

Trabajo de Tesis para optar al **Título de
Doctor de la Universidad Nacional del Nordeste**

Química

CARACTERIZACIÓN DE PEPSINA DE SÁBALO

(Prochilodus lineatus)

EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL
APLICACIÓN INDUSTRIAL

Ing. Qca. Antonella Acevedo Gomez

Directora: Dra. LAURA C. LEIVA

Co-Directora: Dra. SOLEDAD BUSTILLO

Sub-Directora: Dra. ESTER CHAMORRO

Lugar de trabajo:

Laboratorio de Investigación en Proteínas (LabInPro),
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (FaCENA),
Instituto de Química Básica y Aplicada (IQIBA-NEA)-
Universidad Nacional del Nordeste (UNNE),
Corrientes, Corrientes, Argentina

Centro de Investigación en Química Orgánica-Biológica (QUIMOB),
Facultad Regional Resistencia de la Universidad Tecnológica Nacional (UTN-FRRE)
Instituto de Modelado e Innovación Tecnológica (IMIT)
Resistencia, Chaco

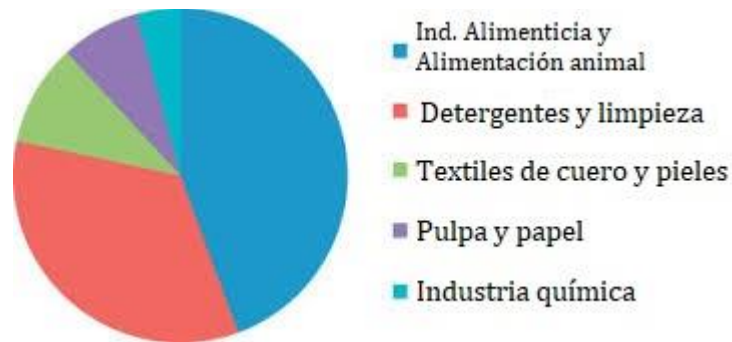


Figura 1.1. Ventas de enzimas industriales por sector. Fuente (Patel, Singhania, & Pandey, 2017)

