

Estandarización del método cuantitativo de azocaseína para determinar la actividad proteolítica en sobrenadantes fúngicos de *Escovopsis* y *Trichoderma*

✉Marcela Paola Barengo, Natalia Soledad Amerio, Gustavo A Bich, María L Castrillo, Pedro D Zapata

Laboratorio de Biotecnología Molecular, Instituto de Biotecnología Misiones "Dra María Ebe Reca" (InBioMis), Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Ruta Nacional 12 km 7,5. CP3300, Posadas, Misiones, Argentina
✉barengomarcela@gmail.com

INVESTIGACIÓN

RESUMEN

Los hongos micoparásitos son capaces de hidrolizar las paredes celulares de su hospedador mediante la secreción de enzimas hidrolíticas, como las proteasas. La metodología basada en el uso del sustrato azocaseína para cuantificar la actividad proteolítica es una de las más robustas y reproducibles. Sin embargo en la literatura se presentan múltiples modificaciones de acuerdo a su aplicabilidad y el tipo de microorganismo. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue establecer las condiciones de reacción óptimas, al emplear la enzima pura papaína para cuantificar la actividad proteolítica de sobrenadantes enzimáticos fúngicos de *Trichoderma* y *Escovopsis*. Se ensayó el efecto del tiempo, el pH y la temperatura de reacción sobre la actividad enzimática a distintas concentraciones de papaína. Para medir la actividad se utilizó el sustrato cromogénico azocaseína. Los sobrenadantes enzimáticos se obtuvieron mediante fermentación líquida de dos micoparásitos fúngicos: *Escovopsis* HEP25 y *Trichoderma* POS7. De acuerdo a los parámetros evaluados, se observaron actividades proteolíticas significativas a 50 min de reacción, 37 °C y pH 7,4. La actividad se expresó en términos de unidades equivalentes a la actividad de una masa determinada de papaína (1 unidad = 1 mg de papaína). Para la cepa *Trichoderma* POS7 se obtuvo una actividad de 54.3 ± 2.8 U/L, y para la cepa *Escovopsis* HEP25 de 2 ± 0.5 U/L. Se determinó que la metodología ajustada y el cálculo de actividad enzimática fueron apropiados para analizar las muestras de sobrenadantes crudos. Particularmente, para el género *Escovopsis* se reporta por primera vez la determinación de actividad proteolítica.

Palabras clave: control biológico, micoparásitos, proteasas, azocaseína

ABSTRACT

Standardization of the azocasein quantitative method to determine the proteolytic activity in fungal supernatants of *Escovopsis* and *Trichoderma*. Mycoparasitic fungi are capable of hydrolyzing the cell walls of their host by secreting hydrolytic enzymes, such as proteases. To quantify proteolytic activity, the methodology based on the use of the azocasein substrate is considered one of the most reliable methodologies. However, in the literature it has multiple modifications available according to its applicability and the type of microorganism. Therefore, this work was aimed to establish the optimal reaction conditions using the papain pure enzyme; in order to quantify the proteolytic activity of fungal enzyme supernatants from *Trichoderma* and *Escovopsis*. The effect of reaction time, pH, and temperature over enzymatic activity at different concentrations of papain was tested. The chromogenic substrate azocasein was used to measure the enzymatic activity. Enzyme supernatants were obtained by liquid fermentation of two fungal mycoparasites: *Escovopsis* HEP25 and *Trichoderma* POS7. According to the evaluated conditions, significant proteolytic activities were observed at 50 min of reaction, 37 °C and pH 7.4. The activity was expressed in terms of units equivalent to the activity of a given mass of papain (1 unit = 1 mg of papain). For the *Trichoderma* strain (POS7) an activity of 54.3 ± 2.8 U/L was obtained, and for the *Escovopsis* strain (HEP25) of 2 ± 0.5 U / L. The adjusted methodology and the enzyme activity calculation were determined to be appropriate for analyzing the crude supernatant samples. Particularly, for the *Escovopsis* genus, the determination of quantitative proteolytic activity is reported for the first time.

Keywords: biological control, mycoparasites, proteases, azocasein

How to cite (Vancouver style):

Barengo MP, Amerio NS, Bich GA, Castrillo ML, Zapata PD. Estandarización del método cuantitativo de azocaseína para determinar la actividad proteolítica en sobrenadantes fúngicos de *Escovopsis* y *Trichoderma*. Biotecnol Apl. 2020;37(2):2201-6.

Introducción

El control biológico de plagas por medio de hongos, se fundamenta en relaciones antagónicas como resultado final de diferentes mecanismos entre los cuales se encuentra el micoparasitismo, donde un hongo establece interacciones parasitarias con otros hongos [1, 2]. Los hongos generalistas, entre los cuales se encuentra el género *Trichoderma*, tienen un amplio rango de hospedadores y se utilizan para el control biológico directo de patógenos de plantas, tales como *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia*

sclerotiorum, *Alternaria alternata*, *Fusarium* spp., *Pythium ultimum* entre otros [3, 4]. Por otro lado, existen micoparásitos especializados, como los pertenecientes al género *Escovopsis* [3]. En contraste con *Trichoderma*, son altamente selectivos y se pueden emplear para el control biológico indirecto de hormigas cortadoras de hojas de la tribu Attini (Hymenoptera, Insecta). El parasitismo de *Escovopsis* está basado en el ataque al hongo *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales, Basidiomycota), que es cultivado por las

1. Benítez Fernández CT, Rincón Romero AM, Limón MC, Codón AC. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Int. Microbiol. 2004;7(4):249-60.

