspergillus saitoi*. Las fracciones con actividad proteolítica (4 826 U/mg) fueron unidas y recromatografiadas bajo las mismas condiciones. Las nuevas fracciones con actividad proteolítica (5 175 U/mg) fueron colectadas y concentradas hasta aproximadamente 1.3 mg/ml e inyectadas en la columna de DEAE-5PW. La figura 4 representa el patrón de elución, en regulador de fosfatos pH 4.0, para la cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución; se observa un solo pico con actividad específica de 8 278 U/mg. Se observó una sola banda en electroforesis convencional en gel de poliacrilamida, tanto en ausencia como en presencia de dodecilsulfato de sodio, de donde se deduce que la enzima fue purificada a homogeneidad.

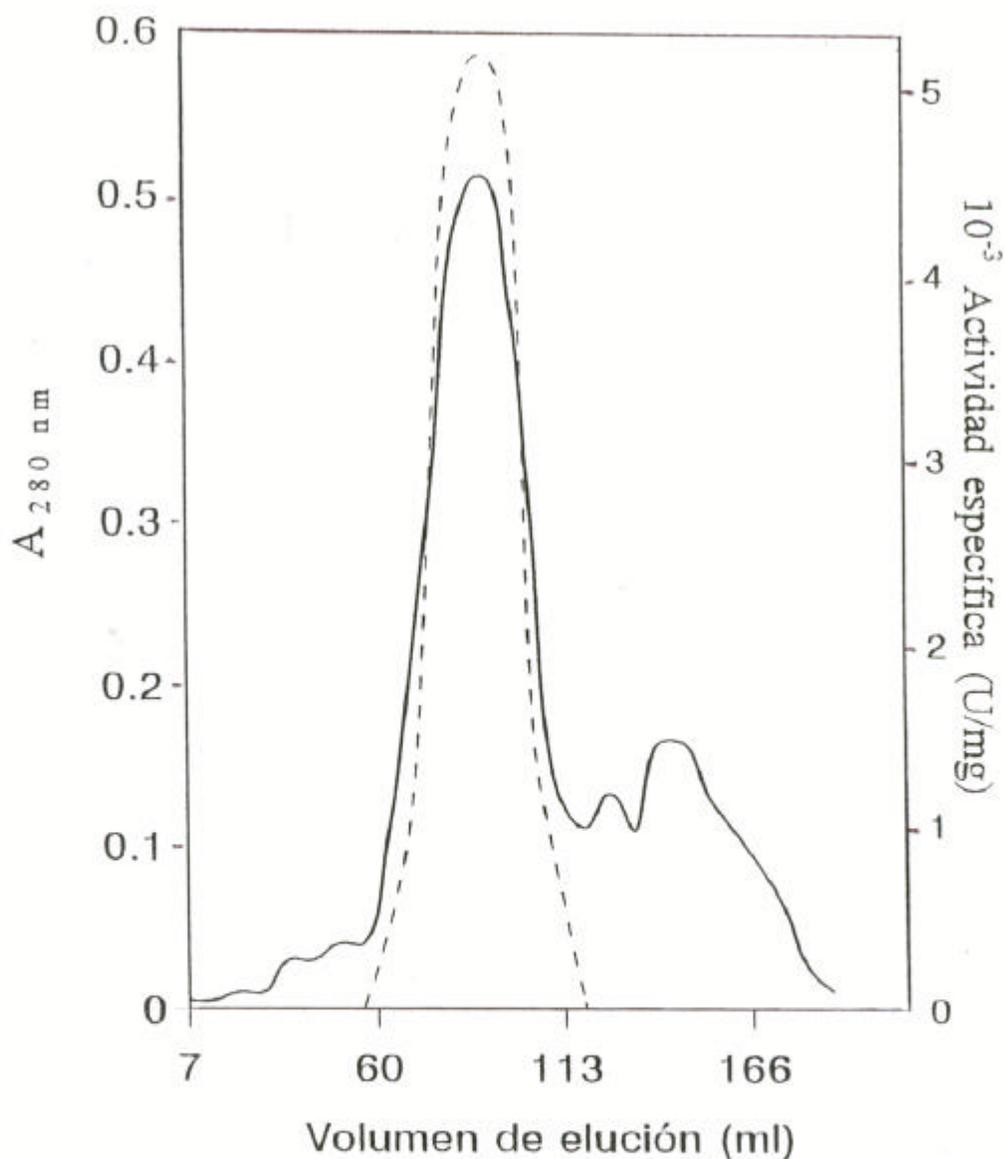


Figura 3.

Cromatografía de filtración en gel, del extracto comercial de la proteinasa ácida *Aspergillus saitoi*. 1 g del extracto comercial, fue disuelto en 25 ml de regulador de fosfatos 0.05 M, pH 4.0. La disolución de la proteína fue inyectada en una columna TSK-HW 50 F (2.5 x 54 cm) y eluída con regulador de fosfatos 0.05 M, pH 4.0. Las fracciones colectadas con actividad específica mayor que 1000 U/mg fueron unidas en una sola fracción, y recromatografiada bajo las mismas condiciones. La línea sólida representa la absorbencia a 280 nm y la línea punteada la actividad proteolítica.

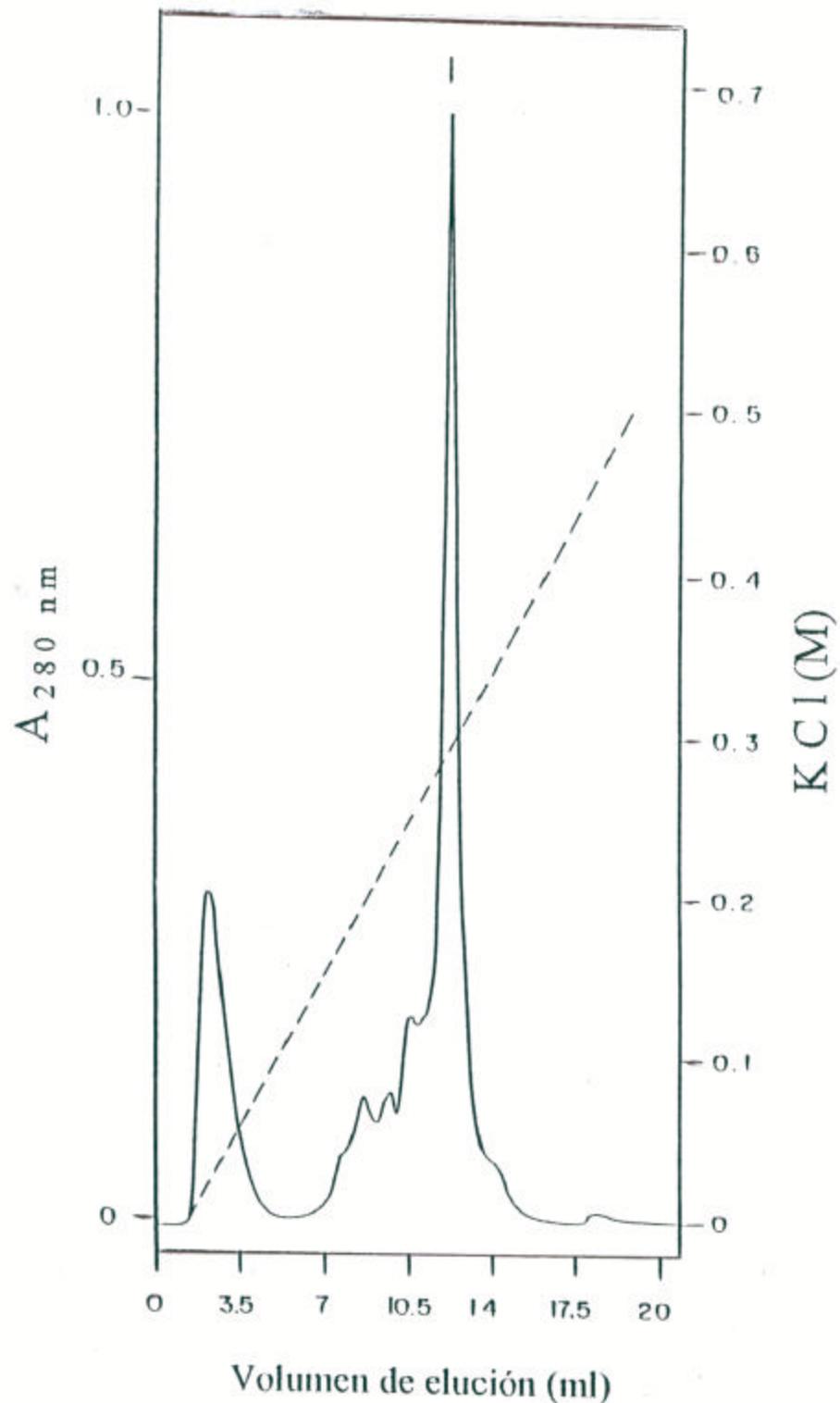


Figura 4.

Purificación de la proteinasa de *Aspergillus saitoi* por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución. Un mililitro (con una concentración de 1 mg/ml) del material obtenido de filtración en gel, fue inyectado en una columna de DEAE 5-PW (0.75 x 7.5 cm) y eluido con un gradiente lineal (línea punteada) de KCl en regulador de fosfatos 0.05 M, pH 4.0. Los componentes proteicos presentes en el volumen eluido fueron detectados por medición de la absorbencia a 280 nm (línea sólida). La flecha indica el componente con actividad proteolítica.

## 4.2 Masas moleculares

Las proteinasas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus awamori* mostraron solamente una banda cuando fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS), figura 5. De las movilidades electroforéticas, determinadas densitométricamente, se estimaron las masas moleculares (Tabla I)

**Tabla I.**

enzima	masa molecular Daltones
<i>Aspergillus awamori</i>	45 000 ± 1000
<i>Aspergillus niger</i>	44 500 ± 1000
<i>Aspergillus saitoi</i>	34 100 ± 1000

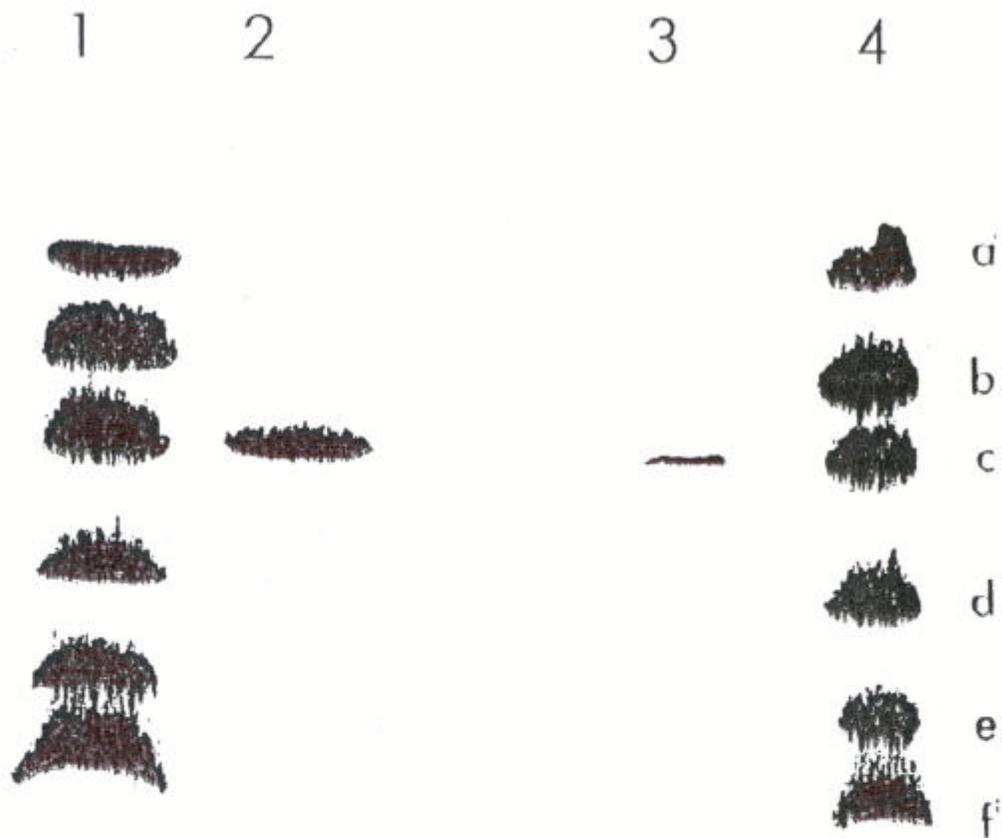


Figura 5.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS), para las proteinasas ácidas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus awamori*, purificadas por intercambio aniónico. Carril 1 y 4 proteínas patrón: a) fosforilasa b, 94 kDa, b) albúmina, 67 kDa, c) ovoalbúmina, 43 kDa, d) anhidrasa carbónica, 30 kDa, e) inhibidor de tripsina, 20 kDa y f)  $\alpha$ -lactoalbúmina, 14.4 kDa. Carril 2 proteinasa ácida de *Aspergillus niger* (0.2 mg/ml). Carril 3 proteinasa ácida de *Aspergillus awamori* (0.1 mg/ml).

### 4.3 Contenido de carbohidratos

El análisis de carbohidratos mostró que la proteinasa ácida de *Aspergillus awamori* contiene 16 % en peso de hexosas neutras (con respecto a glucosa), mientras que las enzimas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus saitoi* presentaron cantidades insignificantes de estos azúcares (< 3 %). Tal diferencia en el contenido de hexosas parece ser algo raro sobre todo en las enzimas de masa molecular semejante. Sin embargo, es sabido que la presencia y naturaleza química de los carbohidratos ligados a las proteinasas ácidas varía de organismo a organismo, dependiendo de las condiciones en las que la enzima es producida (47). De este modo, es posible que carbohidratos presentes en las proteinasas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus saitoi* no puedan ser detectados por el método de Dubois et al. (40).

