



# HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS DE LOMBRIZ ROJA CALIFORNIANA (*EISENIA FETIDA*) CON DIFERENTES PROTEASAS

## ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CALIFORNIAN RED WORM (*EISENIA FETIDA*) PROTEINS WITH DIFFERENT PROTEASES

<sup>1</sup>Angela Noreña, <sup>2</sup>Leidy Gómez-Sampedro,  
<sup>3</sup>Yhoan Gaviria, <sup>4</sup>José E. Zapata

<sup>1</sup>Universidad Nacional Abierta y a Distancia / Universidad de Antioquia, Colombia

Recibido: 30/09/2022 Aprobado 20/10/2022

### RESUMEN

La hidrólisis enzimática de proteínas es una técnica biotecnológica que ha cobrado gran importancia, dado que constituye una estrategia efectiva para la obtención de hidrolizados y péptidos con propiedades tecnofuncionales y biológicas. Dichas propiedades dependen de muchos factores, siendo uno de los más importantes el tipo de enzima utilizada para la catálisis de la reacción. El presente trabajo tuvo como propósito evaluar la efectividad de diferentes proteasas comerciales, en el proceso de hidrólisis de proteínas de lombriz roja californiana (LRC). Para esto, se evaluó la actividad catalítica de tres proteasas de diferentes características: Alcalasa 2.4L, Flavourzyme y Neutrase, y se realizó el proceso de hidrólisis de LRC con cada enzima, bajo la misma relación enzima/sustrato y las condiciones de reacción óptimas para cada enzima. Cada reacción se realizó durante 60 minutos después de lo cual se evaluó el grado de hidrólisis (GH) para identificar la eficiencia catalítica de las enzimas sobre este sustrato. Los resultados mostraron que la enzima con mayor eficiencia en el proceso de hidrólisis de LRC fue la Alcalasa 2.4L, con la cual se alcanzó un GH de 13,02 %, más de dos veces mayor que el alcanzado con las otras dos enzimas. En conclusión, las proteínas de LRC pueden ser hidrolizadas eficientemente con una endoproteasa como la Alcalasa 2.4L, lográndose obtener hidrolizados que podrían ser utilizados en la industria alimentaria.

**Palabras clave:** Alcalasa 2.4L, actividad catalítica, proteólisis.

Citación: Gómez Sampedro, L. J., Noreña Mora, A. M., Gaviria Gaviria, Y. S., & Zapata Montoya, J. E. (2022). Hidrólisis enzimática de proteínas de lombriz roja californiana (*Eisenia fetida*) con diferentes proteasas. *Publicaciones E Investigación*, 16(4).  
<https://doi.org/10.22490/25394088.6502>

<sup>1</sup>Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería –UNAD–.ANGELMORA0804@hotmail.com  
<https://orcid.org/0000-0001-7009-3896>

<sup>2</sup>Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería –UNAD– / leidyj.gomez@unad.edu.co  
<https://orcid.org/0000-0001-9078-7051>

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias –U de A–.yhoan.gaviria@udea.edu.co  
<https://orcid.org/0000-0002-6946-3893>

<sup>4</sup>Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias –U de A–.edgar.zapata@udea.edu.co  
<https://orcid.org/0000-0003-2733-1515>

<https://doi.org/10.22490/25394088.6502>

## ABSTRACT

The enzymatic hydrolysis of proteins is a biotechnological technique that has gained great importance, since it constitutes an effective strategy for obtaining hydrolysates and peptides with techno-functional and biological properties. These properties depend on many factors, one of the most important it is enzyme type used to the reaction. The purpose of this work was to evaluate the effectiveness of different proteases in the hydrolysis process of Californian red worm (LRC) proteins. For this, the catalytic activity of three proteases with different characteristics was evaluated: Alcalase 2.4L, Flovourzyme and Neutrase, and the LRC hydrolysis process was carried out with each enzyme, under the same enzyme/substrate ratio and the optimal reaction conditions for each enzyme. Each reaction was carried out for 60 minutes after which the degree of hydrolysis (DH) was evaluated to identify the catalytic efficiency of the enzymes on this substrate. The results showed that the enzyme with the highest efficiency in the LRC hydrolysis process was Alcalase 2.4L with which a DH of 13.02% was achieved, twice higher than DH achieved with the other two enzymes. In conclusion, LRC proteins can be efficiently hydrolyzed with an endoprotease such as Alcalase 2.4L, obtaining hydrolysates that could be used in the food industry.