2. Karlsson M, Atanasova L, Jensen DF, Zeilinger S. Necrotrophic mycoparasites and their genomes. Microbiol. Spectr. 2017;5(2):1005-26.



Publicación libre de costo para el autor
No article processing charges

hormigas cortadoras como su principal fuente de alimento [5, 6].

El micoparasitismo, se destaca por su complejidad y el número de eventos que involucra, hasta conseguir la digestión de la célula objetivo [7]. Asimismo, la viabilidad del hospedador, depende de la integridad de la pared celular, la cual está constituida principalmente por quitina, glucanos y proteínas [8, 9]. Esta funciona como una barrera ante presiones físico-químicas ejercidas por el medio ambiente. Los hongos micoparásitos secretan enzimas líticas extracelulares, principalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, las cuales son capaces de hidrolizar los componentes de las paredes celulares del hospedador [10–13]. Particularmente, las proteasas juegan un papel importante, ya que las fibrillas de quitina y glucanos se encuentran integradas en una matriz proteica [9], la cual está involucrada en la resistencia de la célula contra sustancias extrañas. Además, intervienen en la absorción de moléculas, transmitiendo señales intracelulares de estímulos externos y sintetizando y remodelando componentes de la pared celular [14–17]. Por tanto, los estudios sobre enzimas proteolíticas, son importantes para dilucidar los mecanismos de acción involucrados en el proceso micoparasítico, lo que conducirá a una mejor aplicación de estos hongos como agentes de control biológico.

En este contexto, son aplicadas diversas metodologías para cuantificar la actividad proteolítica, y frecuentemente se emplean sustratos naturales como la caseína [18–25]. Sin embargo, cuando se utilizan proteínas naturales completas, estas constituyen colecciones de sustratos en los cuales no se rompe solo un tipo de enlace, por tanto pueden generar datos engañosos. También, pueden contener grupos ionizables capaces de influir en la capacidad de la enzima para actuar sobre el sustrato, lo cual proporcionará más información sobre la susceptibilidad del sustrato que sobre la capacidad de la enzima para actuar sobre el sustrato. Sin embargo, la aparición de derivados cromogénicos como la azocaseína, resultó conveniente ya que la detección de la actividad proteolítica depende de la liberación de péptidos solubles coloreados [26, 27]. La metodología basada en el uso del sustrato proteico azocaseína (derivado cromogénico de la caseína), tiene como principio básico la reacción sustrato-proteasas y la precipitación del sustrato no hidrolizado mediante la adición de ácido tricloroacético (TCA), liberando en el sobrenadante péptidos coloreados de bajo peso molecular [26].

Este método se considera uno de los más robustos para estudiar la actividad proteolítica de las enzimas, debido a su estabilidad de color y que no requiere el uso de reactivos cromogénicos [28]. No obstante, presenta múltiples modificaciones disponibles, en función de su aplicabilidad y el tipo de microorganismo [29–33]. Por lo tanto, es preciso ajustar las condiciones de reacción empleadas, para obtener resultados reproducibles y comparables.

Particularmente para el género *Trichoderma* se han reportado diversas condiciones de reacción para esta metodología [34–37], y con respecto al género *Escovopsis*, no existen reportes sobre la cuantificación de su actividad proteolítica.

Debido a la naturaleza básica de las proteasas involucradas en los procesos de micoparasitismo, se requiere una enzima de función análoga para ensayar las condiciones de reacción [38]. En este contexto, la papaína es una proteasa con un amplio rango de especificidad. Si bien es una enzima vegetal, hidroliza enlaces peptídicos que implican aminoácidos básicos y es menos costosa que las enzimas microbianas [39, 40].

Debido a lo expuesto, en el presente trabajo se ajustó las condiciones del método colorimétrico de azocaseína, para determinar la actividad proteolítica en sobrenadantes enzimáticos fúngicos de *Trichoderma* y *Escovopsis*. Específicamente, para el género *Escovopsis* se reporta por primera vez la determinación de actividad proteolítica.

Materiales y métodos

Material biológico

Para los ensayos se emplearon dos aislamientos fúngicos de micoparásitos pertenecientes a dos géneros distintos: *Escovopsis* (HEP25) y *Trichoderma* (POS7), conservados en el cepario del Instituto de Biotecnología Misiones Dra. María Ebe Reca de la Universidad Nacional de Misiones bajo los números de acceso LBM209 y LBM116, respectivamente.

Reactivos químicos

Para la determinación enzimática se utilizó el sustrato cromogénico azocaseína al 0.5% (p/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), diluido en tampón Tris-HCl (0.2 M; pH 7.4). Una vez preparado se conservó a -20°C . Para cortar y revelar la reacción enzimática se utilizó TCA al 10% (p/v) (Biopack, Bs. As. Argentina) diluido en agua destilada. Se conservó en frasco color caramelo a 4°C .