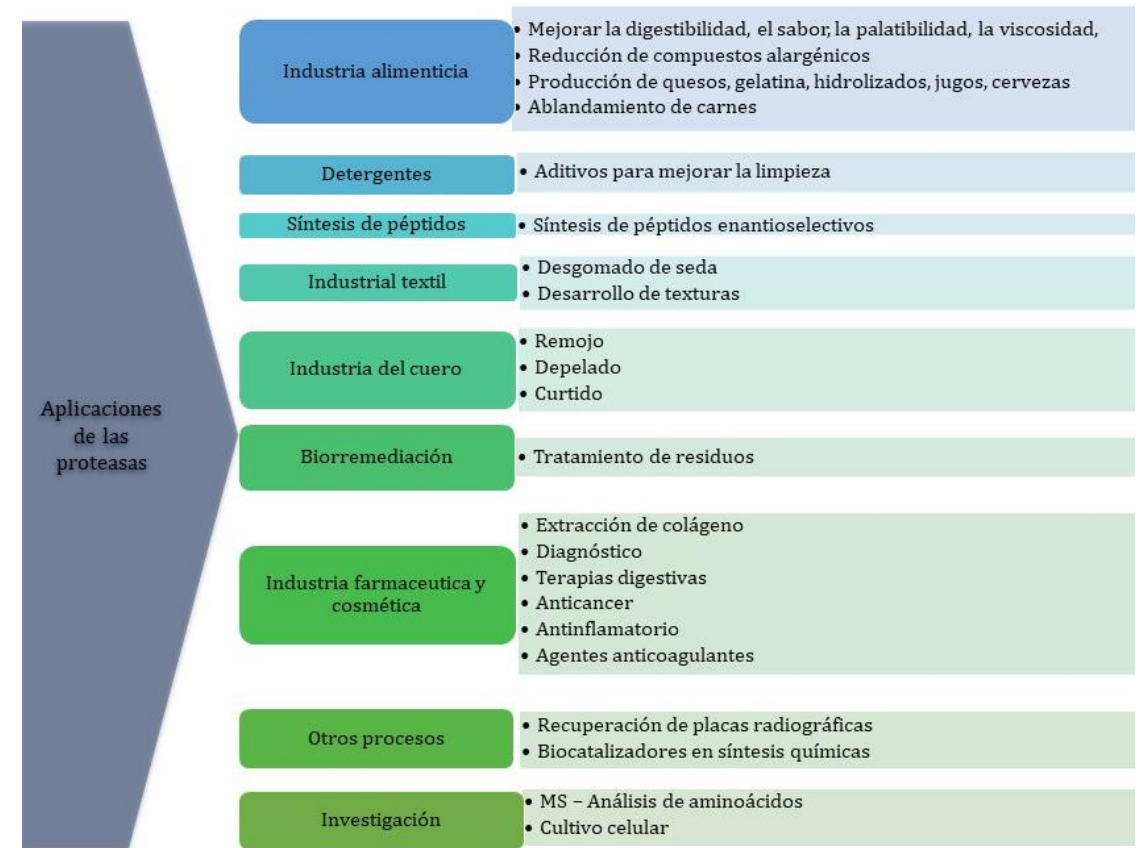


Tabla 1.1. Aplicaciones de las proteasas. Fuente: adaptación de tablas extraídas de Singh et al., 2016), Beniwal & Sharma (2014) y Jabalia et al., (2014).

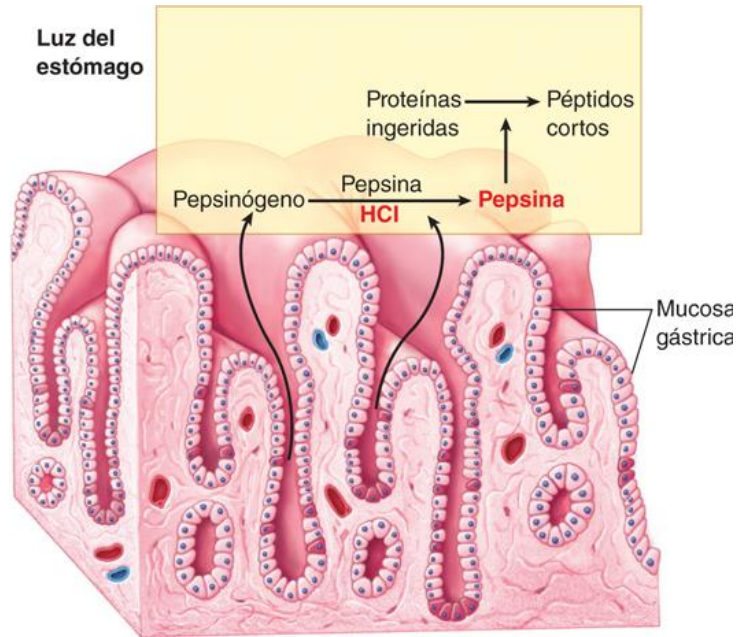


Figura 1.4. Secreción del pepsinógeno y activación de la pepsina en el estómago.
Fuente: *Fisiología humana*, 14e: www.accessmedicina.com. ©McGraw-Hill Education.

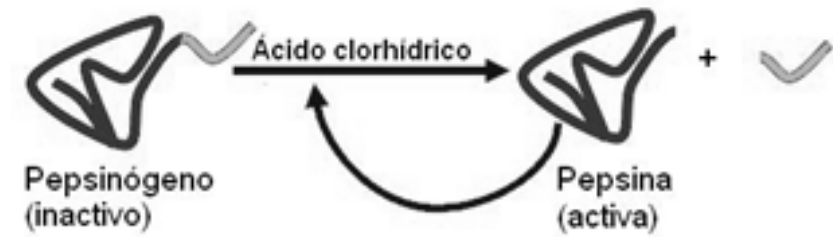


Figura 1.5. Conversión de pepsinógeno en pepsina



Figura 1.11. Imagen de folleto publicitario de fines del siglo XIX que destaca las propiedades de la goma de mascar por parte de su fabricante, en relación a la inclusión de pepsina en su composición.

I

A



B



Figura 1.12. A: Imagen de folleto publicitario de fines del siglo XIX de la bebida Pepsi Cola. **B:** Evolución del diseño del Logo.

***Fabricación de alimentos:**

- Modificar y proporcionar cualidades de batido a la proteína de soja y la gelatina (Kun, 2006)
- Modificar proteínas vegetales a usar en productos de aperitivos no lácteos, para hacer cereales precocidos (Billings, 1935)
- Hidrolizados de proteínas animales y vegetales para su uso en alimentos y bebidas saborizantes
- Industria del cuero para eliminar el vello y el tejido residual de las pieles y en la recuperación de plata de películas fotográficas desechadas al digerir la capa de gelatina que contiene la plata (Smith, 1933).