### 4.4 Dicroísmo circular

La figura 6 muestra los espectros de dicroísmo circular, DC, a pH 4.5 de las tres proteínas purificadas. Ya que la región espectral estudiada (190 a 250 nm) corresponde a la zona en la que el espectro de DC de una proteína es un reflejo de su estructura secundaria (48, 49), podemos establecer que el parecido de las curvas mostradas en la figura 6 indica que las tres enzimas presentan un patrón similar de plegamiento. Además, las principales características espectrales de las enzimas de *Aspergilli*: una banda ancha negativa a 213-214 nm, y dos picos positivos a 197 y 230 nm, han sido también observadas en los espectros de DC de la penicillopepsina (50). Estos resultados sugieren fuertemente que las

proteinasas de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus saitoi*, presentan el patrón estructural típico de las proteinasas ácidas

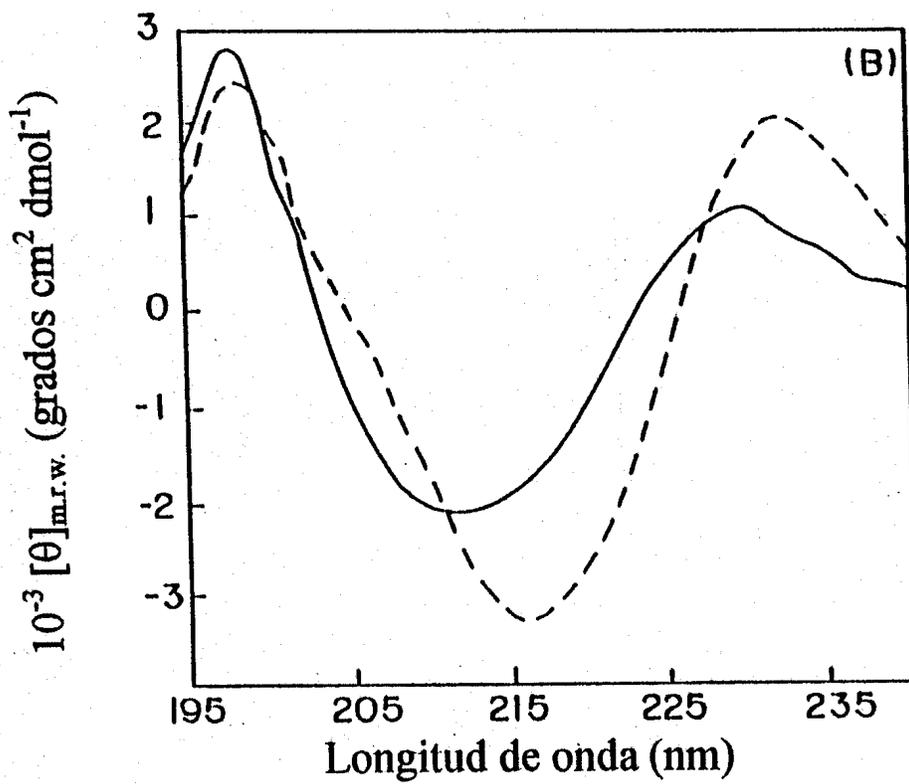
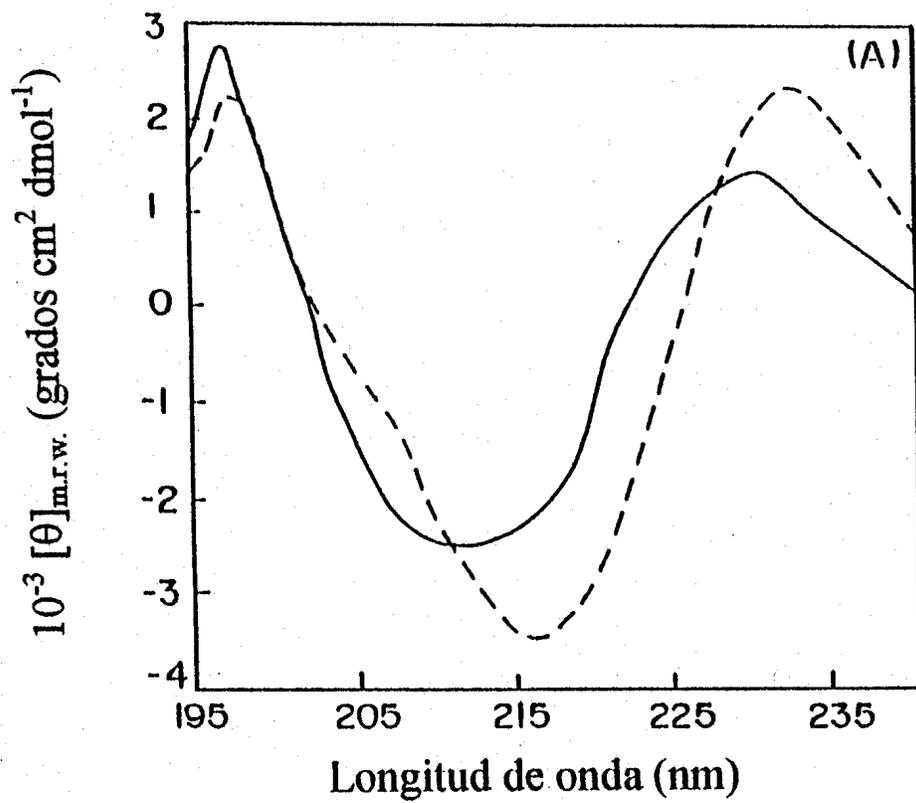
El método LINCOMB (42) fue utilizado para estimar el contenido de estructuras secundarias de las proteinasas ácidas. Este método se eligió debido a que contiene en su base de espectros de dicroísmo circular, proteínas con alto contenido de hoja  $\beta$ -plegada, tales como penicillopepsina, pepsinógeno, inmunoglobulina C, concanavalina A, y  $\gamma$ -II cristalina. El análisis de los espectros experimentales dió las curvas calculadas (figura 6) que reproducen los espectros observados con un error promedio de aproximadamente 300 grados  $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ . En la tabla II, se muestra el porcentaje de contribuciones relativas de estructura secundaria y de cromóforos no-peptídicos a las curvas de DC de las proteinasas ácidas.

Como se puede observar, la hoja  $\beta$ -antiparalela aparece como el principal tipo de estructura regular en la conformación de las enzimas, mientras que la  $\alpha$  hélice tiene solamente una participación minoritaria en la estructura secundaria de estas enzimas. Es importante hacer notar la alta contribución de grupos no-peptídicos (residuos aromáticos y puentes disulfuro) en los espectros de DC, de acuerdo con la gran magnitud del pico observado hacia 230 nm (figura 6).

TABLA II

Porcentaje de contribuciones relativas de estructura secundaria y cromóforos no-peptídicos de las curvas de DC de las proteinasas ácidas.

<b>enzima</b>	<b><math>\alpha</math>-hélice</b>	<b>hoja <math>\beta</math> antiparalela</b>	<b>no-peptídicos</b>	<b>estructura irregular</b>
<i>Aspergillus niger</i>	<b>4.9</b>	<b>19.1</b>	<b>50.8</b>	<b>25.2</b>
<i>Aspergillus awamori</i>	<b>4.0</b>	<b>22.5</b>	<b>48.3</b>	<b>25.2</b>
<i>Aspergillus Saitoi</i>	<b>5.6</b>	<b>14.7</b>	<b>52.5</b>	<b>27.2</b>



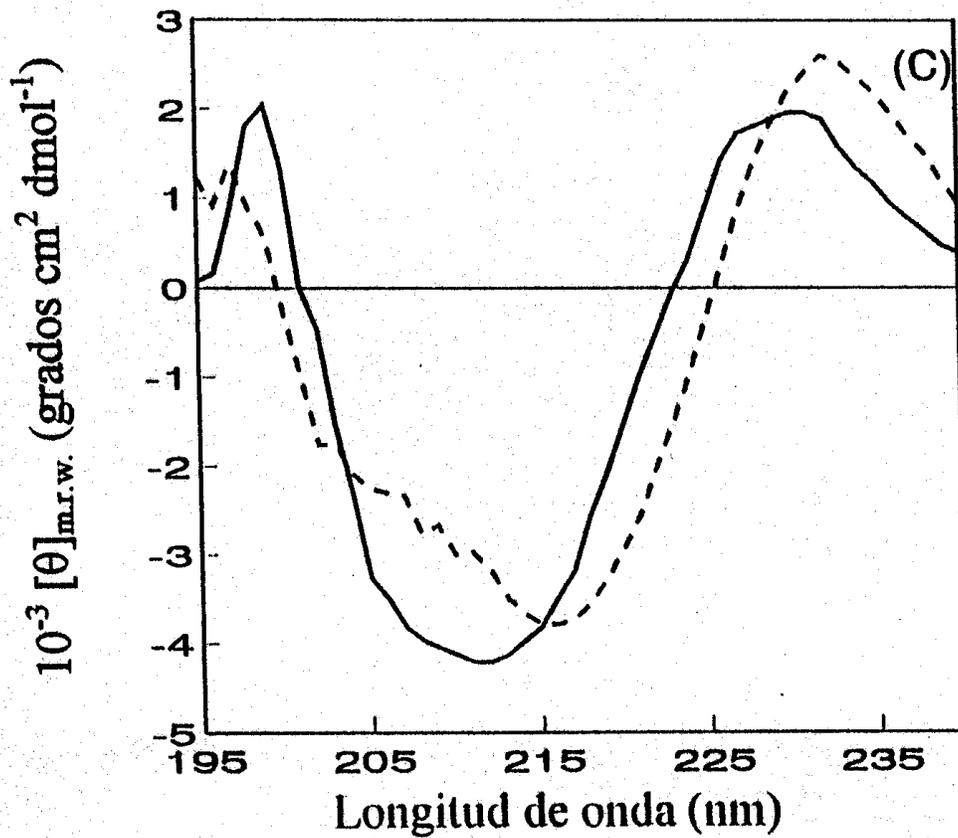


Figura 6.

Espectros de dicroísmo circular para: (A) proteinasa ácida de *Aspergillus niger*, (B) proteinasa ácida de *Aspergillus awamori* y (C) proteinasa ácida de *Aspergillus saitoi* a pH 4.5. (—), curva experimental; (- - - - -) curva reconstruida a partir del análisis de estructuras secundarias por el método de LINCOMB [42].

#### 4.5 Efecto del pH en la actividad y conformación de las proteinasas

En la figura 7 se muestra la influencia del pH en la actividad proteolítica de las tres proteinasas frente a hemoglobina. El máximo de actividad de las enzimas de *Aspergillus awamori* y *Aspergillus saitoi* ocurre a pH 2.9, mientras que para la enzima de *Aspergillus niger* ocurre a pH 2.3. La región de pH donde estas enzimas son activas es típica de las proteinasas ácidas. Variaciones en el pH óptimo, de especie a especie, han sido observadas para otras proteinasas fúngicas (46, 51, 52).

El efecto del pH en la conformación de las proteinasas fue estudiado por monitoreo de la elipticidad a 197 y 230 nm, en la región de pH de 1.5 a 6.5. A valores superiores a pH 4.5 las enzimas sufren un cambio conformacional que es reflejado en la magnitud de sus picos espectrales a las dos longitudes de onda estudiadas (figura 8A y 8B). En contraste una significativa diferencia en el comportamiento de estas enzimas fue observado a valores menores a pH 3. En la proteinasa ácida de *Aspergillus niger*, el perfil de los cambios de DC a 197 nm es notablemente desplazado hacia valores de pH menores (Figura 8A). Estos resultados concuerdan con las curvas de actividad-pH (ver figura 7), lo que sugiere que la pérdida de actividad que ocurre cuando el pH es disminuído es debido a un cambio conformacional mayor.

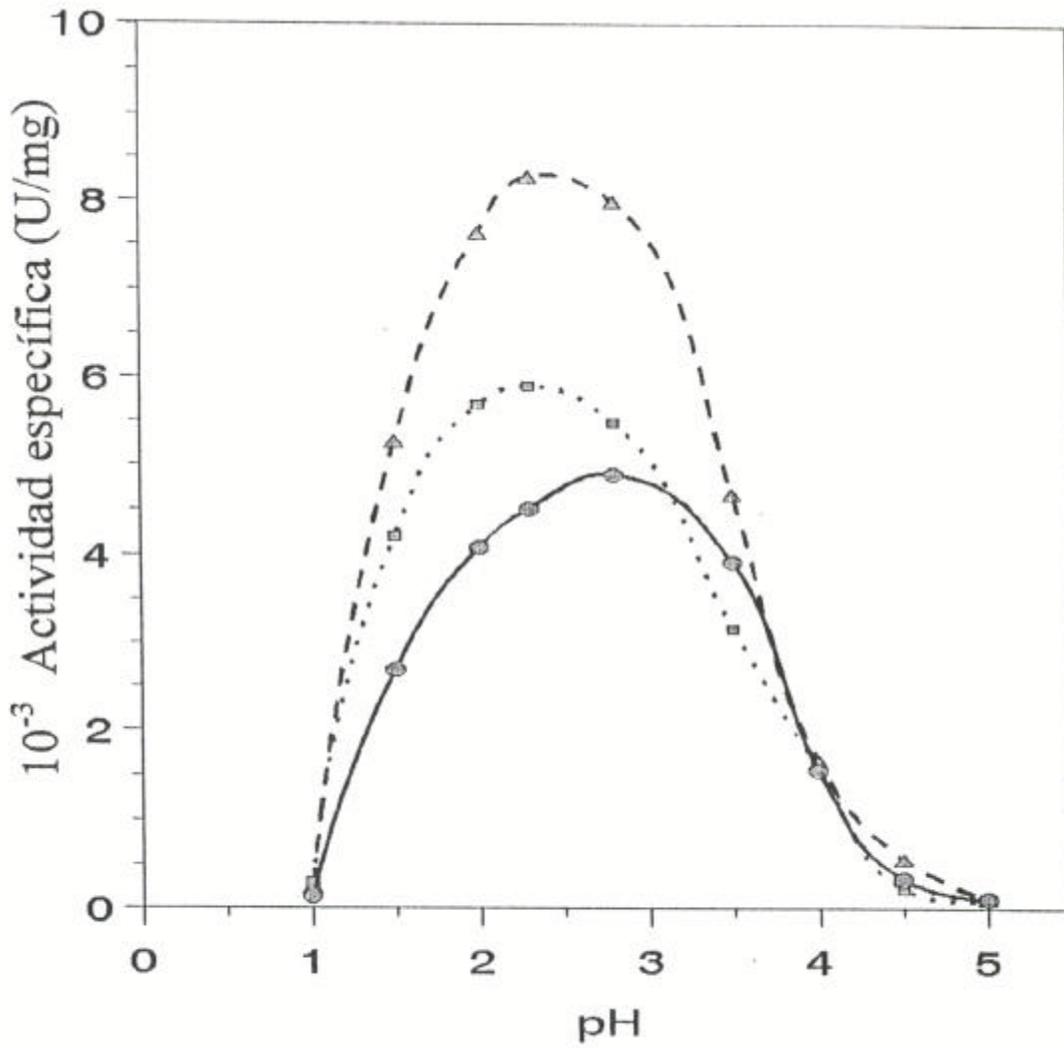


Figura 7.

Efecto del pH en la actividad proteolítica. La actividad fue medida a 35 °C, usando hemoglobina desnaturizada como sustrato. (—○—) proteinasa de *Aspergillus awamori*, (⋯□⋯) proteinasa de *Aspergillus niger* y (---Δ---) proteinasa de *Aspergillus saitoi*.