Preparación del sobrenadante enzimático

Los sobrenadantes enzimáticos se obtuvieron mediante fermentación líquida. Los aislamientos se reactivaron en placas de Petri conteniendo medio de cultivo agar dextrosa papa (PDA) 3.9% (p/v). Se incubaron entre 7 y 14 días a 28°C y bajo luz continua. Se preparó una suspensión a una concentración de 1×10^7 esporas/mL en una solución de agua destilada y Tween 80 al 0.1% (v/v). De cada aislamiento se inocularon 10 mL de suspensión de esporas en 400 mL de medio de cultivo líquido, el cual contenía los componentes del medio Mandels como fuente de nitrógeno [42]. Como fuente de carbono se empleó el micelio estéril de hongos fitopatógenos a una concentración de 10% (v/v), para inducir la secreción de enzimas micolíticas por parte de los micoparásitos. Los hongos utilizados pertenecían a los géneros: *Alternaria*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Verticillium*, *Macrophomina* y *Diplodia*. Los ensayos se realizaron por duplicado y se incubaron durante ocho días a 28°C , con agitación a 100 rpm. Durante los días de incubación, se extrajeron diariamente 15 mL de sobrenadante de cada ensayo para la determinación enzimática cuantitativa.

Preparación de las soluciones de papaína

Se preparó una solución madre de papaína (Biopack, Bs. As. Argentina) EC 3.4.22.2, con una concentración

3. Sung GH, Poinar Jr GO, Spatafora JW. The oldest fossil evidence of animal parasitism by fungi supports a Cretaceous diversification of fungal-arthropod symbioses. *Mol Phylogenet Evol.* 2008;49(2):495-502.

4. Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerly CM, Monte E, et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9(10):749.

5. Reynolds HT, Currie CR. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. *Mycologia.* 2004;96(5):955.

6. Marfátán JA, Romero AI, Folgarait PJ. Pathogenic interaction between *Escovopsis weberi* and *Leucoagaricus* sp.: mechanisms involved and virulence levels. *Fungal Ecol.* 2015;17:52-61.

7. Hamú Y de F. Produção de hidrolases pelo fungo *Dicyna pulvinata*, caracterização bioquímica de uma proteinase e purificação parcial desta enzima [Dissertação Mestrado em Patologia Molecular]. Brasília: Univ. de Brasília; 2007.

8. Bartnicki-García S. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu Rev Microbiol.* 1968;22(1):87-108.

9. Wessels J. Cell wall synthesis in apical hyphal growth. *Int Rev Cytol.* 1986;104:37-79.

10. Barnett H. Mycoparasitism. *Mycologia.* 1964;56(1):1-19.

11. Barnett H, Binder F. The fungal host-parasite relationship. *Annu Rev Phytopathol.* 1973;11(1):273-29.

12. Jeffries P. Biology and ecology of mycoparasitism. *Can J Bot.* 1995;73(S1):1284-90.

13. Harman GE. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* 84(4):377-93.

14. Pladys D, Esquerre-Tugaye M. Activité protéolytique de *Colletotrichum lagenarium*: comparaison de souches de virulence variable et purification. *CR Acad Sci Ser D.* 1974;278:743-6.

15. Khare K, Bompeix G. Activités protéolytiques des *Sclerotinia sclerotiorum* et *S. minor*: rôle possible lors de la pathogénèse. *Rev Mycol.* 1976;40(1):65-84.

16. Sivan A, Chet I. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology.* 1989;135(3):675-82.

17. Bowman SM, Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays.* 2006;28(8):799-808.

18. Arnon R. Papain. *Methods Enzymol.* 1970;19:226-44.

19. Malathi S, Chakraborty R. Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. *Appl Env Microbiol.* 1991; 57(3):712-6.

20. Manonmani HK, Joseph R. Purification and properties of an extracellular proteinase of *Trichoderma koningii*. *Enzyme Microb Technol.* 1993;15(7):624-8.

de 0.20 mg/mL en tampón Tris/HCl (0.2 M). A partir de la solución madre se prepararon seis diluciones, en tampón Tris/HCl (0.2 M; pH 7.4), hasta obtener concentraciones finales entre 0.01-0.18 mg/mL. Los ensayos se llevaron a cabo en presencia de una solución activadora de cisteína (0.005 M) y EDTA (0.002 M) (Biopack, Bs. As. Argentina), ya que en su estado nativo la papaína muestra baja actividad. Todas las soluciones se prepararon en fresco.