*** Hidrólisis de IgG: obtención de fragmentos F(ab')₂**

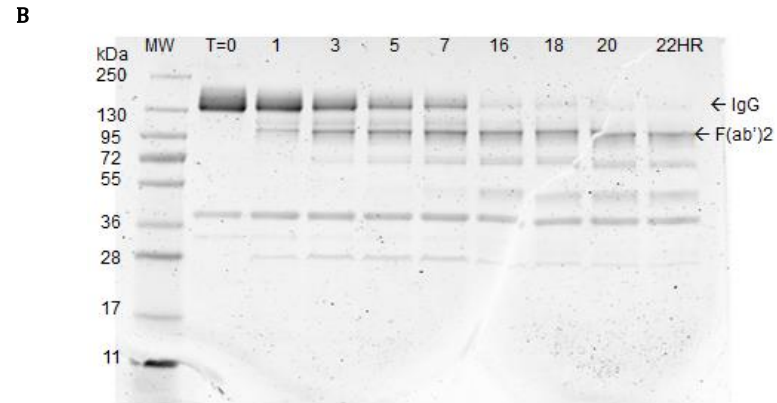
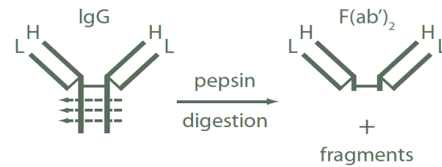


Figura 1.13. A: Esquema de acción de la pepsina sobre inmunoglobulina G. **B:** SDS-PAGE de Fragmentos de IgG después de una digestión limitada por la enzima pepsina en un estudio de curso de tiempo. La IgG y el fragmento F(ab')₂ resultante están marcados a la derecha. Fuente: <https://rockland-inc.com/antibody-fragmentation-services.aspx>.

•Agente coagulante en la fabricación de queso

•Extracción de colágeno

***Ensilado de pescado y salsa de pescado**

***Enzimas terapéuticas**

***Otras aplicaciones: caviar**

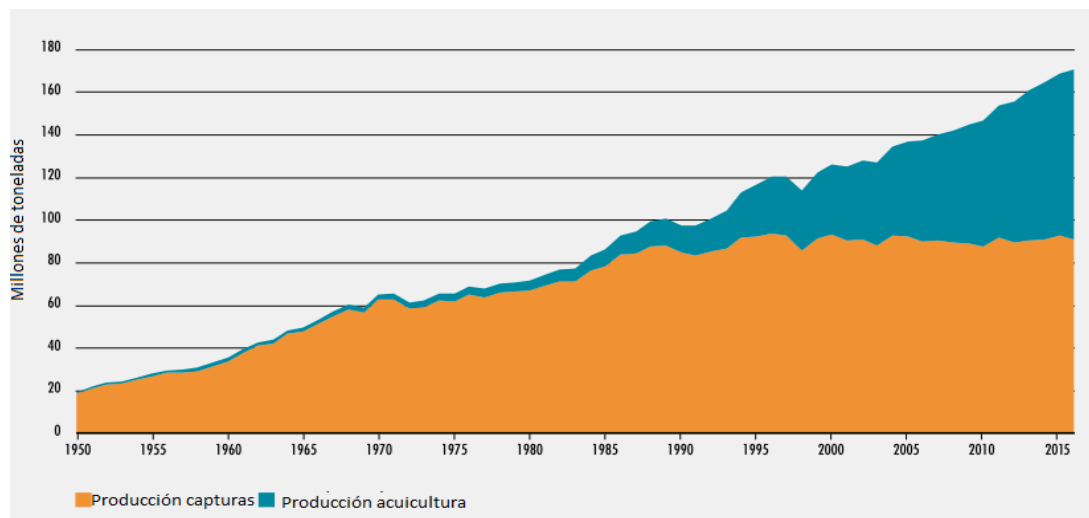


Figura 1.14. Producción de pesca de captura mundial y producción de acuicultura. Fuente: SOFIA 2018 – FAO