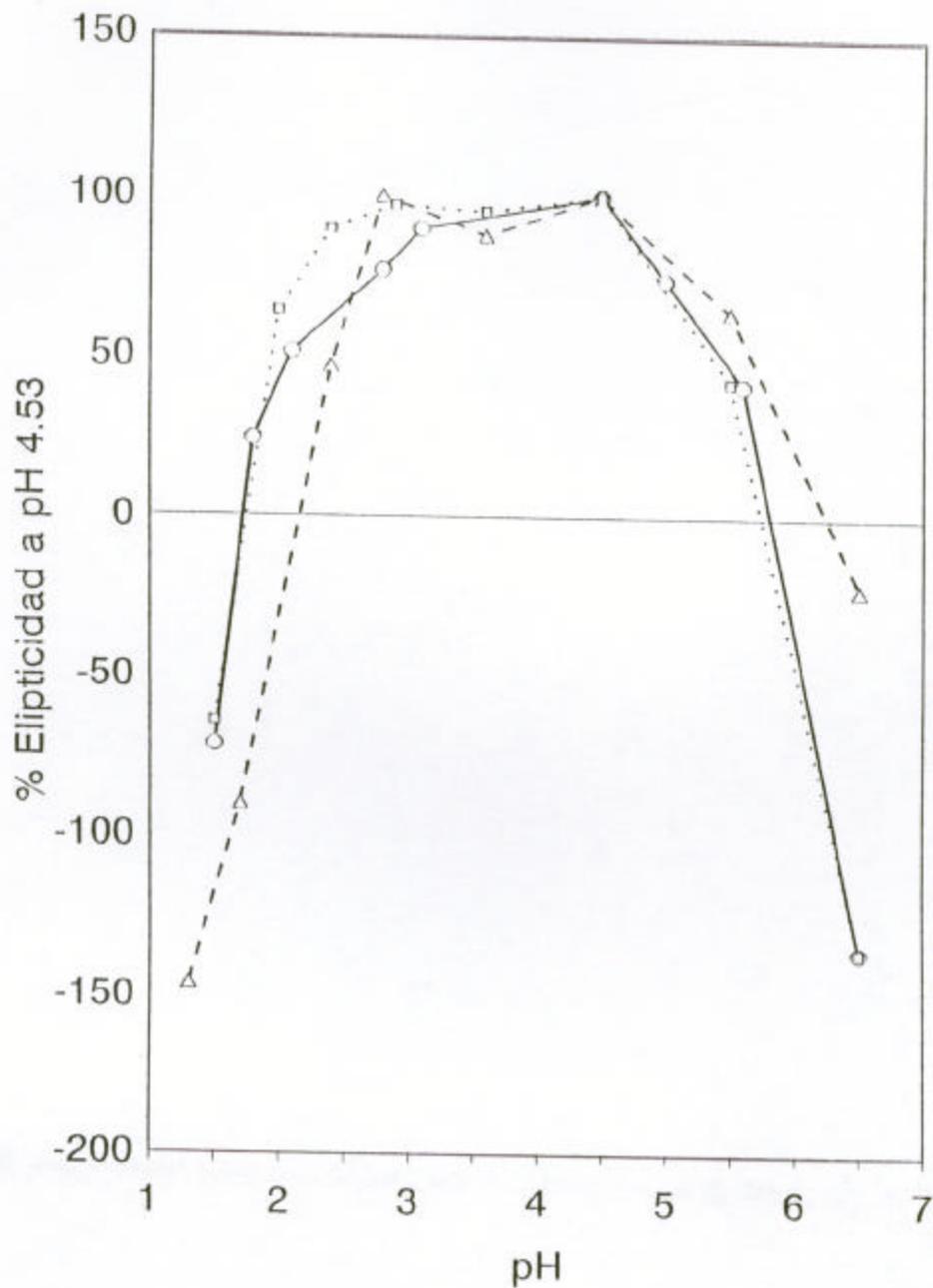


Figura 8 A.

Efecto del pH en la elipticidad de las proteinasas ácidas. Los cambios en dicroísmo circular fueron monitorieados a 197 nm. (—○—) proteinasa de *Aspergillus awamori*; (· · · □ · · ·) proteinasa de *Aspergillus niger* y (- - - Δ - - -) proteinasa de *Aspergillus saitoi*. Los valores de elipticidad son reportados como porcentaje respecto al valor a pH 4.5.

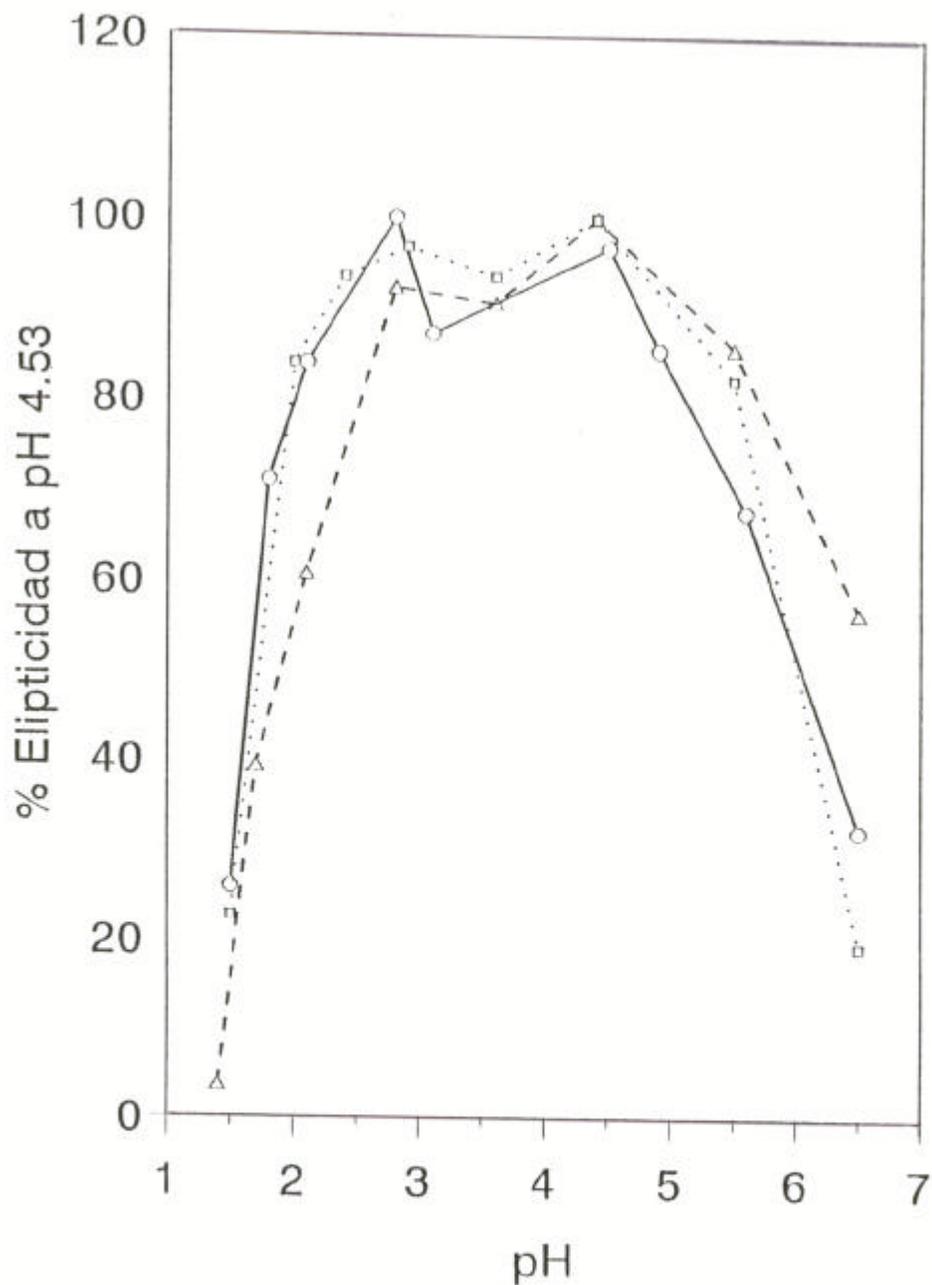


Figura 8B.

Efecto del pH en la elipticidad de las proteinasas ácidas. Los cambios en dicroísmo circular fueron monitoreados a 230 nm. (—○—) proteínasa de *Aspergillus awamori*; (· · · □ · · ·) proteínasa de *Aspergillus niger* y (- - - Δ - - -) proteínasa de *Aspergillus saitoi*. Los valores de elipticidad son reportados como porcentaje respecto al valor a pH 4.5.

**Capítulo 5**  
**Desnaturalización Térmica**  
**de la Proteinasa Ácida de**  
*Aspergillus saitoi*

## 5.1 Dicroísmo circular

El espectro de DC de la proteinasa ácida de *Aspergillus saitoi* a pH 5 y 25 °C se muestra en la figura 9. Los picos positivos a 197 y 230 nm, así como la banda negativa centrada hacia 213 nm, son característicos de la proteinasas ácidas fúngicas (sección 4.4). En el intervalo de pH de 2.5 a 5.5 la forma de los espectros es similar, variando solamente las magnitudes espectrales. Sin embargo, fuera de esta zona, la forma del espectro varía drásticamente, indicando que modificaciones conformacionales de importancia tienen lugar bajo estas condiciones. Considerando esta región de estabilidad, se decidió realizar los estudios de desnaturalización térmica a pH 5.0 ya que la actividad enzimática de la proteinasa fue cercana a cero a este pH, lo que evita el riesgo de autohidrólisis como fuente de irreversibilidad.

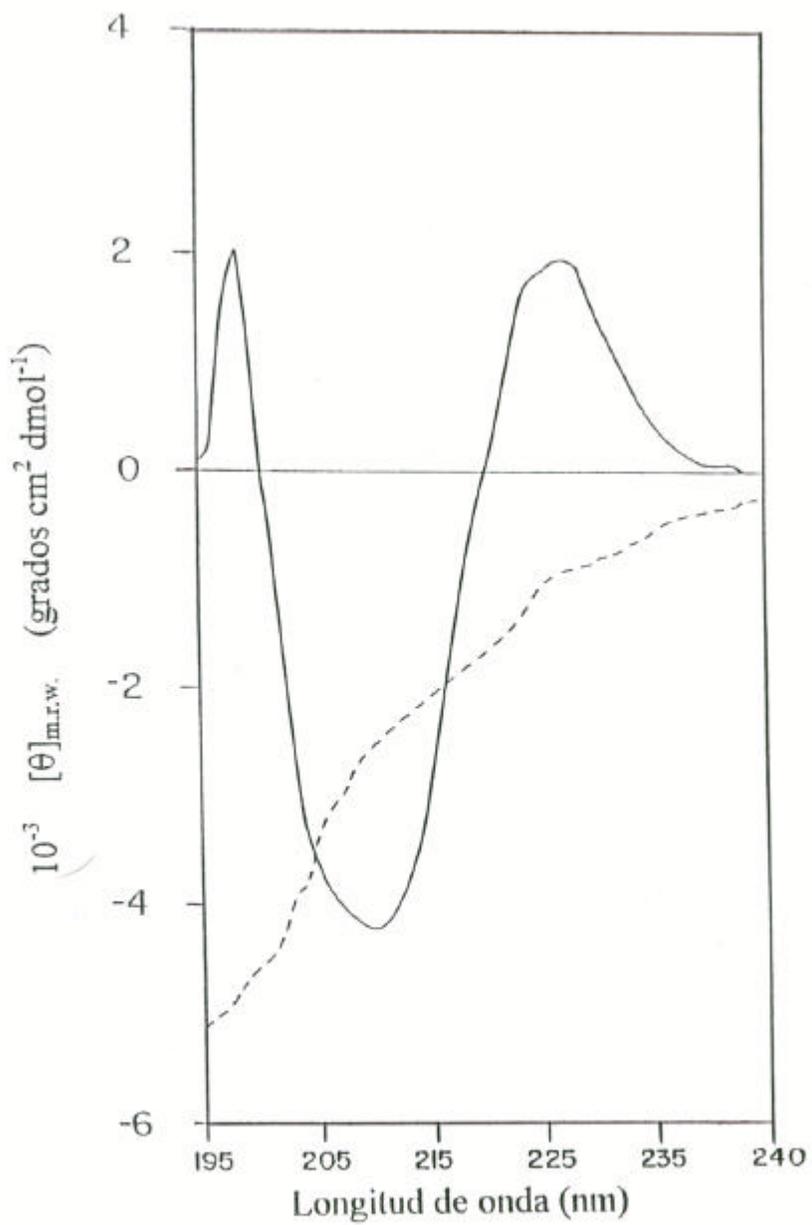


Figura 9.

Espectro de dicroísmo circular para la proteinasa ácida de *Aspergillus saitoi*. Enzima nativa a 25 °C (—); enzima desnaturalizada a 80 °C (- - - - -). Los espectros se obtuvieron en regulador de fosfatos 0.05 M, pH 5.0

## **5.2 Efecto de la velocidad de calentamiento en la desnaturalización térmica**

A 80 °C (pH 5.0) el espectro de DC de la proteinasa (figura 9) presenta las características típicas del espectro de proteínas desnaturalizadas por calentamiento (53). Sin duda, la enzima pierde su estructura nativa a 80 °C. Se observa, especialmente, una gran variación en la señal de DC a 230 nm en función del calentamiento de la muestra, por lo que las mediciones de elipticidad a esta longitud de onda son muy apropiadas para seguir el proceso de desnaturalización térmica de la enzima. La figura 10, muestra las curvas de transición térmica seguidas a diferentes velocidades de calentamiento, por monitoreo de la elipticidad a 230 nm. En la Tabla III se muestran los valores para la velocidad de barrido y la temperatura media de cada transición de la figura 10. En algunos experimentos la transición se siguió a 197 nm; las curvas resultantes son completamente superponibles a las de la figura 10, lo que indica que en ambas longitudes de onda la señal de DC, monitoreó el mismo proceso.