**Keywords:** Alcalase 2.4L, catalytic activity, proteolysis.



## 1. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.1 Manejo del sustrato

Inicialmente se realizó la separación y lavado de las lombrices. Posteriormente se realizó el purgado con una solución de bicarbonato al 1 %. Para el beneficio de las lombrices se utilizó solución salina de cloruro de sodio al 7 % durante 30 min a 25°C. Finalmente las lombrices fueron homogenizadas en un molino de cuchillas y conservadas hasta el proceso de hidrólisis.

### 1.2 Análisis de proteína:

proteína bruta (N x 6,25) se midió siguiendo el método oficial de la AOAC Kjeldahl (AOAC 992.15) (AOAC, 2006).

### 1.3 Actividad catalítica de las proteasas:

Se determinó mediante un análisis estándar usando caseína como sustrato, según la metodología descrita por Cheung *et al.* (2012). Para esto, una alícuota de 100 µL de las enzimas (1:20) se incubó con 500 µL de solución de caseína 0,65 %, durante 10 minutos a 37°C. La reacción se detuvo adicionando 500 µL de solución de ácido tricloro acético (110 mM) y la mezcla se centrifugó 7.500 rpm por 10 minutos, para tomar

200 µL del sobrenadante y mezclarlos con 500 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M y 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Esta última solución se incubó a 37°C por 30 minutos, y la absorbancia se leyó en un espectrofotómetro a 660 nm. Como patrón se emplea una curva estándar de solución de Tirosina entre 0-200 mg/L.

### 1.4 Proceso de hidrólisis enzimática

La pasta de lombriz fue hidrolizada en un reactor de vidrio de 0.5 L, con tres proteasas diferentes (Alcalasa 2.4L, Flovourzyme y Neutrasa), bajo la misma relación enzima/sustrato, una concentración de sustrato de 15 g proteína/L y las condiciones de pH y temperatura recomendadas para cada enzima, según se muestra en la Tabla 1.

TABLA 1.

Condiciones de pH y T para cada proteasa

Enzima	pH	Temperatura
Neutrasa	7,5	47
Flovourzyme	6	48
Alcalasa 2.4L	8,5	45

El control de pH y temperatura se realizó con un electrodo combinado de vidrio, conectado a un titulador automático (Titrand 842) marca (Metrohm, Suiza), operado por computador (software tiamo 1.2.1). El sistema de reacción se realizó durante 60 min para cada enzima y se mantuvo en agitación constante de 240 rpm usando un agitador magnético 801 (Metrohm, Suiza).

### 1.5 Grado de hidrólisis (GH)

La reacción se controló a través del GH, expresada como la relación entre el número de enlaces peptídicos hidrolizados (h) y el número de enlaces peptídicos totales en la proteína nativa, por unidad de peso (ht). El grado de hidrólisis se calculó con la ecuación (1), utilizando el método pH-stat [3].

$$DH(\%) = \frac{B \cdot NB \cdot Mp}{a \cdot ht} * 100 \quad (1)$$

Donde B es el volumen consumido de la base en L, Mp es la masa de la proteína en kg, NB es la concentración de la base y a es el grado de disociación de los grupos amino liberados durante la reacción. Se empleó una ht de 8,1 Eq / Kg que fue calculado previamente por el método OPA, mientras que  $\alpha$  y pK se calcularon con las ecuaciones. (2) y (3), respectivamente (Forghani *et al.*, 2012).

$$\alpha = \frac{10^{PH} - pK}{1 + 10^{PH} - pK} \quad (2)$$

$$pK = 7,8 + \frac{(298 - T) \cdot 298}{T \cdot 2400} \quad (3)$$

### 1.6 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente empleando el software Stagraphics® Centurion XV (Virginia, EE. UU.). Los valores se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar de al menos dos réplicas. Las diferencias entre las medias se identificaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido un test HSD (Honestly-significant-difference) de Tukey con un nivel de significación de 0,05 (95 % de confianza).

## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1 Evaluación de las enzimas proteolíticas comerciales

En este trabajo se buscó evaluar la eficiencia catalítica de diferentes proteasas comerciales: a) Alcalasa 2.4L, endoproteasa producida por fermentación sumergida de *Bacillus licheniformis*, con temperaturas de trabajo entre 45°-65°C y pH entre 7,5-9,5, dependiendo del tipo de sustrato; b) Neutrasa 1,5MG, endoproteasa producida por fermentación sumergida de *Bacillus subtilis*, con temperaturas de trabajo entre 45°-65°C y pH 7,5-9,5; y c) Flavourzyme 500MG, complejo de proteasa fúngica producida por fermentación sumergida de *Aspergillus oryzae*, contiene tanto actividades de endoproteasa como de exopeptidasa, pH de trabajo entre 5,0-8,0 y temperatura entre 45-60°C (Zapata, Moya & Figueroa, 2019).

En la Tabla 2 se muestran los valores de la actividad catalítica de cada enzima expresados como UA/mL de enzima. Se puede notar que según los resultados la Neutrasa es la enzima con mayor actividad catalítica, seguida por Alcalasa, siendo la enzima de menor actividad la Flavourzyme. Es importante resaltar, que, para realizar el proceso de hidrólisis bajo las mismas condiciones, se adicionó un volumen de enzima según su actividad catalítica a fin de efectuar todos los procesos con una relación enzima/sustrato de 0,018 UA/g proteína.

TABLA 2.

Actividad catalítica de las proteasas evaluadas

Enzima	Actividad catalítica (UA/mL)
Alcalasa 2.4L	1,83 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>
Neutrasa 1,5MG	3,26 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>
Flavourzyme 500MG	1,38 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup> Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas (p < 0.05).

## 2.2 Proceso de hidrólisis de LRC

Tras la medición de la concentración de proteína en la pasta de LRC, se logró identificar que se trata de un sustrato apropiado para el proceso de hidrólisis, dado que cuenta con una alta cantidad de proteína con una concentración de 12,2 % (p/p) en base húmeda, analizada mediante el método Kjeldahl.

El proceso de hidrólisis está constituido por tres reacciones consecutivas. Primero, la formación de un complejo enzima-sustrato (proteína), después la rotura del enlace amídico dando como resultado la liberación de un péptido. Finalmente, el péptido

restante se separa de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua. El proceso puede reiniciarse sobre los dos nuevos péptidos o sobre uno solo de ellos (Benítez, Ibarz & Pagan, 2008). En la Figura 1 se presentan las curvas de hidrólisis obtenidas para cada una de las enzimas evaluadas. Se puede notar que la Alcalasa es la enzima que presenta la mayor eficiencia para la hidrólisis de las proteínas de LRC, alcanzándose un GH de 13,02 % en 60 min. Las enzimas Neutrassa y Flavourzyme presentan una actividad catalítica mucho menor, presentando solo un GH de 3,31 y 6,40 %, respectivamente.

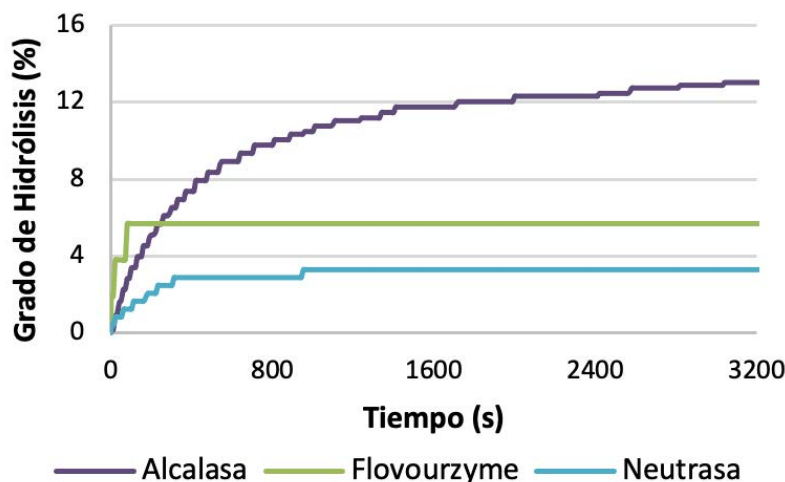


Figura 1. Curva del GH en función del tiempo para la hidrólisis de LRC con las diferentes proteasas.