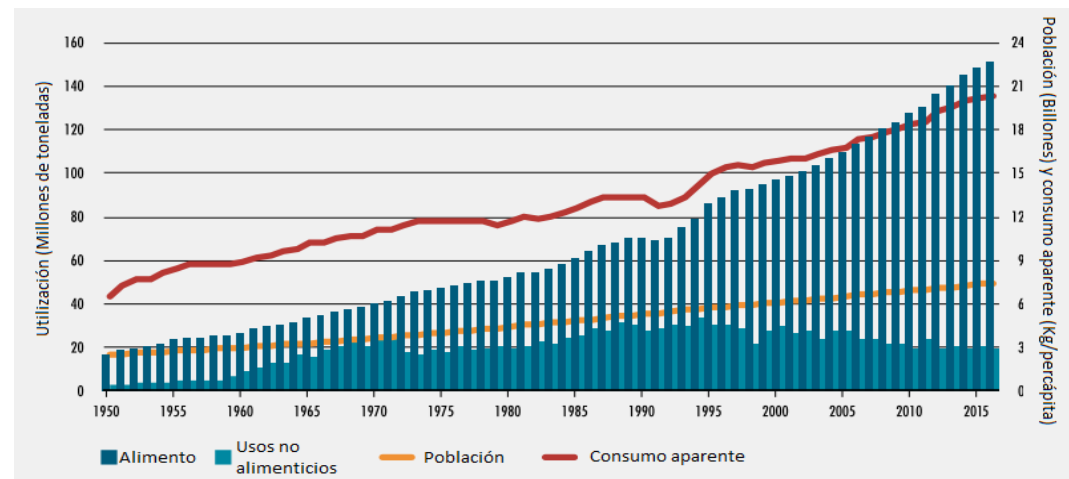


Figura 1.15. Utilización mundial del pescado y consumo aparente. Fuente: SOFIA 2018 – FAO.



Figura 1.16. *Prochilodus lineatus* - sábalo



Figura 1.18. Área de distribución del *Prochilodus lineatus*

DESCARTES

50-75% → fileteado - salazón y ahumado → 3,17 millones de ton/año

30-65% → enlatados → 1,5 millones de ton/año

Tabla 1.2. Compuestos de alto valor agregado encontrados en subproductos de la industria pesquera, precio de mercado y grado de pureza.

Productos	Fuente	Pureza (% P/P)	Valor del mercado (Euro/kg)
Ácidos grasos poliinsaturados (ω -3 y ω -6)	Algas, hígado de bacalao, aceite de caballa, residuos de carne de pescado	50-80% del hígado de bacalao, 23% son ω -3 PUFA	24 (como aceite purificado de hígado de bacalao)
Aminoácidos libres	Mejillones, almejas frescas, residuos de carne de pescado blanco, conchas de crustáceos	0.8-2% de taurina, 2.7% de creatina (en materia seca)	n.d.
Colágeno y gelatina	Piel, escamas y huesos de peces	Hasta 80% en piel, hasta 50% en escamas	9-14
Hidroxiapatita	Escamas y huesos de peces	60-70% en huesos, hasta 50% en escama	n.d.
Proteínas anticongelantes	Sangre y piel de peces	5-35 mg/mL en sangre de peces de agua fría	5.000
Enzimas	Vísceras de peces	-	14.000 (proteasas de bacalao)

n.d.: no disponible.

PUFA: ácidos grasos poliinsaturados ω -3 de cadena larga.

Fuente: Ferraro et al., 2010

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Valorizar la pesca y la piscicultura del sábalo en la región a través de la recuperación de proteasas digestivas, de alta aplicabilidad industrial, a partir de vísceras de desecho.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

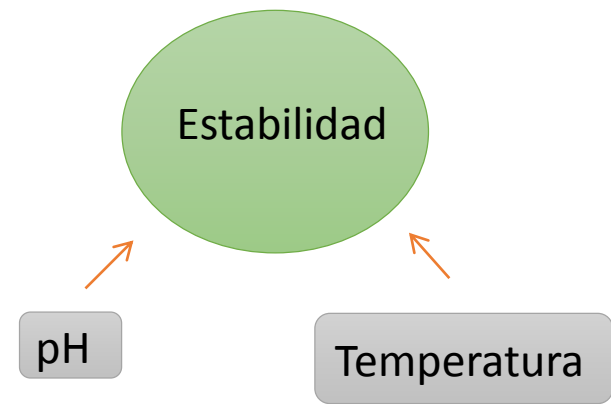
- Caracterizar el extracto crudo (EC) proveniente de las vísceras (mucosa gástrica) de sábalo (*Prochilodus lineatus*) en sus propiedades enzimáticas y cinéticas.
- Recuperar la enzima en un extracto, de pureza y concentración adecuada para uso industrial, mediante un proceso sencillo potencialmente escalable (EE).
- Aislar y purificar pepsina a partir de vísceras de sábalo (PS).
- Caracterizar la enzima aislada



Figura 1.16. *Prochilodus lineatus* - sábalo



Figura 4.1. Estómago de *Prochilodus lineatus*. Flecha señala la mucosa.