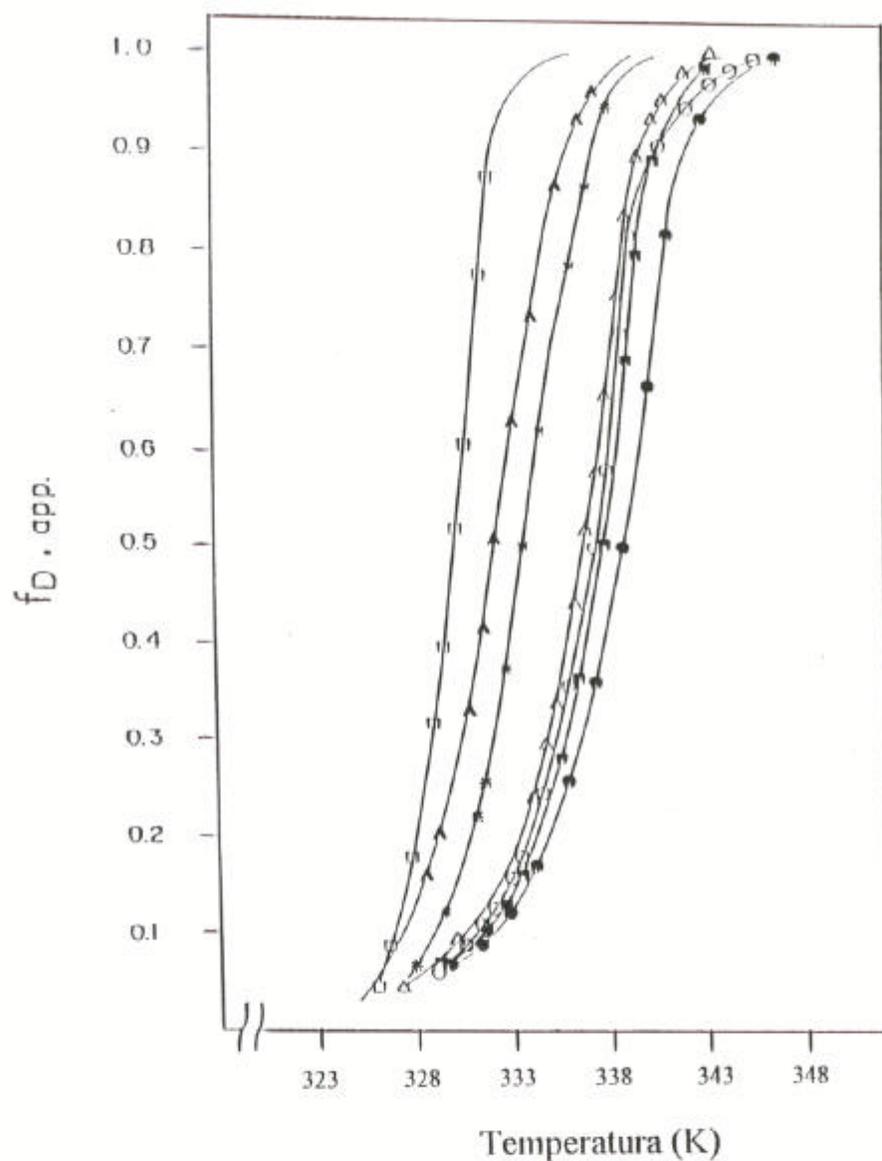


Figura 10.

Curvas de desnaturalización térmica para la proteinasa ácida de *Aspergillus saitoi* a pH 5.0. Las curvas de transición se obtuvieron a diferentes velocidades de calentamiento: 1.5 (●), 1.2 (■), 1.0 (○), 0.7 (△), 0.4 (\*), 0.2 (▲) y 0.086 (□) K/min. El proceso de desnaturalización se siguió por monitoreo de la elipticidad a 230 nm la fracción aparente de proteína desnaturalizada,  $f_{D,app}$ , fue calculada como se indica en el texto.

**TABLA III.**

<b>VELOCIDAD DE BARRIDO (K/min)</b>	<b>T<sub>m</sub> (K)</b>
<b>0.086</b>	<b>330.5</b>
<b>0.2</b>	<b>332.9</b>
<b>0.4</b>	<b>334.1</b>
<b>0.7</b>	<b>336.5</b>
<b>1.0</b>	<b>336.8</b>
<b>1.2</b>	<b>338.5</b>
<b>1.5</b>	<b>339.0</b>

Como se observa en la figura 10, la transición de la desnaturalización fue fuertemente dependiente de la velocidad de calentamiento, como es de esperarse para un proceso de desplegamiento que se encuentra bajo control cinético debido a la presencia de una reacción irreversible (54-56). Así mismo, las muestras que fueron calentadas a temperaturas superiores a 75 °C (temperatura a la cual la transición había sido completada) no mostraron reversibilidad de la señal de DC cuando fueron enfriadas a 25 °C. Después de permanecer algunos minutos las muestras a dicha temperatura, se observó

turbidez en las disoluciones. Esto sugiere que la irreversibilidad puede estar asociada con agregación de la proteína desdoblada.

Desde el punto de vista del carácter irreversible de la desnaturalización térmica de la proteinasa ácida, se analizaron las curvas de transición en términos de un modelo simple de dos estados.



donde  $N$  representa el estado nativo y  $D$  el estado desnaturalizado irreversible de la proteína, siendo  $k_{app}$  la constante de velocidad aparente de primer orden que cambia con la temperatura según la ecuación de Arrhenius. La ecuación 12 puede ser utilizada para analizar las curvas de transición para la desnaturalización térmica de la proteinasa ácida, considerando un modelo irreversible de dos estados. Por lo tanto, se construyó un diagrama de  $\ln \frac{v}{T_m}$  en función de  $1/T_m$ , (a partir de las curvas de transición, figura 10) en donde se observa, figura 11, una apreciable curvatura, lo que sugiere que la  $k_{app}$  no es la constante de velocidad de una reacción elemental. En contrapunto, utilizando el segundo método para calcular la energía de activación del proceso, ecuación 13, a partir de los

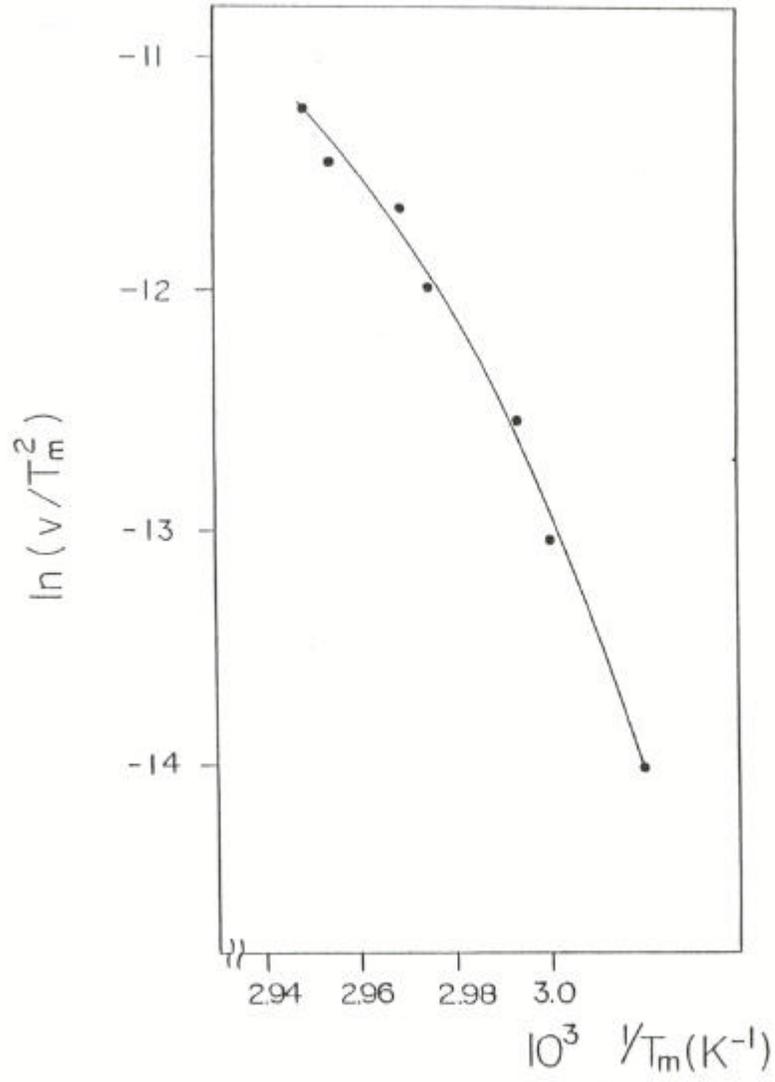


Figura 11.

Diagrama del  $\ln \frac{v}{T_m^2}$  en función de  $1/T_m$ . Cada punto corresponde a una de las siete curvas de transición de la Figura 10.

valores de  $k_{app}$  determinados de un gráfico de  $\ln f_N$  en función de la temperatura (figura 12), y construyendo un diagrama de Arrhenius con  $\ln k_{app}$  en función de  $1/T$  se obtuvo una línea recta de donde  $E_{app}$  es 286 kJ/mol (figura 13). Por lo tanto, se observa una discrepancia en los resultados de los diagramas para el cálculo de la energía de activación; el primer método, figura 11, no permite explicar que la desnaturalización térmica de la proteinasa ácida de *Aspergillus saitoi* sea un proceso que siga un modelo irreversible de dos estados, mientras que el segundo método, figura 13, indica que la desnaturalización si cumple dicho modelo.

Para explicar el comportamiento observado se considera que la desnaturalización térmica de la proteinasa ácida de *Aspergillus saitoi* sigue un mecanismo del tipo Lumry-Eyring (44) (sección 3.2):



Donde  $K$  es la constante de equilibrio para la transición del estado nativo ( $N$ ) al estado desdoblado ( $U$ ),  $k$  la constante de velocidad de primer orden, para la reacción del estado desdoblado ( $U$ ) al estado desdoblado irreversible ( $D$ ), que varía con la temperatura según la ecuación de Arrhenius.

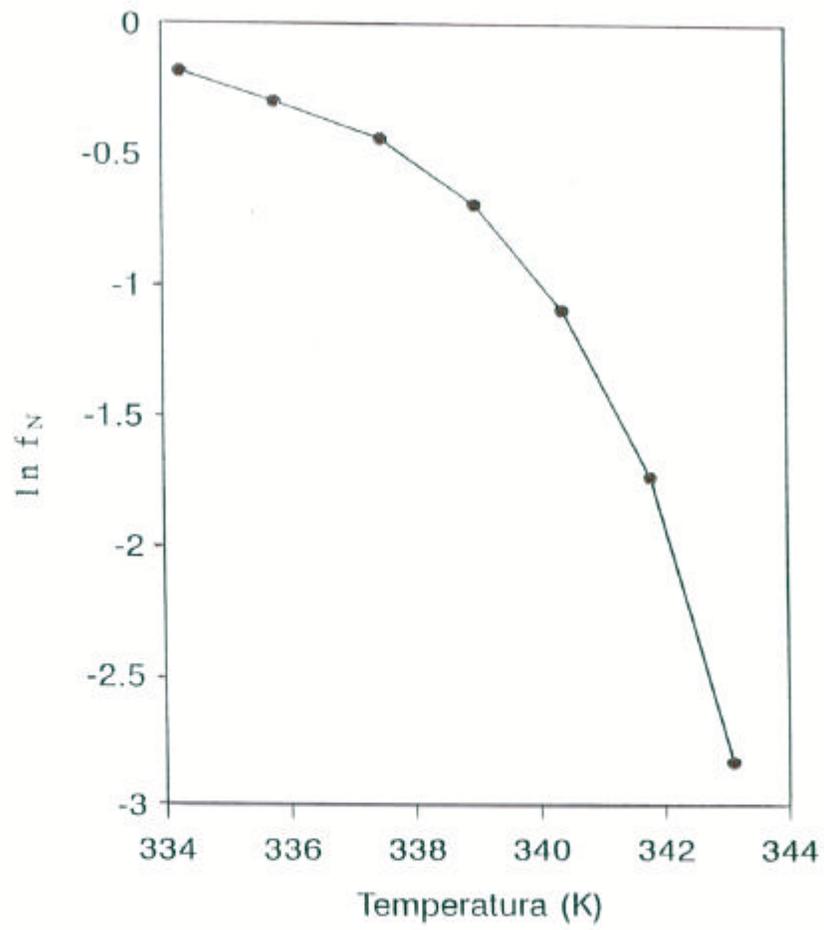


Figura 12.

Diagrama del  $\ln f_N$  en función de la temperatura, para calcular  $k_{app}$  según la ecuación 13 (sección 3.2)

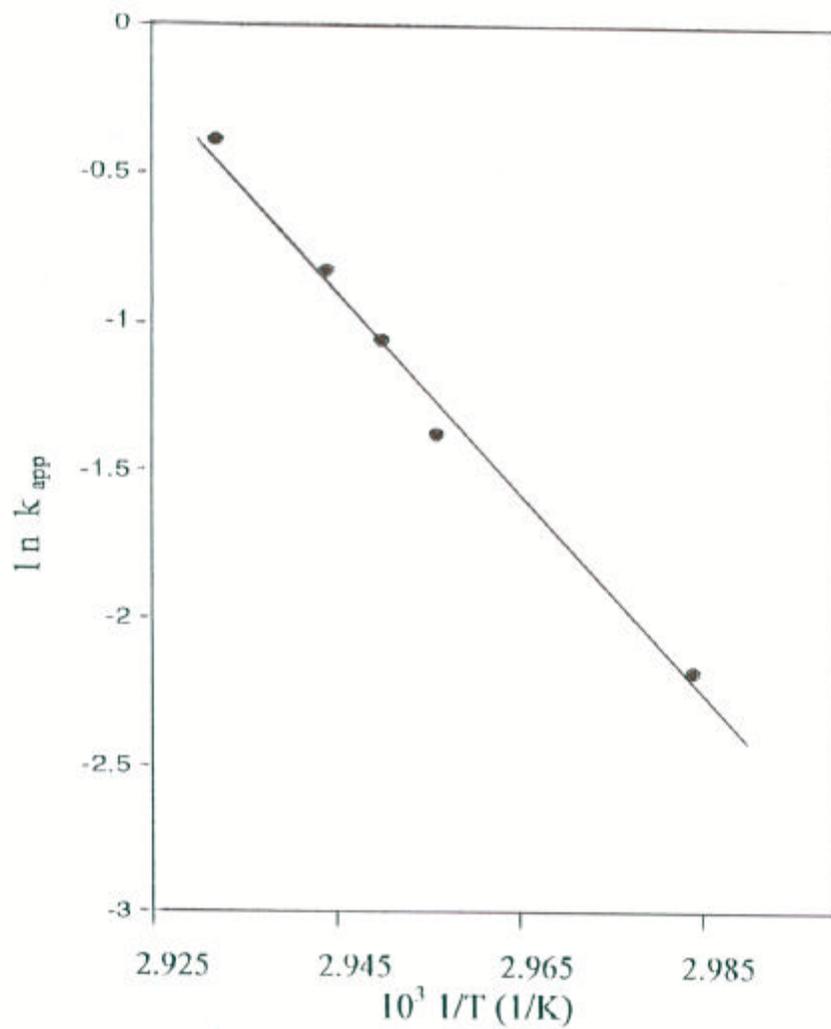


Figura 13.

Diagrama de Arrhenius para el modelo irreversible de dos estados. La energía de activación aparente,  $E_{app}$ , es 286 kJ/mol. (La ordenada al origen es  $\ln k = 100$ ).