Determinación cuantitativa de la actividad enzimática

La actividad proteolítica se midió tomando como base la metodología propuesta por Charney y Tomarelli (1947), con modificaciones para cada ensayo, mediante una estrategia de optimización de un factor a la vez [41]. Se adicionó 1 mL de azocaseína 0.5 % (p/v) y 1 mL de cada dilución. Se incubó en baño termostático y la reacción se detuvo agregando 2 mL de TCA al 10 % (p/v). El blanco de reacción se preparó adicionando 1 mL de azocaseína, 1 mL de tampón Tris/HCl (0.2 M) y 2 mL de TCA. Se centrifugó a $4000 \times g$ durante 10 min y la absorbancia del sobrenadante se midió en espectrofotómetro MAPADA (Shanghai Mapada Instruments Co., Ltd. China). Se realizó un barrido espectral para determinar la longitud de onda máxima, a la cual se registra el máximo de absorbancia. La actividad proteolítica fue expresada a través del aumento de absorbancia en distintas concentraciones de papaína para todos los ensayos.

Determinación del tiempo óptimo de reacción

Para determinar el tiempo óptimo de reacción, se realizaron los ensayos bajo las condiciones descritas anteriormente y se evaluó el tiempo de reacción en intervalos de 10 min durante 70 min, a partir de los 20 min.

Efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática

El efecto del pH sobre la actividad enzimática se determinó con el empleo de los tampones acetato pH 5.0, fosfato pH 6.0 y Tris-HCl pH 7.4, 8.0, 9.0. Asimismo, la temperatura óptima se determinó incubando la reacción a 30, 37 y 50 °C. Los ensayos se desarrollaron en las mismas condiciones experimentales descriptas anteriormente.

Análisis estadísticos

Para seleccionar las condiciones de reacción, los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa estadístico InfoStat versión 2018 (Grupo InfoStat, Argentina). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de diferencia entre medias, mediante el test de Tukey, con un nivel de confianza de 95.0%. Los valores medios y de desviación estándar se obtuvieron a partir de dos réplicas.

Resultados y discusión

Las proteasas de cepas fúngicas han sido caracterizadas por su importancia tanto biológica como comercial [43]. Los hongos secretan proteasas extracelulares que participan en la degradación del micelio del huésped durante la infección patológica de los mismos [44]. Por tanto, representan un factor importante para el control biológico de una variedad de microorganismos.

En consecuencia, el empleo de una metodología adecuada es determinante para cuantificar la actividad proteolítica en forma óptima.

En este trabajo, se diseñaron y desarrollaron ensayos con la finalidad de establecer las condiciones de reacción, para cuantificar la actividad proteolítica de sobrenadantes enzimáticos fúngicos pertenecientes a los géneros *Escovopsis* y *Trichoderma*, tomando como base el método colorimétrico de azocaseína [26] empleando la enzima pura papaína.

Determinación de la longitud de onda y el tiempo de reacción

En primer lugar, para todas las concentraciones de papaína ensayadas, mediante la curva de barrido espectral se observaron los mayores valores de absorbancia a 340 nm, por tanto se seleccionó como longitud de onda estándar para los ensayos siguientes.

Con respecto al tiempo de reacción, se observó la mayor absorbancia a los 50 min de reacción (Figura 1). El ANOVA mostró diferencias significativas entre los diferentes tiempos de reacción ($p < 0.05$) y los valores R indicaron que más del 95 % de la variación se debió a las condiciones ensayadas. La actividad aumentó significativamente hasta 50 min para todas las concentraciones de papaína analizadas (Figura 2). Con respecto al parámetro tiempo de reacción, en estudios con *Trichoderma* se han reportado tiempos muy variables, entre 20 y 70 min [25, 35, 37, 45, 46]. Por lo tanto se seleccionó 50 min como tiempo estándar de reacción, donde la actividad fue máxima,

21. Hajji M, Kanoun S, Nasri M, Gharsallah N. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochem.* 2007;42(5):791-7.

22. Shankar S, Rao M, Laxman RS. Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. *Process Biochem.* 2011; 46(2):579-85.

23. Vijay Kalaskar V, Kasinatha N, Mallickarjuna Subrahmanyam V, Venkata Rao J. Optimization of extracellular acid protease production from *Aspergillus niger* by factorial design. *J Microbiol Biotechnol Food Sci.* 2014;4(2):132-6.

24. Singh K, Nath S. The combinations of vermish with bio-pesticides-A boon for crop productivity. *Res Rev: J Pharmacogn Phytochem.* 2016;8(3):172-202.

25. Deng J-J, Huang W-Q, Li Z-W, Lu D-L, Zhang Y, Luo X. Biocontrol activity of recombinant aspartic protease from *Trichoderma harzianum* against pathogenic fungi. *Enzyme Microb Technol.* 2018;112:35-42.

26. Charney J, Tomarelli RM. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J Biol Chem.* 1947;171(2):501-5.

27. Beynon RJ, Bond JS, editors. *Proteolytic enzymes: a practical approach.* 2nd ed. Oxford, New York: Oxford University Press; 2001.

