



## **XXVI Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**

Orden Poster: CE-042 (ID: 2146)

**Autor: Van De Velde, Andrea Carolina**

**Título: Caracterización de una tripsina aislada del extracto de vísceras de Surubí (Pseudoplatystoma corruscans)**

Director: Leiva, Laura Cristina Ana

Co-Director: Sanchez, Sebastian

Palabras clave: Tripsina, Extracto alcalino, pH, Temperatura, Tripsinización

Área de Beca: Cs. Naturales Y Exactas

Tipo Beca: Cofinanciadas Pos-doctorales

Periodo: 01/04/2018 al 30/06/2021

Lugar de trabajo: Iquiba Nea - Inst. De Química Básica Y Aplicada Del Nordeste Argentino

Proyecto: (PICTO UNNE-2019-00011) Enzimas de fuentes alternativas, con potencial utilidad industrial, para un desarrollo sostenible en la región del Impenetrable.

### **Resumen:**

Las enzimas son catalizadores biológicos efectivos y se requieren en muy baja concentración, ya que no se consumen a lo largo de la reacción bioquímica. Las fuentes principales de producción de enzimas para empleo industrial son: microbiana (se extraen de bacterias y hongos), vegetal (e.j. la industria de la malta de cebada) y animal (subproducto de la ganadería bovina y porcina, a partir de vísceras) obteniéndose del estómago extractos ácidos ricos en pepsina y del páncreas, los extractos ricos en proteasas alcalinas, principalmente tripsina y quimotripsina. En la actualidad se vienen desarrollando investigaciones orientadas a aprovechar fuentes biológicas de enzimas distintas de las convencionalmente usadas (microbianas y de vísceras de ganados), considerando el alto valor agregado que tiene un extracto enzimático, como así también las propiedades bioquímicas particulares que lo puedan volver especialmente atractivo para su uso en la industria y en laboratorios de investigación. Las enzimas digestivas de peces cobraron importancia en los últimos años, por dos razones: a) se comportan de modo semejante a las de origen bovino y porcino, presentando características propias de interés a emplear en la industria, b) están presentes en vísceras, las que constituyen el desecho mayoritario del procesamiento de los pescados (5 % del peso) y que, descartadas al medio, pueden inducir problemas ambientales. El Nordeste Argentino cuenta con especies ictícolas nativas cultivadas en diferente grado de desarrollo, tales como pacú, surubí, dorado, boga, y sábalo. De la producción acuícola total, superior a 3300 tn, aproximadamente 74 tn corresponden a las especies de surubí (*P. fasciatus* y *P. corruscans*), cuyo cultivo ha venido incrementándose en forma sostenida en los últimos años, y con ello los productos de descarte resultado del procesamiento de los animales. Con estas perspectivas y los resultados obtenidos en un trabajo previo donde se logró el aislamiento, a partir de un extracto alcalino, de una enzima con actividad tripsina, el objetivo de este estudio fue ampliar la caracterización de la misma y evaluar su acción sobre cultivos celulares. Para ello, se preparó un extracto alcalino a partir del tejido mesentérico presente en el estómago y duodeno del surubí, área donde se localiza el páncreas difuso en esta especie. El mismo se activó por incubación (120 h a 4°C), y posteriormente se sembró en una columna de Benzamidina Sepharosa, para la purificación en etapas (variando el pH) de la enzima de interés. Una vez purificada se evaluó el comportamiento de la tripsina, sobre el sustrato BApNA (N-Benzoil-L-arginina 4-nitroanilida hidrocilada) y el sustrato BTEE (N-benzoil-L-tirosil etil éster). Posteriormente se determinaron los parámetros cinéticos,  $V_{max}$  y  $K_m$ , a partir del gráfico de Lineweaver-Burk y se ensayó la estabilidad de la enzima frente a distintos pH (2.5, 4, 5, 6, 7, 9, 10 y 13) y diferentes temperaturas (0, 8, 37, 45, 50, 55, 60, 75 y 100°C) por 120 min. Por último se evaluó la actividad de la tripsina sobre células endoteliales derivadas del timo, línea tEnd (CVCL\_6272). Los resultados mostraron que la enzima purificada mantiene la actividad sobre BApNA casi en su totalidad respecto a la del extracto alcalino, y que los valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  de la misma son 28490 UI/L y 2 mM, respectivamente. Respecto a los estudios de estabilidad, por un lado se observó que la enzima conserva su actividad a pHs 7-10 y se anula a pH inferiores a 2 y superiores a 13; y por otro lado, el tratamiento térmico en un rango 0-55°C no afecta su actividad pero a temperaturas superiores se desnaturaliza, perdiendo la actividad por completo a partir de 75 °C. Por último, la acción de la tripsina sobre células endoteliales fue equivalente a la de la tripsina comercial, produciendo un 100% de células despegadas y viables. En conclusión, se lograron determinar los parámetros cinéticos,  $V_{max}$  y  $K_m$ , de la enzima purificada del extracto alcalino de surubí, con principal actividad tripsina. Ésta enzima presenta su máximo de actividad a pHs alcalinos (8-9) y en un rango de temperatura de 45-55 °C, y su capacidad de tripsinización de células es equivalente a la tripsina comercial. Estos resultados preliminares abren la posibilidad del uso comercial de estas enzimas ictícolas como alternativa a la comercial de origen porcino. Mayores estudios se requieren para evaluar si esta enzima presenta particularidades atractivas para su uso en ensayos de tripsinización.