### 5.3 Cálculo de la entalpía de van't Hoff, para la reacción reversible del modelo de Lumry-Eyring

Se ha observado que las curvas de calorimetría diferencial de barrido (56, 57) para proteínas que se comportan según el modelo de Lumry-Eyring son fuertemente afectadas por la velocidad de calentamiento. Por supuesto, este efecto también puede ser observado en curvas de transición, seguidas por monitoreo de la elipticidad, en función de la temperatura. Sin embargo, si asumimos que el equilibrio siempre está presente, cierta información termodinámica del proceso reversible de  $N$  a  $U$  podrá ser obtenida por extrapolación a velocidad infinita de calentamiento (56, 58). En particular, se puede demostrar (ver apéndice A) que la entalpía aparente de van't Hoff, definida por:

$$\frac{d \ln K_{app}}{d 1/T} = - \frac{DH_{vH,app}}{R} \quad (17)$$

$$K_{app} = \frac{f_{D,app}}{(1 - f_{D,app})} \quad (18)$$

sigue una dependencia aproximadamente lineal de  $1/v$ , cuando  $1/v$  tiende a cero,

$$DH_{vH,app} \approx (RT^2 k)(1/v) + DH_{vH} \quad (19)$$

Por lo tanto, la extrapolación de  $DH_{vH,app}$  a  $1/v = 0$  dará la entalpía de equilibrio de van't Hoff,  $DH_{vH}$ . La figura 14 muestra este tipo de diagrama para la desnaturalización de la proteinasa ácida. Las entalpías aparentes de van't Hoff fueron calculadas a partir de las curvas de transición de la figura 10. Aunque la ecuación 19 establece que los valores de la entalpía de van't Hoff aparente, deben ser calculados a la misma temperatura, en la práctica su evaluación a partir de cada una de las curvas de transición no introduce errores apreciables, ya que la entalpía de van't Hoff puede ser considerada constante dentro del intervalo de temperatura estudiado. En la figura 14, los datos de las velocidades de calentamiento más altas fueron extrapolados linealmente a  $1/v = 0$ , obteniéndose una entalpía de van't Hoff igual a 234 kJ/mol.

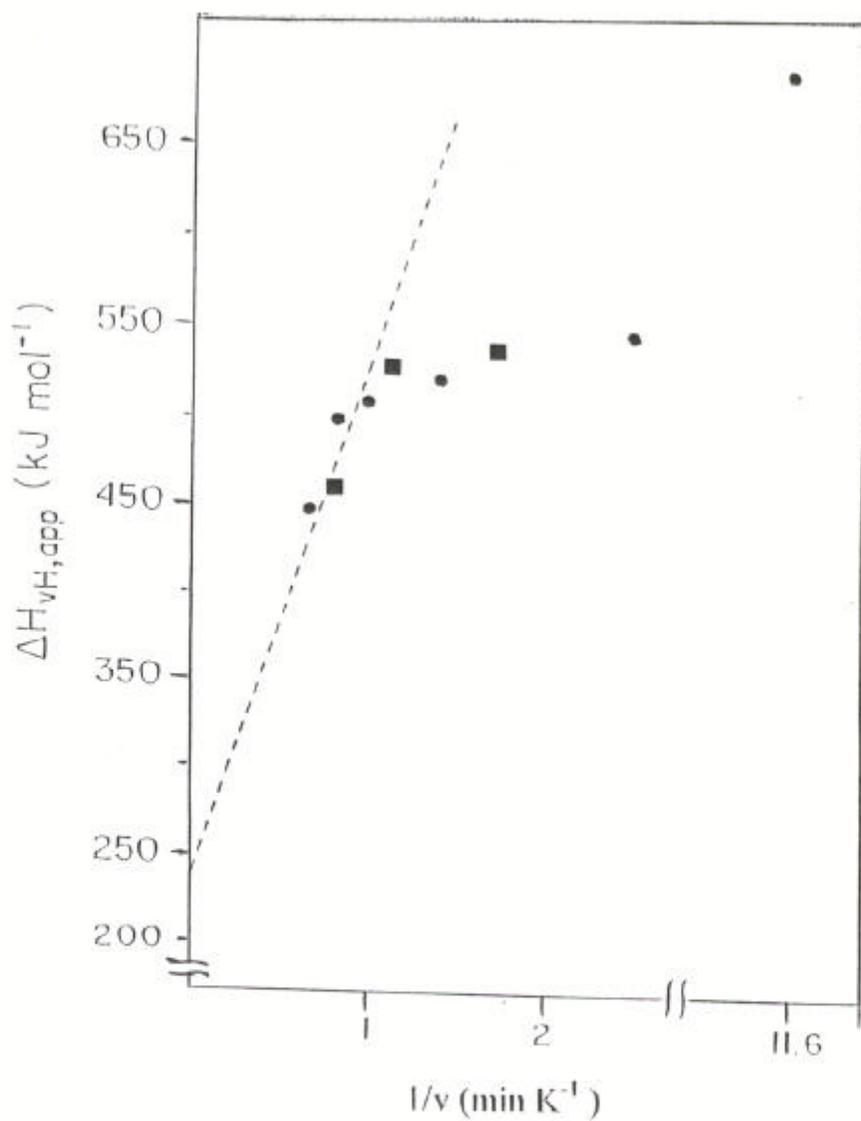


Figura 14.

Entalía aparente de van't Hoff,  $\Delta H_{vH,app}$ , en función del recíproco de la velocidad de calentamiento,  $1/v$ . (•) valores obtenidos a partir de los experimentos de dicroísmo circular (Figura 10) y (■) valores obtenidos a partir de los experimentos de calorimetría diferencial de barrido. La línea punteada ilustra la extrapolación de  $\Delta H_{vH,app}$  a velocidad de calentamiento infinito, obteniéndose una entalía de van't Hoff de 234 kJ/mol.

#### 5.4 Estimación directa de la entalpía de van't Hoff ( $DH_{vH}$ )

El análisis de datos descrito anteriormente se basa en la suposición de que el comportamiento de la desnaturalización térmica de la proteinasa ácida sigue un modelo del tipo Lumry-Eyring. Adicionalmente, para sustentar esta suposición, se pudo demostrar experimentalmente la presencia del estado desplegado (U), el cual existe en equilibrio con el estado nativo (N). Se observó que cuando la enzima se calentaba (a 1.5 K/min) hasta una temperatura  $T'$  y se enfriaba súbitamente (10 K/min) a 25 °C, el cambio en la señal de DC era considerablemente reversible (figura 15). Además si los cambios de elipticidad son expresados como  $f_{D, app}$ , (como en la figura 15) y bajo la suposición de que tanto el estado U, como el estado D muestran la misma elipticidad, se tiene que:  $f_{D, app} = f_D + f_U$ , ( $f_U$  es la fracción de proteína en el estado desdoblado, U, y  $f_D$  la fracción de proteína en el estado desnaturalizado irreversiblemente D). Por lo tanto, cuando la muestra se encuentra a una temperatura  $T'$  y es enfriada rápidamente desde  $T'$  hasta 25 °C, la extensión de la reversibilidad en  $f_{D, app}$ , dará una estimación cuantitativa del valor de  $f_U$  a la temperatura  $T'$ . Adicionalmente, ya que  $f_N = 1 - f_{D, app}$ , la constante de equilibrio para la reacción reversible puede ser calculada a partir de:

$$K = \frac{f_U}{f_N (1 - f_{D,app})} \quad (20)$$

Para una serie de experimentos de enfriamiento súbito desde diferentes  $T'$ , en la región de temperatura de la transición, se determinaron los valores correspondientes de  $f_U$ . Por lo tanto, se calculó una constante de equilibrio para cada  $f_U$ . El diagrama de van't Hoff ( $\ln K$  en función de  $1/T$ ) construido se muestra en la figura 16, donde se obtiene una línea recta con pendiente igual a  $-DH_{vH}/R$ . La entalpía de van't Hoff para el equilibrio es de 176 kJ/mol. El valor de la entalpía de van't Hoff determinado por este método es el límite más bajo para la verdadera  $DH_{vH}$ . Esto es debido al hecho de que en los experimentos efectuados la muestra tardó un tiempo finito en enfriarse, durante el cual parte de las moléculas de proteína en el estado  $U$  fueron transformadas al estado  $D$ , causando una subestimación de  $f_U$  y de  $K$ . Sin embargo, el valor de 176 kJ/mol es satisfactorio, dentro de las limitaciones del método empleado, si lo comparamos con la estimación previa de  $DH_{vH}$  (sección 5.3).

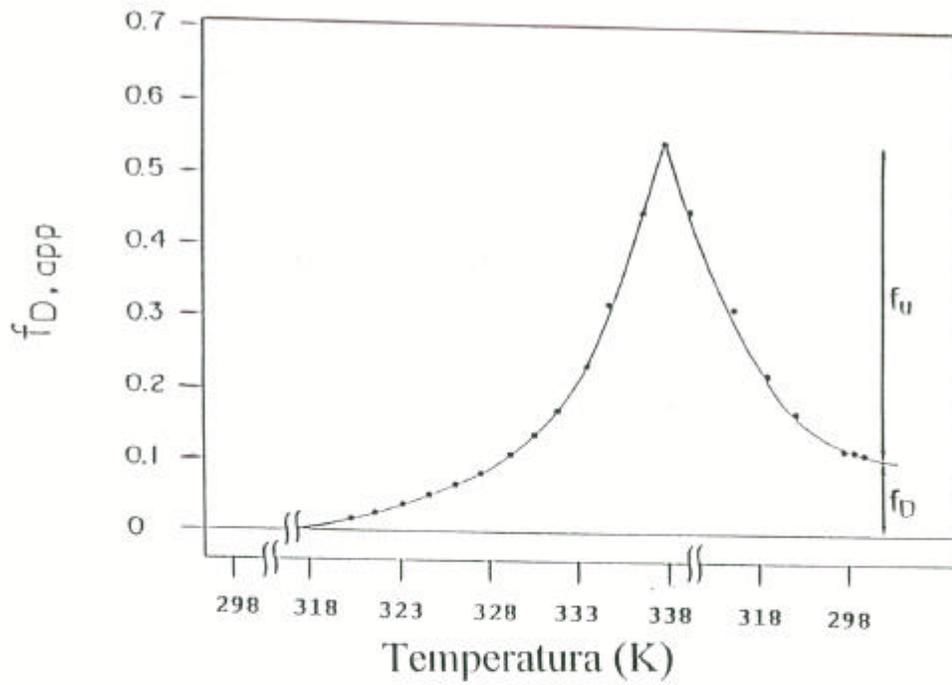


Figura 15.

Reversibilidad parcial en la desnaturalización térmica de la proteinasa ácida de *Aspergillus saitoi*. Una muestra de la enzima fue calentada a 338 K y, entonces fue enfriada rápidamente a 298 K. El proceso fue monitoreado por el cambio en la elipticidad a 230 nm, y la fracción aparente de proteína desnaturalizada,  $f_{D, app}$ , fue calculada como se indica en el texto. También se muestran los valores para la fracción en el estado desdoblado,  $f_D$ , y la fracción en el estado desnaturalizado irreversiblemente,  $f_{D, irr}$  a 338 K.

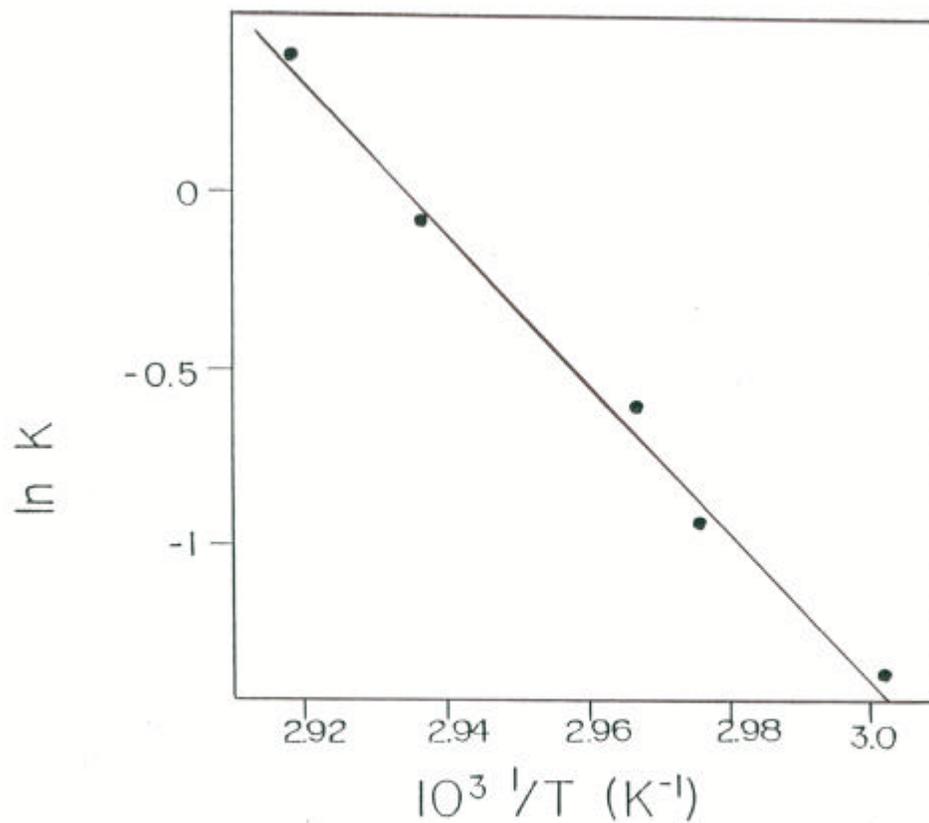


Figura 16.

Estimación de la entalpía de equilibrio de van't Hoff. Las constantes de equilibrio fueron determinadas a partir de cinco experimentos como el de la figura 15. El valor de la entalpía de van't Hoff es de 176 kJ/mol.