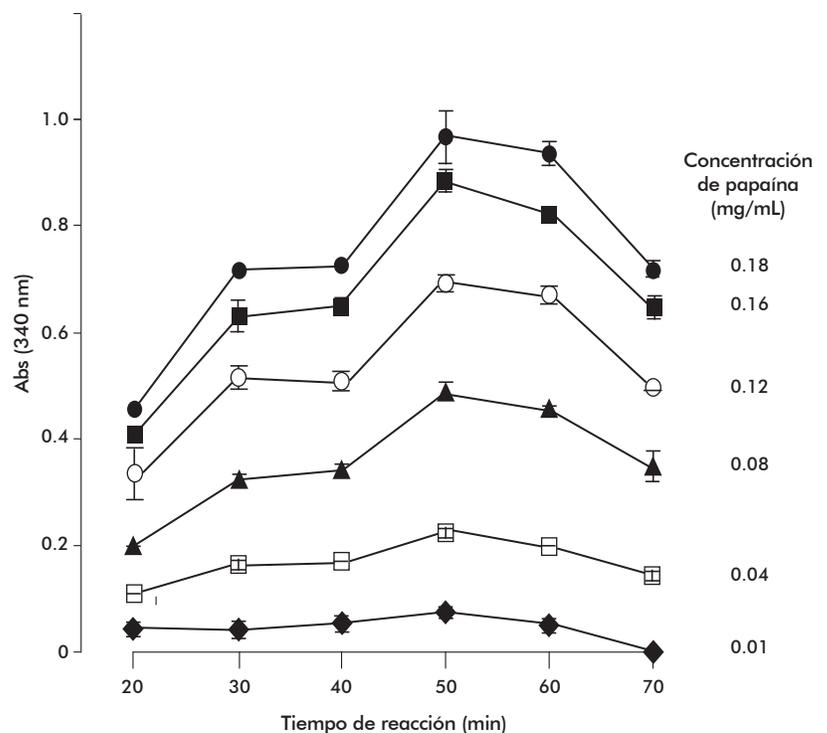


Figura 1. Actividad proteolítica a diferentes tiempos de reacción (min), medida a través del aumento de absorbancia (Abs) en seis concentraciones de Papaína. Se tuvieron en cuenta los valores de absorbancia obtenidos en condiciones de reacción estándar (temperatura: 37 °C y pH: 7.4).

estadísticamente significativa y los valores de absorbancia abarcaron el rango de 0 a 1.

Efecto de la temperatura y el pH en la actividad enzimática

Con respecto a las temperaturas ensayadas, en el ANOVA se observaron diferencias significativas para todas las concentraciones de papaína ensayadas ($p < 0.05$). Los valores R indicaron que más del 90 % de la variación fue resultado de las temperaturas ensayadas. La prueba de diferencia entre medias mostró un aumento significativo a 37 °C (Figura 3). Con respecto a la menor concentración, no se observaron diferencias significativas entre 30 y 37 °C y no se detectó actividad enzimática a 50 °C. Por ello, se seleccionó 37 °C como la temperatura de reacción.

Los resultados obtenidos fueron concordantes a los informados en trabajos en los que se empleó *Trichoderma* spp. como biocontroladores de enfermedades fúngicas [46, 47]; asimismo existen trabajos donde se reportaron valores óptimos mayores entre 40 y 50 °C [20, 35, 44, 48].

Con respecto al pH de reacción, el ANOVA mostró diferencias significativas en las concentraciones de papaína ensayadas ($p < 0.05$). Los valores R indicaron que más del 90 % de la variación fue resultado del pH ensayado. Se observó una mayor actividad enzimática a pH 7.4 para todas las concentraciones de papaína ensayadas. La prueba de diferencia entre medias demostró que esta diferencia con respecto a otros pH fue significativa, a excepción de la concentración más elevada (0.18 mg/mL), en la cual no se observaron diferencias significativas en un rango de pH de 6.0 a 9.0 (Figura 4).

Existen estudios en una variedad de organismos que establecieron un óptimo de actividad en estas condiciones, ya que en general las proteasas con pH óptimo neutro y alcalino se destacan por su importancia en la industria agrícola [49, 50]. Numerosos estudios con hongos filamentosos reportaron pH de reacción óptimos en un rango de 7.0 a 9.0 [21, 22, 51]. Particularmente, en aislamientos de *Trichoderma* se observaron actividades proteolíticas máximas en un rango de 7.0 a 8.0 [20, 35, 44, 46].

Determinación de la actividad proteolítica en sobrenadantes fúngicos

Se utilizó la enzima papaína pura para realizar una curva de calibración (Figura 5), en la cual se consiguió una relación lineal positiva entre la absorbancia a 340 nm y la concentración de papaína, durante 50 min de reacción, a 37 °C y pH 7.4. De esta manera, se obtuvo la ecuación para calcular la actividad enzimática de los sobrenadantes fúngicos de *Trichoderma* POS7 y *Escovopsis* HEP25.

En algunos estudios se definió una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para aumentar un determinado número de unidades de absorbancia (de 0.01 a 1), en las condiciones de reacción [35, 53-56]. Sin embargo, cuando se expresó la actividad de este modo no se lograron resultados directamente comparables.