Actividad

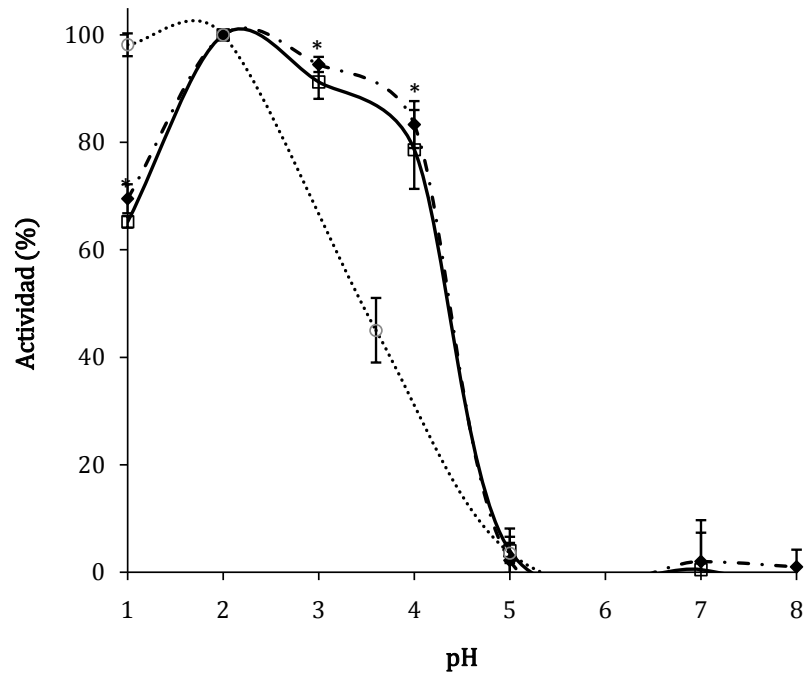


Figura 4.4. Efecto del pH sobre la actividad enzimática. Sobre el extracto crudo (EC) (◆), extracto enzimático (EE) (◻) y pepsina porcina (PP) (⊖) con hemoglobina ácida a 37°C. Las barras representan la media \pm DS (n=3). * $p < 0.05$: EC y EE versus PP; † $p < 0.05$: EC versus EE.

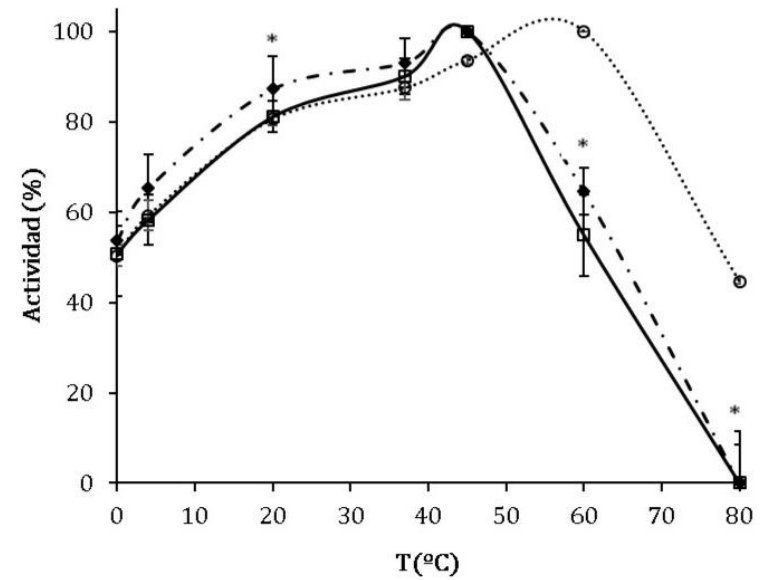


Figura 4.5. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática. Sobre el extracto crudo (EC) (◆), extracto enzimático (EE) (◻) y pepsina porcina (PP) (⊖) con hemoglobina ácida a pH 2. Las barras representan la media \pm DS (n=3). * $p < 0.05$: EC y EE versus PP; † $p < 0.05$: EC versus EE.