## 5.5 Cálculo de la energía de activación para la reacción irreversible del modelo de Lumry-Eyring

Para el modelo de Lumry-Eyring (ec. 14), se puede demostrar (apéndice B) que:

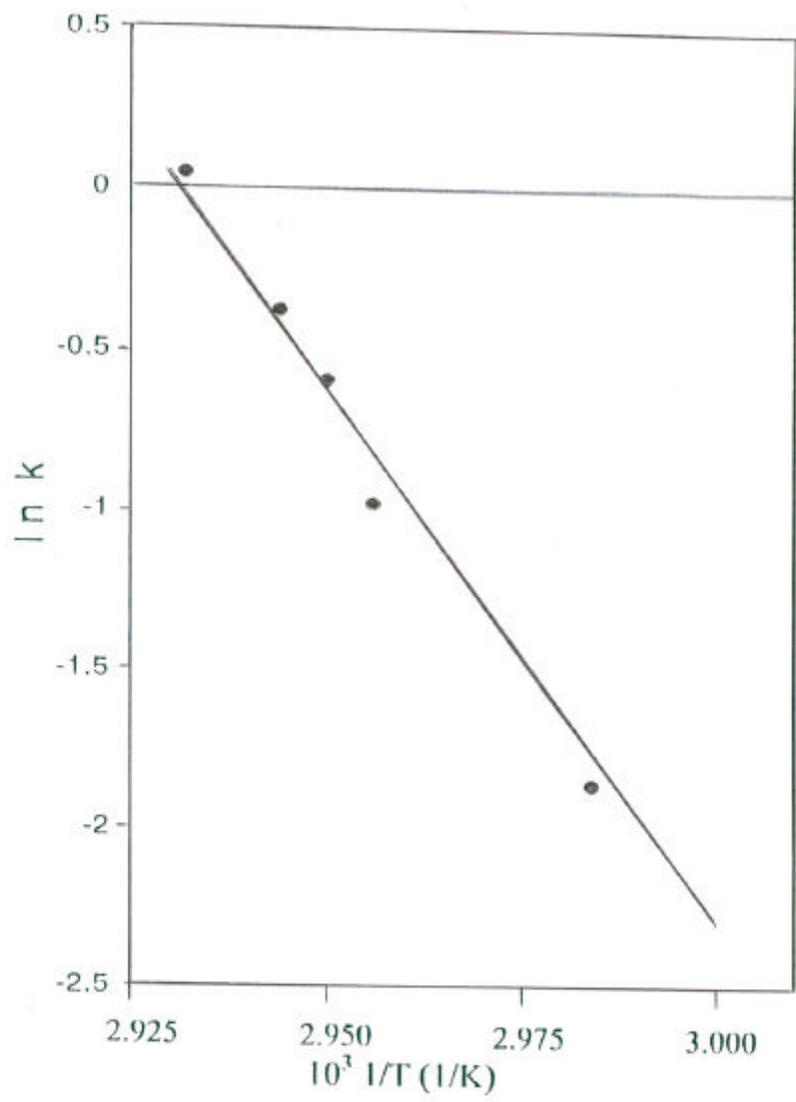
$$\frac{1}{f_N} \frac{df_N}{dT} = -\frac{1}{v} \left( \frac{K}{K+1} \right) \left( k + \frac{vDH_{vH}}{RT^2} \right) \quad (21)$$

de donde la constante de velocidad para la reacción irreversible esta dada por la ecuación:

$$k = -v \left( \frac{K+1}{K} \right) \frac{d \ln f_N}{dT} - \frac{vDH_{vH}}{RT^2} \quad (22)$$

Aunque esta expresión no es simple, es posible calcular  $k$  si se conoce la constante de equilibrio y el cambio del  $\ln f_N$  en función de la temperatura, la entalpía de van't Hoff y la velocidad de barrido

De esta forma, la energía de activación de la reacción irreversible se calculó a partir de un gráfico de  $\ln k$  en función de  $1/T$  (figura 17). El valor de la energía de activación,  $E = 308$  kJ/mol, para la reacción irreversible del modelo de Lumry-Eyring es del mismo orden que la energía de activación aparente ( $E_{app} = 286$  kJ/mol), calculada para el proceso irreversible de dos estados.



**Figura 17.**

Diagrama de Arrhenius para la energía de activación de la reacción irreversible del modelo de Lumry-Eyring. Las constantes de velocidad,  $k$ , se calcularon según la ecuación 22 (sección 5.5). El valor de la energía de activación es 308 kJ/mol. [La ordenada al origen es  $\ln k = A = 108.8$ ]

## 5.6 Fracciones de los estados N, U y D en función de la temperatura, de acuerdo al modelo de Lumry-Eyring

Para el modelo de Lumry-Eyring descrito en la ecuación (14), Sánchez-Ruiz (57) demostró, bajo la suposición de que el equilibrio es siempre establecido, que las fracciones para los tres estados considerados en el modelo están dadas por:

$$f_N = \frac{1}{K+1} \exp\left[-\frac{1}{v} F(T)\right] \quad (23)$$

$$f_U = \frac{K}{K+1} \exp\left[-\frac{1}{v} F(T)\right] \quad (24)$$

$$f_D = 1 - \exp\left[-\frac{1}{v} F(T)\right] \quad (25)$$

donde

$$F(T) = \int_{T_0}^T \frac{kK}{K+1} dT \quad (26)$$

En estas ecuaciones  $K = f_U/f_N$ ,  $v$  es la velocidad de barrido y  $k$  es la constante de velocidad de primer orden para el proceso  $U \rightleftharpoons D$ . Si se asume que los estados  $U$  y  $D$  tienen el mismo valor para la observable usada para monitorear la transición, entonces tendremos que:  $f_{D, app} = f_U + f_D$ .

Ya que la desnaturalización térmica de la proteinasa ácida de *Aspergillus saitoi* sigue un modelo del tipo Lumry-Eyring, se calcularon, entonces, las poblaciones presentes para cada estado del modelo. Las constantes de equilibrio a cada temperatura se calcularon a partir de la ecuación de van't Hoff empleando el valor de  $\mathbf{DH}_{vH} = 234 \text{ kJmol}^{-1}$  y las constantes de velocidad a partir de la ecuación de Arrhenius con  $E = 308 \text{ kJmol}^{-1}$  y  $A = 108.8$ .

La integral  $F(T)$ , se calculó como:

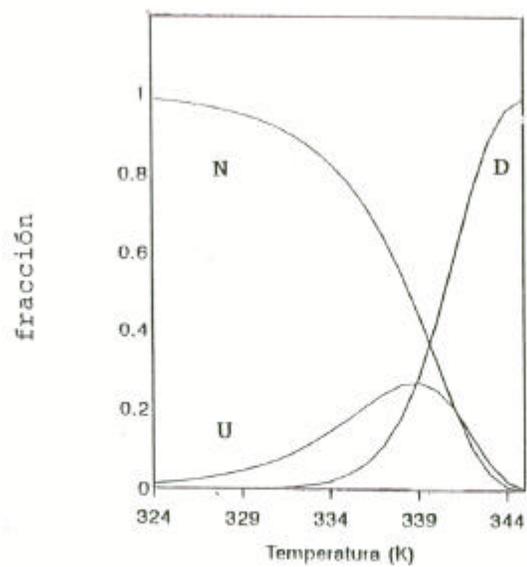
$$F(T) = \int_{T_0}^T \frac{\exp\left\{ \left( A + \frac{DS}{R} \right) - \left( \frac{DH+E}{RT} \right) \right\}}{\exp\left( \frac{-DH}{RT} + \frac{DS}{R} \right) + 1} dT \quad (27)$$

y se evaluó de forma numérica utilizando el programa *mathematica*.

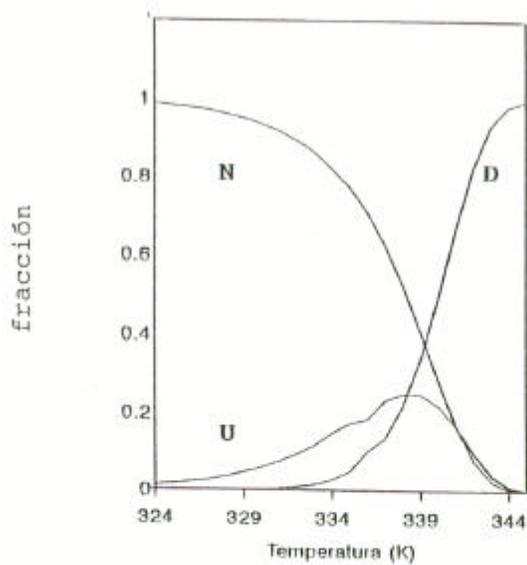
Con  $DS = 516 \text{ J/K}$ , el valor de la temperatura inicial  $T_0$  (320 K), corresponde a una temperatura a la cual la velocidad de reacción es despreciable (57).

En la figura 18 se muestran las fracciones para los estados  $f_N$ ,  $f_U$  y  $f_D$  en función de la temperatura, a las diferentes velocidades de barrido. Se observa que las poblaciones de los tres estados involucrados en el modelo de Lumry-Eyring son fuertemente dependientes de la velocidad de barrido, como es de esperarse para un proceso de desplegamiento que se encuentra bajo control cinético debido a la presencia de la reacción irreversible. En la figura 19 se presentan, para cada velocidad de barrido, las curvas de transición en función de la temperatura para la fracción desnaturalizada aparente, tanto la observada experimentalmente,  $f_{Dapp, ob}$  como la calculada según las ecuaciones 23 a 26,  $f_{Dapp}$ . Se observa que la curva experimental y la calculada se comportan de forma muy similar, para velocidades de barrido de 0.7, 1.0, 1.2 y 1.5 K/min. Mientras que para velocidades de barrido menores, es decir, 0.086, 0.2 y 0.4 K/min la curva calculada se desplaza hacia la derecha de la curva experimental, esto es,  $T_m$  de la curva calculada es mayor que la  $T_m$  de la curva experimental. Este comportamiento puede ser atribuido a factores cinéticos que involucran directamente la reacción irreversible del modelo de Lumry-Eyring. Recordemos que la curva calculada depende de la integral  $F(T)$  y que ésta es una función de la constante de velocidad de la reacción

irreversible cuya estimación depende, en forma más bien compleja, de parámetros de la transición reversible (ecuación 22).



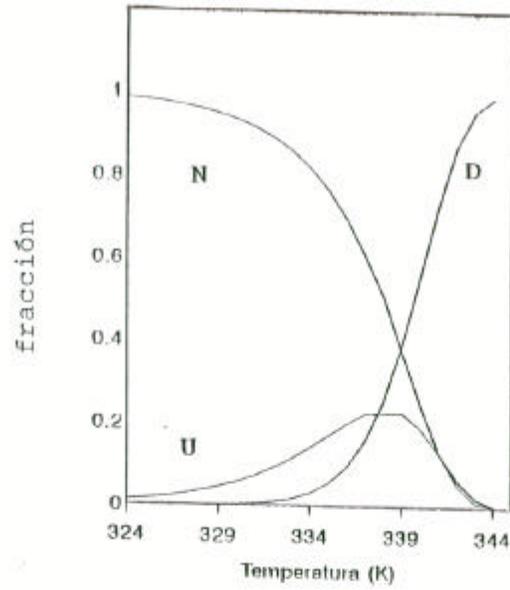
velocidad de calentamiento 1.5 K/min



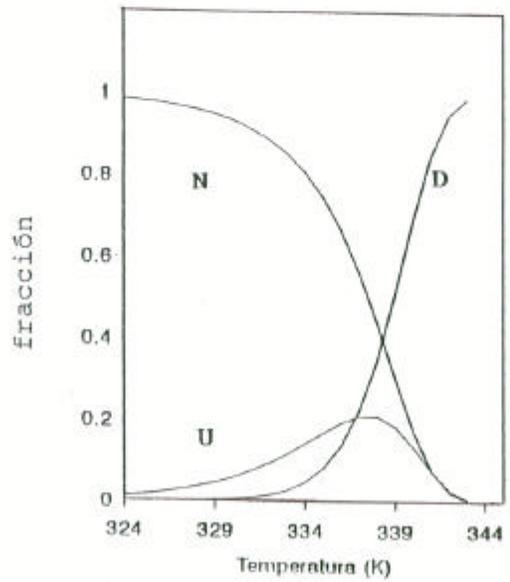
velocidad de calentamiento 1.2 K/min

Figura 18.

Fracciones para los estados  $f_N$ ,  $f_U$  y  $f_D$  en función de la temperatura, de acuerdo al modelo de Lumry-Eyring. Las fracciones fueron calculadas utilizando las ecuaciones 23 a 27 (sección 5.6).



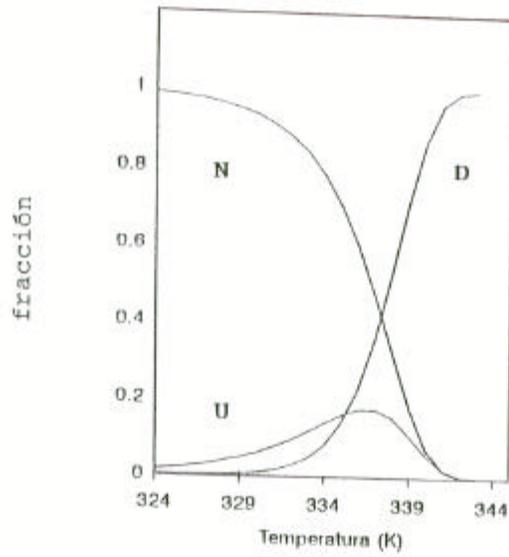
velocidad de calentamiento 1.0 K/min



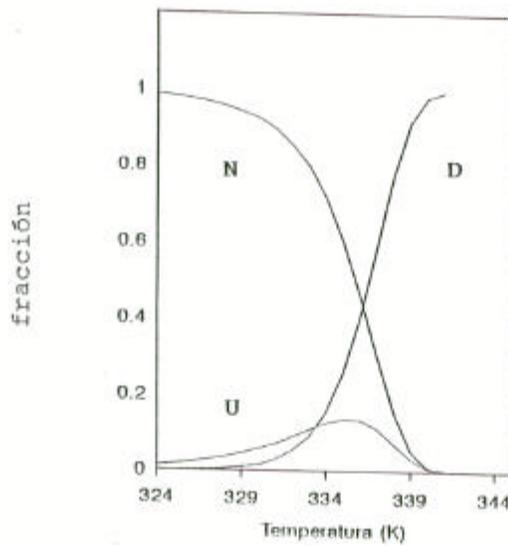
velocidad de calentamiento 0.7 K/min

Figura 18.

Fracciones para los estados  $f_N$ ,  $f_U$  y  $f_D$  en función de la temperatura, de acuerdo al modelo de Lumry-Eyring. Las fracciones fueron calculadas utilizando las ecuaciones 23 a 27 (sección 5.6).



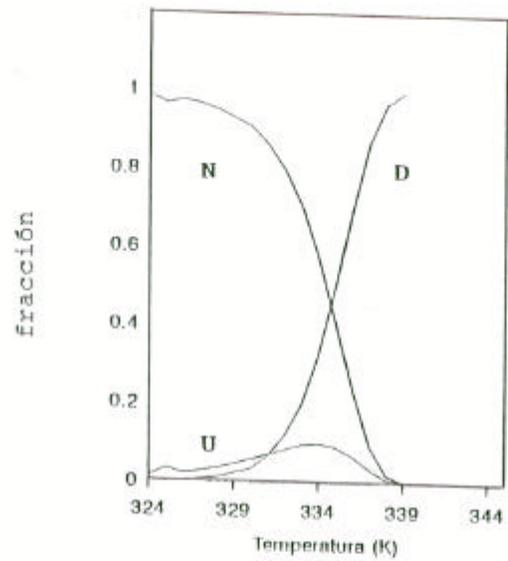
velocidad de calentamiento 0.4 K/min



velocidad de calentamiento 0.2 K/min

Figura 18.