Por lo tanto, se expresó en términos de unidades equivalentes a la actividad de una masa determinada

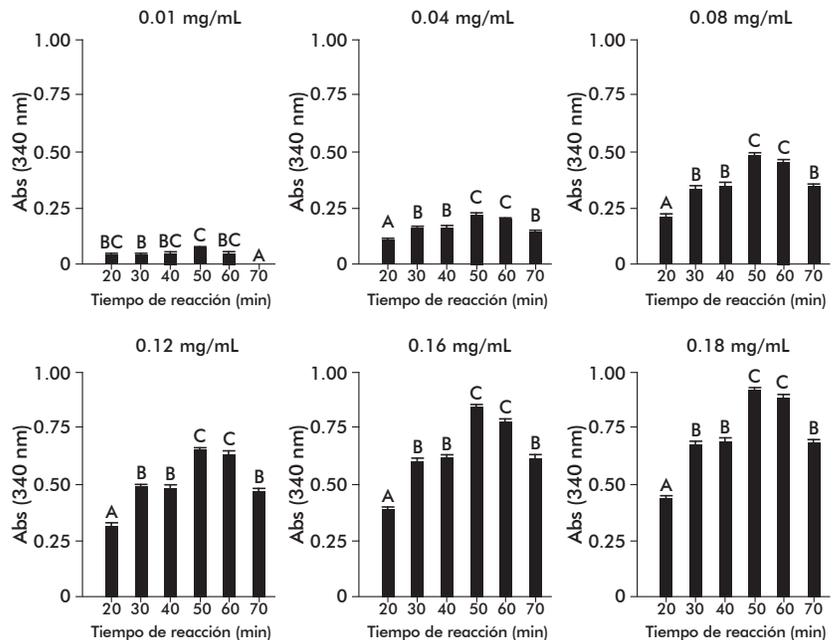


Figura 2. Prueba de diferencia entre medias de la absorbancia a diferentes tiempos de reacción (20 a 70 min), para distintas concentraciones de enzima papaína pura. Test de Tukey, con un nivel del 95.0 % de confianza. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

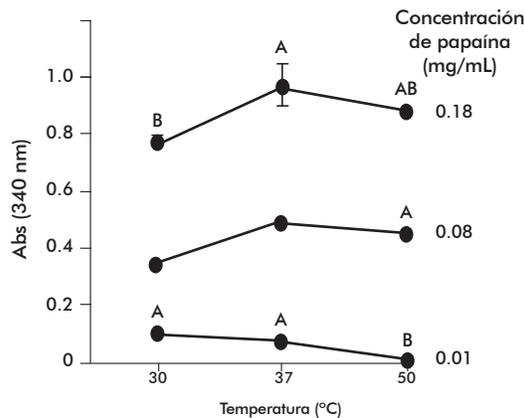


Figura 3. Actividad proteolítica bajo diferentes temperaturas ensayadas (30, 37 y 50 °C), medida a través del aumento de absorbancia en tres concentraciones de Papaína (0.01, 0.08 y 0.18 mg/mL) y prueba de diferencia entre medias de la actividad proteolítica a diferentes temperaturas de reacción, para distintas concentraciones de enzima papaína pura. Test de Tukey, con un nivel del 95.0 % de confianza. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). Se tuvieron en cuenta los valores de absorbancia obtenidos para el tiempo de reacción óptimo (50 min) y pH 7.4.

de papaína (1 unidad = 1 mg de papaína) según Kole et al. [52].

Entonces la actividad enzimática se definió como:

$$\text{Actividad enzimática (U/mL)} = \frac{\text{Abs} - 0.019}{5.422}$$

Para la cepa de *Trichoderma* POS7, se obtuvo una actividad enzimática de 54.3 ± 2.8 U/L; y para la cepa de *Escovopsis* HEP25 se obtuvo una actividad de 2 ± 0.5 U/L.

El aislamiento de *Trichoderma* POS7 presentó una mayor actividad enzimática, a diferencia de lo observado en el aislamiento de *Escovopsis* HEP25, en la cual se detectó baja actividad. Esta diferencia puede ser consecuencia de la especialización por parte de *Escovopsis*, ya que en este trabajo se emplearon micelios de fitopatógenos y no se incluyó al hongo *L. gongylophorus* en el medio de cultivo.

En su investigación, Inglis y Kawchuk [57], compararon la degradación de paredes celulares por parte de distintos micoparásitos y no observaron una degradación significativa de paredes de fitopatógenos por parte de aislamientos de *Escovopsis*. Por otra parte, de Man *et al.* [58], detectaron que algunos grupos de genes estaban regulados positivamente cuando crecían con *L. gongylophorus*. Esto indica que durante el micoparasitismo, *Escovopsis* activa mecanismos característicos, estructurales, fisiológicos y enzimáticos, que fueron evolucionando en función de su huésped específico [58]. Cabe destacar que este es el primer reporte de cuantificación de la actividad proteolítica para una cepa perteneciente al género *Escovopsis*.

Conclusiones

Este trabajo permitió ajustar la metodología para determinar la actividad proteolítica en sobrenadantes enzimáticos fúngicos. Se utilizó azocaseína como sustrato y se establecieron los parámetros de trabajo óptimos utilizando papaína: temperatura de 37°C , pH 7.4 y un tiempo de reacción de 50 min.