Actividad

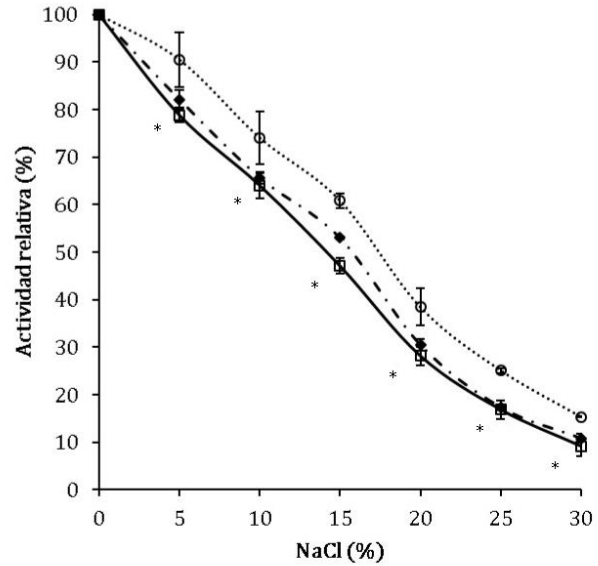


Figura 4.6. Efecto del NaCl sobre la actividad enzimática. Sobre el extracto crudo (♦), extracto enzimático (◻) y pepsina porcina (◉) con hemoglobina ácida pH 2 a 37°C. Las barras representan la media \pm DS (n=3). * $p < 0.05$: EC y EE versus PP; + $p < 0.05$: EC versus EE.

Tabla 4.1. Efecto de inhibidores y activadores en los extractos de sábalo y la pepsina porcina.

	Concentración	Actividad relativa (%) ^a		
		Extracto crudo	Extracto enzimático	Pepsina porcina
Control		100	100	100
MgCl ₂	1 mM	106,47 \pm 1,86	108,35 \pm 3,84	109,92 \pm 4,01
	5 mM	108,35 \pm 1,13	109,47 \pm 2,66	111,07 \pm 1,86
CaCl ₂	1 mM	105,43 \pm 1,76	108,12 \pm 2,63	105,65 \pm 1,79
	5 mM	106,75 \pm 5,23	107,16 \pm 1,96	110,78 \pm 1,80
Pepstatina A	10 μ M	3,57 \pm 1,58*	2,42 \pm 0,26*	ND
EDTA	2 mM	75,73 \pm 3,08*	77,77 \pm 6,30*	96,12 \pm 1,69
PMSF	1 mM	99,37 \pm 1,92	100,39 \pm 0,18	100,30 \pm 0,14
SDS	0,005% (P/V)	72,49 \pm 5,32*	74,28 \pm 3,27*	93,55 \pm 2,71
	0,1% (P/V)	60,15 \pm 2,91*	56,39 \pm 5,73*	81,52 \pm 1,16

^a Estos valores representan la media \pm DS (n=3), ND: no detectable.

* $p < 0.05$: EC y EE versus PP; + $p < 0.05$: EC versus EE

Actividad

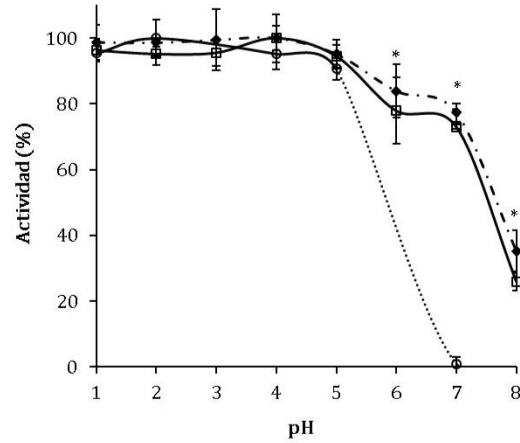


Figura 4.7. Efecto del pH sobre la estabilidad enzimática. Sobre el extracto crudo (◆), extracto enzimático (◻) y pepsina porcina (◐) con hemoglobina ácida a 37°C. Las barras representan la media \pm DS (n=3). * $p < 0.05$: EC y EE versus PP; † $p < 0.05$: EC versus EE.