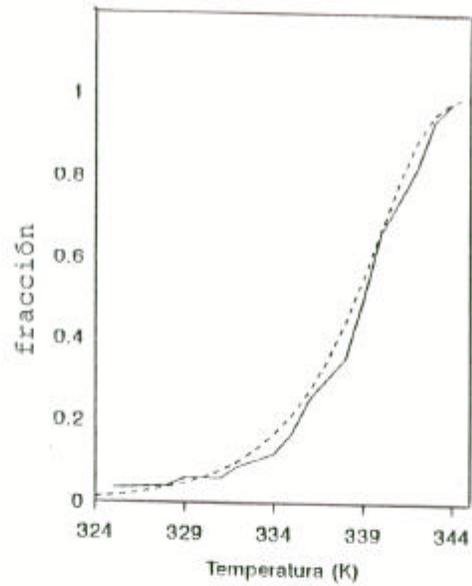
Fraciones para los estados  $f_N$ ,  $f_U$  y  $f_D$  en función de la temperatura, de acuerdo al modelo de Lumry-Eyring. Las fracciones fueron calculadas utilizando las ecuaciones 23 a 27 [sección 5.6].



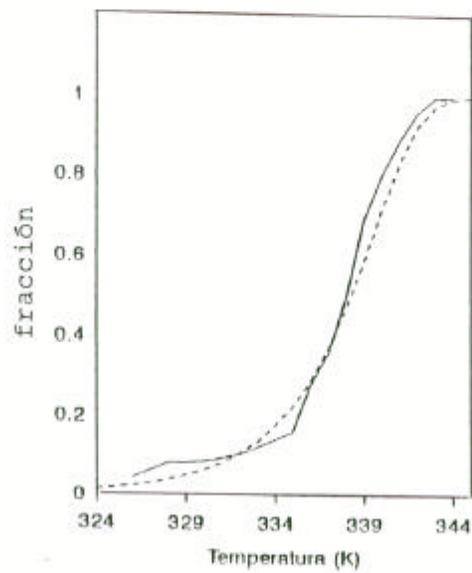
velocidad de calentamiento 0.086 K/min

Figura 18.

Fracciones para los estados  $f_N$ ,  $f_D$  y  $f_U$  en función de la temperatura, de acuerdo al modelo de Lumry-Eyring. Las fracciones fueron calculadas utilizando las ecuaciones 23 a 27 (sección 5.6).



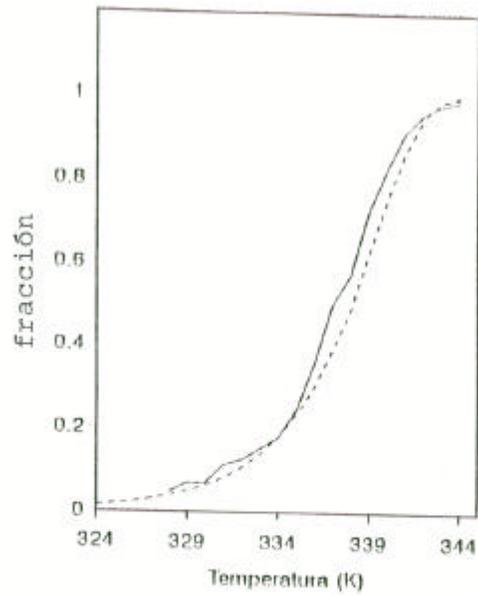
velocidad de calentamiento 1.5 K/min



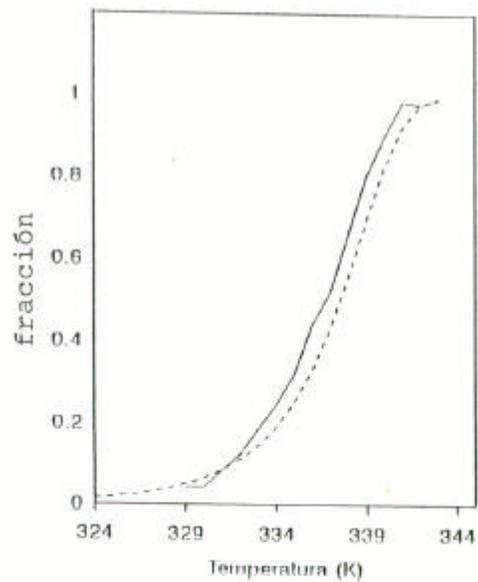
velocidad de calentamiento 1.2 K/min

Figura 19.

Curvas de transición en función de la temperatura, para la fracción desnaturalizada aparente: (—)  $f_{obs}$ , observada experimentalmente y (-----)  $f_{calc}$ , calculada según las ecuaciones 23 a 27 [sección 5.6].



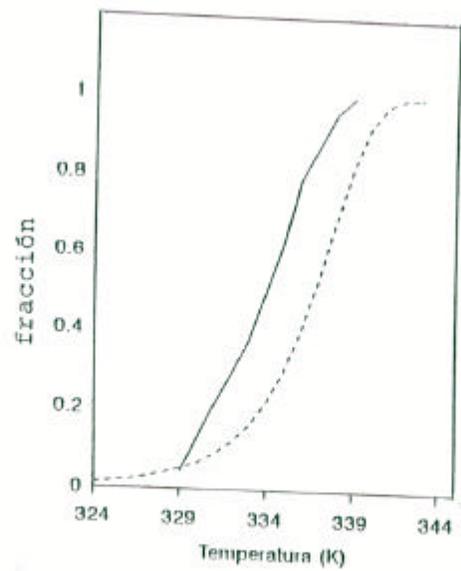
velocidad de calentamiento 1.0 K/min



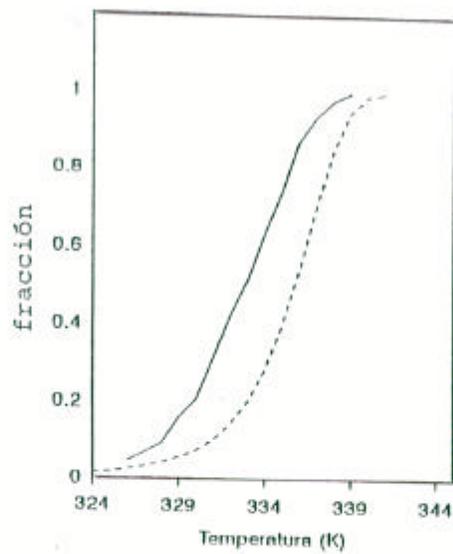
velocidad de calentamiento 0.7 K/min

Figura 19.

Curvas de transición en función de la temperatura, para la fracción desnaturalizada aparente: (—)  $f_{D_{app},ob}$ , observada experimentalmente y (- - - - -)  $f_{D_{app}}$ , calculada según las ecuaciones 23 a 27 (sección 5.6).



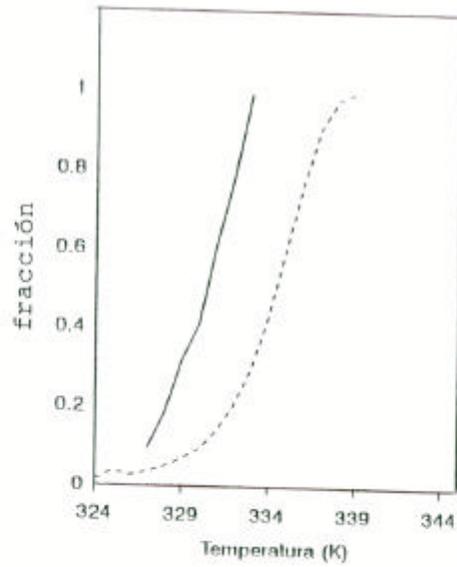
velocidad de calentamiento 0.4 K/min



velocidad de calentamiento 0.2 K/min

Figura 19.

Curvas de transición en función de la temperatura, para la fracción desnaturalizada aparente: (—)  $f_{D_{app}}$  observada experimentalmente y (-----)  $f_{D_{app}}$  calculada según las ecuaciones 23 a 27 (sección 5.6).



velocidad de calentamiento 0.086 K/min

Figura 19.

Curvas de transición en función de la temperatura, para la fracción desnaturalizada aparente: (—)  $f_{Denat.ob}$  observada experimentalmente y (- - - -)  $f_{Denat}$  calculada según las ecuaciones 23 a 27 (sección 5.6).

## 5.7 Calorimetría diferencial de barrido

Las endotermas (figura 20) de la proteinasa ácida de *Aspergillus saitoi* se obtuvieron a pH 5.0 empleando dos velocidades de barrido: 0.6 K/min y 1.25 K/min. Como se puede ver en la figura 20, las curvas de capacidad calorífica de exceso cubren un intervalo de temperaturas que coincide con el de las curvas de transición de la figura 10. Además, la temperatura del máximo de las curvas calorimétricas concuerda con los valores de  $T_m$  observados en los experimentos de dicroísmo circular llevados a cabo bajo condiciones semejantes (ver figura 10). Estos resultados indican que ambas técnicas (DC y DSC) siguen el mismo proceso, esto es, la pérdida de la conformación nativa de la enzima al mismo tiempo que la ruptura de interacciones que la estabilizan.

De cuatro experimentos independientes de DSC se obtuvo un valor promedio de la entalpía calorimétrica,  $\Delta H_{\text{cal}} = 770 \pm 60$  kJ/mol. Para la pepsina, una proteinasa ácida de tamaño muy cercano al de la enzima de *Aspergillus saitoi*, un valor de  $\Delta H_{\text{cal}}$  muy cercano ha sido reportado (899 kJ/mol) (59). Las entalpías aparentes de van't Hoff fueron determinadas de la ecuación (9, 16):

$$DH_{vH,app} = \frac{4RT_m^2 C_{p,T_m}^{ex}}{DH_{cal}} \quad (28)$$

donde  $C_{p,T_m}^{ex}$  es el valor del  $C_p^{ex}$  evaluado a  $T_m$ .  $\Delta H_{vH, app}$  fue de 539, 520 y 460 kJ/mol para velocidades de barrido de 0.6, 0.9 y 1.25 K/min respectivamente. Como se muestra en la figura 14 las entalpías aparentes de van't Hoff calculadas a partir de las mediciones calorimétricas tienen la misma tendencia que los valores obtenidos a partir de los experimentos de dicroísmo circular. Esta observación sugiere que ambos conjuntos de datos darán un valor común de  $DH_{vH}$ , cuando se extrapolen a velocidad de calentamiento infinita.

Un análisis directo de los datos calorimétricos dió un valor de 1.4 a 1.7, para el cociente  $DH_{cal} / DH_{vH}$ , resultado que sugiere que la molécula de la proteinasa ácida está formada por dos unidades cooperativas termodinámicamente. Sin embargo, debe recalarse que debido al carácter irreversible de la transición de la desnaturalización, las entalpías de van't Hoff derivadas de las curvas calorimétricas son solamente valores aparentes. Por lo tanto, un cálculo más real del cociente  $DH_{cal} / DH_{vH}$  se obtuvo utilizando el valor “verdadero” de la entalpía de van't Hoff, esto es 205 kJ/mol ( que es un valor promedio calculado a partir del  $DH_{vH,app}$  extrapolado a velocidad de

calentamiento infinita y el valor determinado directamente de los experimentos de reversibilidad). De esta forma,  $DH_{cal} / DH_{vH}$  es igual a 3.8, indicando que hay cuatro regiones cooperativas en la enzima. Este número de regiones cooperativas es el mismo que se encontró para la pepsina a pH 6.5 (16, 59). Para la pepsina se ha observado además que el cociente  $DH_{cal} / DH_{vH}$  (calculado a partir de experimentos calorimétricos a una sola velocidad de barrido) disminuye de 3.7 a 2.5 cuando el valor del pH es disminuído de 6.5 a 5.0, eventualmente alcanzando un valor de 1.7 a pH 2.0 (59). Por consiguiente Makarov et al (59) propusieron que el número de dominios termodinámicos en la molécula de la pepsina cambia con el pH. Sin embargo, dado el comportamiento totalmente irreversible de la desnaturalización térmica de la pepsina en medio ácido, y debido a los resultados encontrados en este trabajo, es evidente que los estudios de Makarov et al (59) deberán ser cuidadosamente reexaminados.

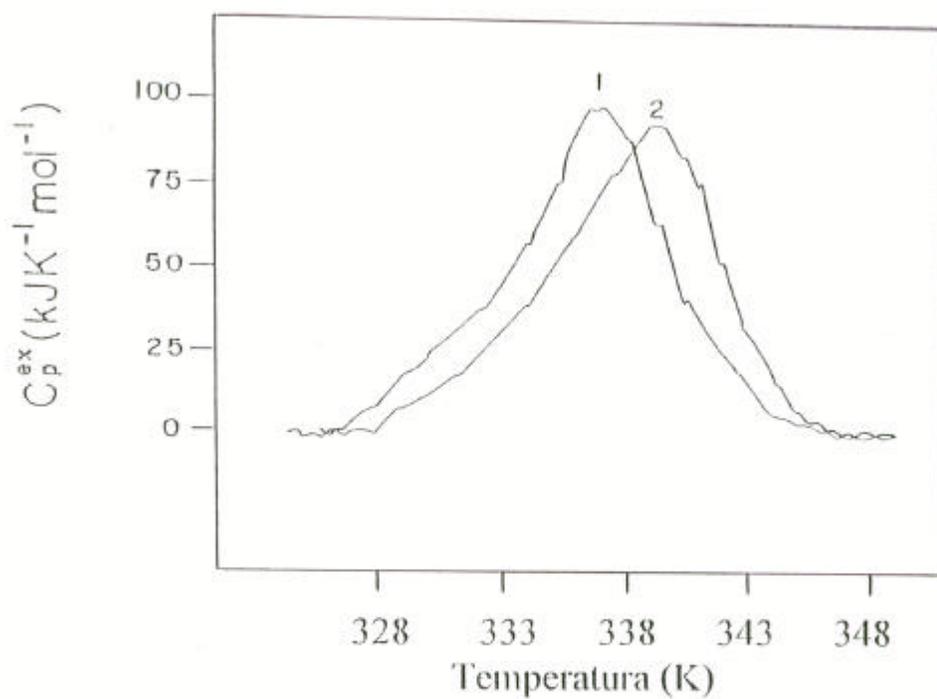


Figura 20.

Curvas de la capacidad calorífica de exceso, para la proteinasa ácida de *Aspergillus saitoi* a pH 5.0. Velocidades de barrido: (1) 0.6 K/min y (2) 1.25 K/min. Concentración de proteína 1.3 y 1.2 mg/ml.

# **CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

1.- Los resultados de los estudios conformacionales de las proteinasas de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus saitoi*, indican que las tres enzimas tienen un patrón similar de plegamiento. Además, sugieren que estas enzimas presentan el comportamiento estructural típico de las proteinasas ácidas.