Bajo la metodología descrita, se lograron resultados reproducibles en todas las réplicas de sobrenadantes enzimáticos pertenecientes a los géneros fúngicos *Trichoderma* y *Escovopsis*, obteniéndose actividades proteolíticas de 54.3 ± 2.8 U/L, y 2 ± 0.5 U/L respectivamente. Por tanto, se pudo cuantificar su capacidad para hidrolizar sustratos proteicos, lo cual permitirá el empleo de esta metodología en futuros ensayos para definir su potencial aplicación en el control biológico de plagas.

Agradecimientos

Los autores agradecen el continuo apoyo de la Universidad Nacional de Misiones, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2016-

28. Coêlho DF, Saturnino TP, Fernandes FF, Mazzola PG, Silveira E, Tambourgi EB. Azocasein substrate for determination of proteolytic activity: Reexamining a traditional method using bromelain samples. *BioMed Res Int.* 2016;2016:8409183.

29. Dienes D, Börjesson J, Hågglund P, Tjerneld, F, Lidén, G, Réczey K, *et al.* Identification of a trypsin-like serine protease from *Trichoderma reesei* QM9414. *Enzyme Microb Technol.* 2007;40(5):1087-94.

30. Cruz Ramírez CA. Caracterización parcial de una proteasa alcalina a partir de hongos filamentosos implicados en el deterioro de documentos históricos [Doctoral dissertation]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2011.

31. Lopes FC, Tichota DM, Daroit DJ, Velho RV, Pereira JQ, Corrêa APF, *et al.* Production of proteolytic enzymes by a keratin-degrading *Aspergillus niger*. *Enzyme Res.* 2011; 2011: 487093.

32. de Castro RJS, Sato HH. Protease from *Aspergillus oryzae*: Biochemical characterization and application as a potential biocatalyst for production of protein hydrolysates with antioxidant activities. *J Food Process.* 2014;2014:1-11.

33. González MJ, Olivera JA, Bermúdez J, Reginensi SM. Genetic diversity and extracellular enzymatic activity of *Bacillus licheniformis* strains from milk powder. *J Microbiol Biotechnol. Food Sci.* 2019; 2019: 460-4.

34. de Castro AM, Ferreira MC, da Cruz JC, Pedro KCNR, Carvalho DF, Leite SGF, *et al.* High-yield endoglucanase production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 cultivated in pretreated sugarcane mill byproduct. *Enzyme Res.* 2010;2010:1-8.

35. Aissaoui N, Chobert JM, Haertlé T, Marzouki MN, Abidi F. Purification and biochemical characterization of a neutral serine protease from *Trichoderma harzianum*. Use in antibacterial peptide production from a fish by-product hydrolysate. *Appl Biochem Biotechnol.* 2017;182(2):831-45.

36. García-Espejo CN, Mamani-Mamani MM, Chávez-Lizárraga GA, Álvarez-Aliaga MT. Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como

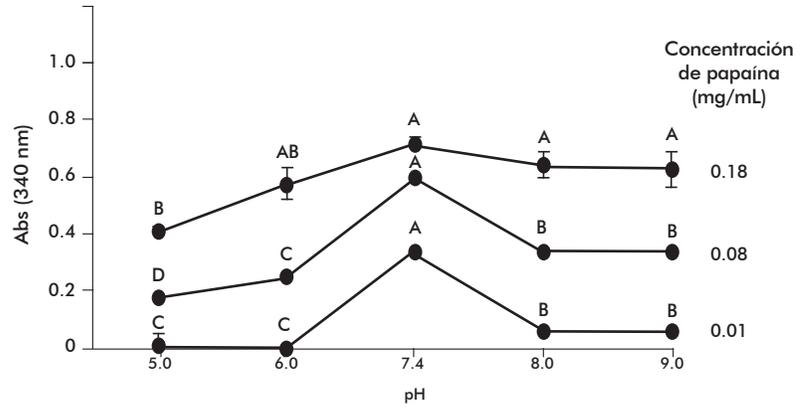


Figura 4. Actividad proteolítica bajo diferentes pH de reacción (5.0, 6.0, 7.4, 8.0, 9.0), medida a través del aumento de absorbancia en tres concentraciones de Papaína (0.01; 0.08 y 0.18 mg/mL); y prueba de diferencia entre medias de la actividad proteolítica a diferentes pH de reacción, para distintas concentraciones de enzima papaína pura. Test de Tukey, con un nivel del 95,0% de confianza. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Se tuvieron en cuenta los valores de absorbancia obtenidos para el tiempo de reacción óptimo (50 min) y temperatura óptima (37°C).

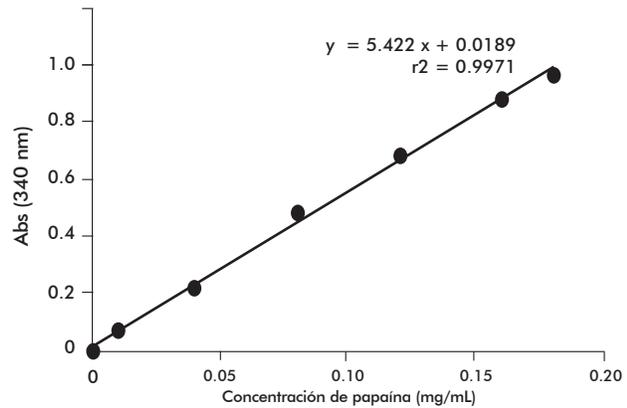


Figura 5. Curva de calibración de la enzima papaína utilizada como estándar. Las condiciones de reacción fueron: Azocaseína 0.5 % (p/v); pH 7.4; a 50°C durante 50 min de reacción.