Estos resultados pueden atribuirse a que la Alcalasa 2.4L es una endopeptidasa poco específica, lo que permite el rompimiento de un mayor número de enlaces peptídicos (Glomm *et al.*, 2021). Por otro lado, se ha documentado que proteasas alcalinas como la Alcalasa 2.4L, muestran actividades mayores que proteasas neutras, como Flavourzyme y Neutrassa (Kechaou, *et al.*, 2009). Resultados similares han sido reportados por otros autores, quienes han definido la Alcalasa 2.4L como la enzima de mayor eficiencia para procesos de hidrólisis enzimática de proteínas de diferentes fuentes (Glomm *et al.*, 2021; Gómez *et al.*, 2020).

En este sentido, los resultados sugieren que la mejor enzima para procesos de hidrólisis de LRC es la Alcalasa 2.4L, considerando que se ha reportado ampliamente la relación existente entre hidrolizados con alto GH y una mayor actividad biológica (Li, Clark & Tan, 2018). Este mayor GH puede verse relacionado también con un incremento de los niveles de aminoácidos esenciales y una mejora en las propiedades tecnofuncionales de los hidrolizados (Roldán Acero, Omote Sibina & Molleda, 2021 [10]).

### 3. CONCLUSIONES

Bajos las condiciones del presente trabajo se logró identificar que la Alcalasa 2.4L es la enzima con mayor eficiencia catalítica para la hidrólisis de proteínas de LRC, alcanzado un GH 13,02 %, dos y cuatro veces mayor que el alcanzado con las Flavourzyme y Neutrasa, respectivamente. Estos resultados sugieren además que las proteínas de LRC son una fuente potencial de compuestos bioactivos dado que se alcanzó un GH alto en un corto tiempo de hidrólisis.

### AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al grupo de Nutrición y tecnología de alimentos de la Universidad de Antioquia por la disposición de infraestructura y equipos para el desarrollo de los ensayos.

### REFERENCIAS

- AOAC. (2006). *Official Methods of Analysis* (17th ed.). Association of Official Analytical Chemists. <https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis-21st-edition-2019/>
- Benítez, R., Ibarz, A. & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones Resumen. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42, 227–237.
- Cheung, I.W.Y., Cheung, L.K.Y., Tan, N.Y. & Li-Chan, E.C.Y. (2012). The role of molecular size in antioxidant activity of peptide fractions from Pacific hake (*Merluccius productus*) hydrolysates. *Food Chemistry*, 134(3), 1297–1306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.215>
- da Cruz, C.Z.P., de Mendonça, R.J., Guimaraes, L.H.S., dos Santos Ramos, M.A., Garrido, S.S., de Paula, A.V., Monti, R. & Massolini, G. (2020). Assessment of the Bioactive Potential of Cheese Whey Protein Hydrolysates Using Immobilized Alcalase. *Food and Bioprocess Technology*, 13, 2120–2130. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02552-4>
- Forghani, B., Ebrahimpour, A., Bakar, J., Hamid, A.A., Hassan, Z. & Saari, N. (2012). Enzyme hydrolysates from *Stichopus horrens* as a new source for angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012, 236384. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2012/236384>
- Glomm, W.R., Wubshet, S.G., Lindberg, D., Dankel, K.R., Afseth, N.K., Stenstad, P.M. & Johnsen, H. (2021). Immobilized protease on magnetic particles for enzymatic protein hydrolysis of poultry by-products. *LWT*, 152, 112327. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112327>
- Gómez, L.J., Gómez, N.A., Zapata, J.E., López-García, G., Cilla, A. & Alegría, A. (2020). Optimization of the Red Tilapia (*Oreochromis spp.*) Viscera Hydrolysis for Obtaining Iron-Binding Peptides and Evaluation of In Vitro Iron Bioavailability. *Foods*, 9(7), 883. <https://doi.org/10.3390/foods9070883>
- Li, Y., Clark, K.A. & Tan, Z. (2018). Methods for engineering therapeutic peptides. *Chinese Chemical Letters*, 29(7), 1074–1078. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2018.05.027>
- Roldán Acero, D., Omote Sibina, J. R. & Molleda, A. (2021). Elaboración de un hidrolizado de proteína de anchoqueta (*Engraulis ringens*) en polvo. *Anales Científicos*, 82(2), 251-261.
- Zapata, J. E., Moya, M. & Figueroa, O. A. (2019). Hidrólisis enzimática de la proteína de vísceras de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*): Efecto del tipo de enzima, temperatura, pH y velocidad de agitación. *Información Tecnológica*, 30(6), 63-72.