2.- En este trabajo se demostró que la desnaturalización térmica de la proteínasa ácida de *Aspergillus saitoi* sigue un modelo del tipo Lumry-Eyring. Esta conclusión está sustentada por la detección de la especie desdoblada (reversible)  $U$ . Así mismo, a pesar de la irreversibilidad global del proceso, se pudo determinar la entalpía de van't Hoff para el equilibrio entre el estado nativo  $N$  y el estado desdoblado  $U$ . La comparación de esta entalpía de van't Hoff con la entalpía calorimétrica indica que la molécula de la proteínasa ácida de *Aspergillus saitoi* está formada por cuatro regiones cooperativas, como en el caso de la pepsina. Esta conclusión sería completamente diferente si se comparara  $DH_{cal}$  con la entalpía de van't Hoff obtenida directamente a partir de las curvas calorimétricas.

3.- Debido a la complejidad de las ecuaciones propuestas en este trabajo, para explicar que el proceso de desnaturalización térmica de la proteinasa ácida de *Aspergillus saitoi* sigue el modelo de Lumry-Eyring, hay diferentes juegos de parámetros de entalpía de van't Hoff y de energía de activación por los cuales se puede obtener una correlación aproximada entre las curvas de transición experimentales y las calculadas. Por lo que, un ajuste de las curvas experimentales de fracción desnaturalizada,  $f_{app,ob}$ , mediante una regresión no lineal, permitirá calcular el cambio en la entalpía de van't Hoff,  $DH_{vH}$ , y la energía de activación,  $E$  para poder así, obtener una mejor correlación entre las curvas experimentales y las calculadas.

4.- En investigaciones futuras sería conveniente e interesante realizar estudios cinéticos con proteínas que sigan el modelo de Lumry-Eyring, para determinar que tan rápido se establece la reacción de equilibrio con respecto a la reacción irreversible. Es decir, emplear un modelo cinético para calcular las constantes de velocidad de cada una de las reacciones involucradas.

5.- La metodología desarrollada en esta tesis podrá ser empleada en el estudio de otras proteinasas ácidas, enzimas aspárticas; por ejemplo, en la desnaturalización térmica de la pepsina, para la que se ha reportado un

comportamiento totalmente irreversible (a diferentes valores de pH). Los estudios realizados para esta enzima, podrían ser examinados una vez más, tratando de establecer la presencia de algún intermediario estable durante el proceso de desnaturalización térmica, y rehaciendo una comparación de la entalpía calorimétrica con la entalpía de van't Hoff.

*#s.t.s.*

# Apéndice A

Para el modelo de Lumry-Eyring descrito en la ecuación (14), Sánchez-Ruiz (57) demostró, bajo la suposición de que el equilibrio es siempre establecido, que las fracciones para los tres estados considerados en el modelo están dadas por:

$$f_N = \frac{1}{K+1} \exp\left[-\frac{1}{v} F(T)\right] \quad (\text{A } 1)$$

$$f_U = \frac{K}{K+1} \exp\left[-\frac{1}{v} F(T)\right] \quad (\text{A } 2)$$

$$f_D = 1 - \exp\left[-\frac{1}{v} F(T)\right] \quad (\text{A } 3)$$

donde

$$F(T) = \int_{t_0}^T \frac{kK}{K+1} dT \quad (\text{A } 4)$$

En estas ecuaciones  $K = f_U/f_N$ ,  $v$  es la velocidad de barrido y  $k$  es la constante de velocidad de primer orden para el proceso  $U \rightarrow D$ . Si se asume

que los estados  $U$  y  $D$  tienen el mismo valor para la observable usada para monitorear la transición, entonces tendremos que  $f_{D, app} = f_U + f_D$ . Y ya que  $f_N + f_U + f_D = 1$ , la constante aparente de equilibrio será:

$$K_{app} = f_{D, app} / (1 - f_{D, app}) = (1 - f_N) / f_N \quad (\text{A } 5)$$

Sustituyendo la ecuación A 1, se tendrá:

$$K_{app} = (K + 1) \exp\left[\frac{1}{v} F(T)\right] - 1 \quad (\text{A } 6)$$

o

$$\ln K_{app} = \ln \left\{ (K + 1) \exp\left[\frac{1}{v} F(T)\right] - 1 \right\} \quad (\text{A } 7)$$

7)

Diferenciando la ecuación A 7, y reordenando se obtiene:

$$\frac{d \ln K_{app}}{dT} = \frac{\exp\left[\frac{1}{v} F(T)\right]}{(K + 1) \exp\left[\frac{1}{v} F(T)\right] - 1} \left(\frac{kK}{v} + \frac{dK}{dT}\right) \quad (\text{A } 8)$$

donde se utiliza la ecuación A 4 en la forma  $dF(T)/dT = kK/(K+1)$ . De la ecuación A 8 y de la relación general  $d(\ln K)/dT = DH/RT^2$ , se obtiene que la expresión para la entalpía de van't Hoff es:

$$DH_{vH, app} = \frac{\exp[\frac{1}{v} F(T)]}{\frac{(K+1)}{K} \exp[\frac{1}{v} F(T)] - \frac{1}{K}} \left( \frac{RT^2 k}{v} + DH_{vH} \right) \quad (A 9)$$

esta ecuación puede ser simplificada, si: (i) la entalpía aparente de van't Hoff sigue una dependencia aproximadamente lineal de  $1/v$ , cuando  $1/v$  tiende a cero, o bien (ii) cuando  $K \gg 1$

$$DH_{vH, app} \gg RT^2 k(1/v) + DH_{vH} \quad (A 10)$$

que es la ecuación 19.

# Apéndice B

Para la reacción en el equilibrio del modelo de Lumry-Eyring (ecuación 14), se tiene que:

$$K = f_U/f_N \quad (\text{B1})$$

$$f_N + f_U + f_D = 1 \quad (\text{B2})$$

por lo que:

$$f_N (1 + K) = 1 - f_D \quad (\text{B3})$$

Si se sigue la desaparición del estado nativo con respecto al tiempo y considerando que la temperatura también varía con el tiempo, tendremos que:

$$(1+K) \frac{d f_N}{d t} + f_N \frac{d K}{d t} = - \frac{d f_D}{d t} \quad (\text{B4})$$

y como

$$\frac{d T}{d t} = v \quad (\text{B5})$$

por lo que la ecuación B4 se puede escribir como:

$$(1+K) \frac{d f_N}{d T} + f_N \frac{d K}{d T} = - \frac{d f_D}{d T} \quad (\text{B6})$$

Sánchez-Ruiz (22) demostró:

$$\frac{df_D}{dT} = \frac{1}{v} \left( \frac{kK}{K+1} \right) (1-f_D)$$

(B7)

por lo tanto

$$(1+K) \frac{df_N}{dT} + f_N \frac{dK}{dT} = - \frac{1}{v} \left( \frac{kK}{K+1} \right) (1-f_D)$$

(B8)

de donde

$$\frac{df_N}{dT} = f_N \left\{ - \frac{1}{v} \left( \frac{kK}{K+1} \right) - \frac{1}{(K+1)} \frac{dK}{dT} \right\}$$

(B9)

considerando la forma general de la ecuación de van't Hoff:

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{DH}{RT^2}$$

o bien

$$\frac{dK}{dT} = \frac{K \Delta H}{RT^2}$$

(B10)

Sustituyendo la ecuación B10 en la ecuación B9 y reordenando:

$$\frac{1}{f_N} \frac{df_N}{dT} = - \frac{1}{v} \left( \frac{K}{K+1} \right) \left( k + \frac{DH \cdot v}{RT^2} \right)$$

(B11)

o bien

$$\frac{d \ln f_N}{dT} = -\frac{1}{v} \left( \frac{K}{K+1} \right) \left( k + \frac{DH \cdot v}{RT^2} \right) \quad (\text{B12})$$

de donde la constante de velocidad para la reacción irreversible del modelo de

Lumry-Eyring es:

$$k = -v \left( \frac{K+1}{K} \right) \frac{d \ln f_N}{dT} - \frac{v DH_{vH}}{RT^2}$$

que es la ecuación 26 (sección 5.3)

# Referencias

- 1 Goldberg, M. E. Trends in Biochem. Sci. (1985) **10**, 338-391
- 2 Ghéllis, C. y Yon, J., (1982) Protein Folding. Academic Press pag 298- 366
- 3 Kim, P.S. y Baldwin, R.L., (1982) Ann. Rev. Biochem.**51**, 459-489
- 4 Pace, C.N., Trends in Biochem. Sci. (1990) **15**, 14-17
- 5 Creighton, T. E., Proteins Structures and molecular properties (1984) edit. Freeman and Company, New York pag 199
- 6 Shirley, B.A., Stability of protein pharmaceuticals (1992) Part A. Tim J. Ahern and Mark C. Manning editores. pag 167-194
- 7 Privalov, P.L. (1979) Adv. Protein Chem. **33**, 167-241
- 8 Labhardt, A. M. (1982) J. Mol. Biol. **157**, 331-335

9 Sturtevant, J.M., (1987) *Ann. Rev. Phys. Chem.* **38**, 463-488

- 10 Tanford, C., (1968) *Adv. Protein Chem.* **23**, 121-282
- 11 Vita, C. y Fontana, A., (1982) *Biochemistry* **21**,5196-5202
- 12 Hernández-Arana, A y Soriano-García, M., (1988) *Biochim, Biophys. Acta* **954**, 170-175
- 13 Edge, V., Allewel, N.M. y Sturtevant, J.M. (1985) *Biochemistry* **24**, 5899-5906
- 14 Privalov, P.L. (1989) *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **18**, 47-69
- 15 Privalov, P.L. (1982) *Adv. Protein Chem* **35**, 1-104
- 16 Privalov, P.L., Mateo, P.L. Khenchinasvili, N.N., Stepanov, V.M.,y Revina, L.P. (1981) *J. Mol. Biol.* **152**, 445-464
- 17 Hagihara, B. *The Enzymes*, 2nd ed (1960) **4**, pag 193
- 18 Bovey F. A. y Yanari, S.S., (1960) *The enzymes*, 2nd de. **4** p 63
- 19 Jolles, P., Alains, C., y Jolles, J., (1962) *Biochim. Biophys. Acta* **98**, 56

- 20 Jolles, P., Alains, C., y Jolles, J., (1968) *Biochim. Biophys. Acta* **168**, 591
- 21 Foltmann, B.,(1966) *Compt. Redn. Trav. Lab. Carlsberg* **35**, 143
- 22 Ichishima, E. y Yoshida, F., (1965) *Biochim. Biophys. Acta* **99**, 360
- 23 Hofman, T y Shaw R. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* **92**, p 543
- 24 Ichishima, E. y Yoshida, F., (1965) *Nature* **207**, 525
- 25 Hartsuk, J.A. y Tang, J., (1972) *J. Biol. Mol.* **247**, 2575-2580
- 26 Rajagopalan, T. G., Stein, W.H. y Moore, S. J. (1966) *J. Biol. Chem.***241**, 4295-4297
- 27 James, M.N.G y Sielecki, A. R. (1983) *J. Mol. Biol.* **163**, 299-361
- 28 Suguna, K., Bott, R. R., Padlan, E.A., Subramanian, E., Sheriff, S., Cohen, G.H. y Davies, D.R. (1987) *J. Mol. Biol.* **196**, 877-900

- 29 Andreeva, N.S., Zdanov, A., Gustchina, A. y Federov, A. (1985). In Aspartic proteinases and their inhibitors (Kostka, V., de) pag 137-150 Walter de Gruyter, Berlin and New York
- 30 Subramanian, E. (1978) Trends Biochem. Sc. **1**, 1
- 31 Koaze, Y., Goi, H., Ezawa, K., Yamada, U. y Hara, T., (1964) Agr. Biol. Chem. (Tokio) **28**, 216
- 32 Stepanov, M. V., Lobereva, L.S., Frolova, N.F., y Oreshchenko, L.V. (1968) Izv. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Khim **12**, 2840
- 33 Nakanishi, K., (1960) J. Biochem. (Tokio) **47**, 16
- 34 Ichisima, E. y Yoshida, F (1965) Biochim. Biophys. Acta **110** 155-161
- 35 Ichishima, E. Methods in enzymology, vol XIX p 345, 1970
- 36 Anson, M.L., (1938) J. Gen. Physiol. **22**, 79
- 37 Lange's Handbook of Chemistry (1979) Twelf Edition, (J.A. Dean, ed), pp 5-79. McGraw-Hill, New York

- 38 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265
- 39 Robinson, G.W. (1975) *Biochemistry* **14**, 3695-3700
- 40 Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F., (1965) *Anal. Chem.* **28** 350-356
- 41 Hennessey, J.P., y Johnson W.C. (1982) *Anal. Biochem.* **125**, 177-188
- 42 Perczel, A., Hollosi, M., Tusnady, G. y Fasman, G.D. (1991) *Protein Eng.* **4**, 699-679
- 43 Sánchez-Ruiz, J.M., López-Lacomba, J.L., Cortijo, M. y Mateo, L.P. (1988) *Biochemistry* **27**, 1648-1652
- 44 Lumry, R. y Eyring, H., (1954) *J. Phys. Chem.* **58**, 110-120
- 45 Rajagopalan, T. G., Moore, S., y Stein, H.W. (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 4940
- 46 Belyauskaite, I.P., Palubinskas, V J., Anchenko, E., Vesa, V. S., y Glemzha, A. A. (1980) *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 37-45

- 47 Tsujita, Y., y Endo, A. (1977) *J. Bacteriol.* **130**, 48-56
- 48 Hennessey, J.P., y Johnson, W.C. (1981) *Biochemistry* **20**, 1085-1094
- 49 Manavalan, P., y Johnson, W.C. (1983) *Nature* **305**, 831-832
- 50 Allen, B., Blum, M., Cunningham, A., Guang-Chou, T., y Hofmann, T. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 5060-5065
- 51 Tsujita, Y., y Endo, A. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **455**, 194-204
- 52 Oka, T., y Morihara, K., (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* **156**, 543-551
- 53 Hernández-Arana, A. y Soriano-García, M., (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **954**, 170-175
- 54 Guzmán-Casado, M., Parody-Morreale, A., Mateo, L.P. y Sánchez-Ruiz, J.M. *Eur. J. Biochem.* **188**, 181-185
- 55 Lepock, J.R. Ritchie, K.P., Kolois, M.C., Rodhal, A.M., Heinz, K.A. y Kruuv, J. (1992) *Biochemistry* **31**, 12760-12712

- 56 Freire, E., van Osdol, W.W., Mayorga, O.L. y Sánchez-Ruiz, J.M. (1990) *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **19**, 159-188
- 57 Sánchez-Ruiz, J.M. (1992) *Biophys. J.* **61**, 921-935
- 58 Hernández-Arana, A, Rojo-Domínguez, A., Altamirano, M.M y Calcagno, M.L. (1993) *Biochemistry* **32**, 3644-3648
- 59 Makarov, A.A., Protasevich, I.I., Frank, E. G., Grishina, I.B., Bolotina, I.A. y Espova, N. G. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1078**, 283-288
- 60 Fruto, J.S. *The Enzymes* (1971) Edited by Paul D. Boyer volume II Academic Press, New York pag 119-165