3349) y el programa de becas de CONICET. MPB y NSA poseen beca doctoral Conicet, GAB posee beca postdoctoral, MLC es investigador asistente y PDZ es investigador independiente de CONICET.

Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran la ausencia de conflictos de interés.

- posible biocontrolador. *J Selva Andina Res Soc.* 2016;7(1):20-32.
37. Daranagama ND, Shioya K, Yuki M, Sato H, Ohtaki Y, Suzuki Y, et al. Proteolytic analysis of *Trichoderma reesei* in cellulase-inducing condition reveals a role for *Trichoderma pepsin* (TrAsP) in cellulase production. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2019;46(6):831-42.
38. Caffini NO, López LM, Natalucci CL, Priolo N. Proteasas de plantas superiores. I. Características generales, rol fisiológico y aplicaciones. *Acta Farm Bonaer.* 1988;7(3):195-213.
39. Kato A, Tanaka A, Matsudomi N, Kobayashi K. Deamidation of food proteins by protease in alkaline pH. *J. Agric. Food Chem.* 1987;35(2):224-7.
40. Sangeetha K, Abraham TE. Chemical modification of papain for use in alkaline medium. *J Mol Catal B Enzym.* 2006; 38(3-6):171-177.
41. Irfan M, Nadeem M, Syed Q. One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride*-IR05 in solid-state fermentation. *J Radiat Res Appl Sci.* 2014;7(3):317-26.
42. Mandels M, Reese ET. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J Bacteriol.* 1957;73(2):269.
43. Haard NF, Simpson BK. Seafood enzymes: utilization and influence on post-harvest seafood quality. CRC Press; 2000.
44. North MJ. Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. *Microbiol Rev.* 1982; 46(3):308.
45. Savitha S, Sadhasivam S, Swaminathan K, Lin FH. Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. *J Taiwan Inst Chem Eng.* 2011;42(2):298-304.
46. Consolo VF, Mónaco CI, Cordo CA, Salerno GL. Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. *World J Microbiol. Biotechnol.* 2012;28(4):1389-98.
47. De Marco JL, Felix CR. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. *BMC Biochem.* 2002;3(1):3-3.
48. Dunaevsky YE, Gruban TN, Beliakova GA, Belozersky MA. Enzymes secreted by filamentous fungi: regulation of secretion and purification of an extracellular protease of *Trichoderma harzianum*. *Biochem Biokhimiia.* 2000;65(6):723-7.
49. Anwar A, Saleemuddin M. Alkaline proteases: a review. *Bioresour Technol.* 1998;64(3):175-183.
50. Córdova-Murueta JH, Navarrete-del-Toro MA, García-Carreño FL. Advances in the study of activity additivity of supplemented proteases to improve digestion of feed protein by *Penaeus vannamei*. *Aquac Nutr.* 2017;23(2):414-21.
51. Abidi F, Limam F, Marzouki MN. Purification and characterization of an alkaline protease prot 1 from *Botrytis cinerea*. *Appl Biochem. Biotechnol.* 2007;141(2-3):361-76.
52. Kole MM, Draper I, Gerson DF. Protease production by *Bacillus subtilis* in oxygen-controlled, glucose fed-batch fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1988;28(4-5):404-8.
53. Andrews B, Asenjo J. Continuous-culture studies of synthesis and regulation of extracellular β (1-3) glucanase and protease enzymes from *Oerskovia xanthineolytica*. *Biotechnol Bioeng.* 1987;30(5):628-37.
54. Castro S, Peyronel DV, Cantera AMB. Proteolysis of whey proteins by a *Bacillus subtilis* enzyme preparation. *Int Dairy J.* 1996;6(3):285-94.
55. Valles D, Furtado S, Villadoniga C, Cantera AMB. Characterisation, stabilisation and possible biotechnological applications of new proteolytic enzymes from *Solanum granuloseleprosum*. *Int J Biotechnol.* 2004;6(4):346-60.
56. Asad SA, Tabassum A, Hameed A, Afzal A, Khan SA, Ahmed R, et al. Determination of lytic enzyme activities of indigenous *Trichoderma* isolates from Pakistan. *Braz. J Microbiol.* 2015;46(4):1053-64.
57. Inglis GD, Kawchuk LM. Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. *Can J Microbiol.* 2002;48(1):60-70.
58. de Man TJB, Stajich JE, Kubicek CP, Teiling C, Chenthamara K, Atanasova L, et al. Small genome of the fungus *Escovopsis weberi*, a specialized disease agent of ant agriculture. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113(13):3567-72.

Recibido en febrero, 2020.

Aprobado en abril, 2020.