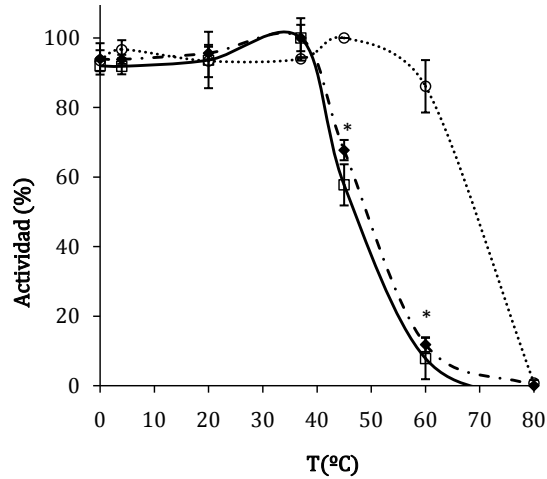


Figura 4.8. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática. Sobre el extracto crudo (◆), extracto enzimático (◻) y pepsina porcina (◐) con hemoglobina ácida a pH 2. Las barras representan la media \pm DS (n=3). * $p < 0.05$: EC y EE versus PP; † $p < 0.05$: EC versus EE.

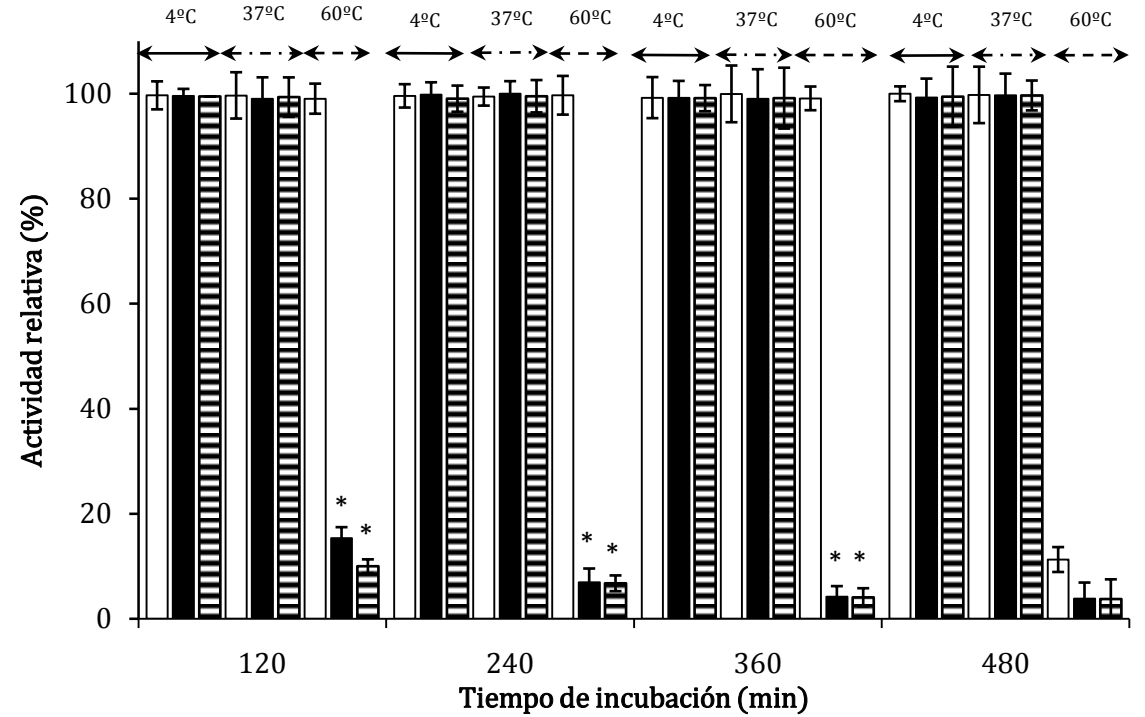



Figura 4.9. Efecto del tiempo sobre la estabilidad enzimática. Sobre la pepsina porcina (◻), el extracto crudo (■), extracto enzimático (◻) con hemoglobina ácida a pH 2 a 37°C. Las barras representan la media \pm DS (n=3). * $p < 0.05$: EC y EE versus PP; † $p < 0.05$: EC versus EE.



Ensayos de uso industrial

- 
- ✓ Recuperación de placas radiográficas
 - ✓ Actividad coagulante de la leche
 - ✓ Hidrólisis de colágeno
 - ✓ Hidrólisis de inmunoglobulinas
 - ✓ Obtención de colágeno de la piel de sáballo

✓ Recuperación de placas radiográficas

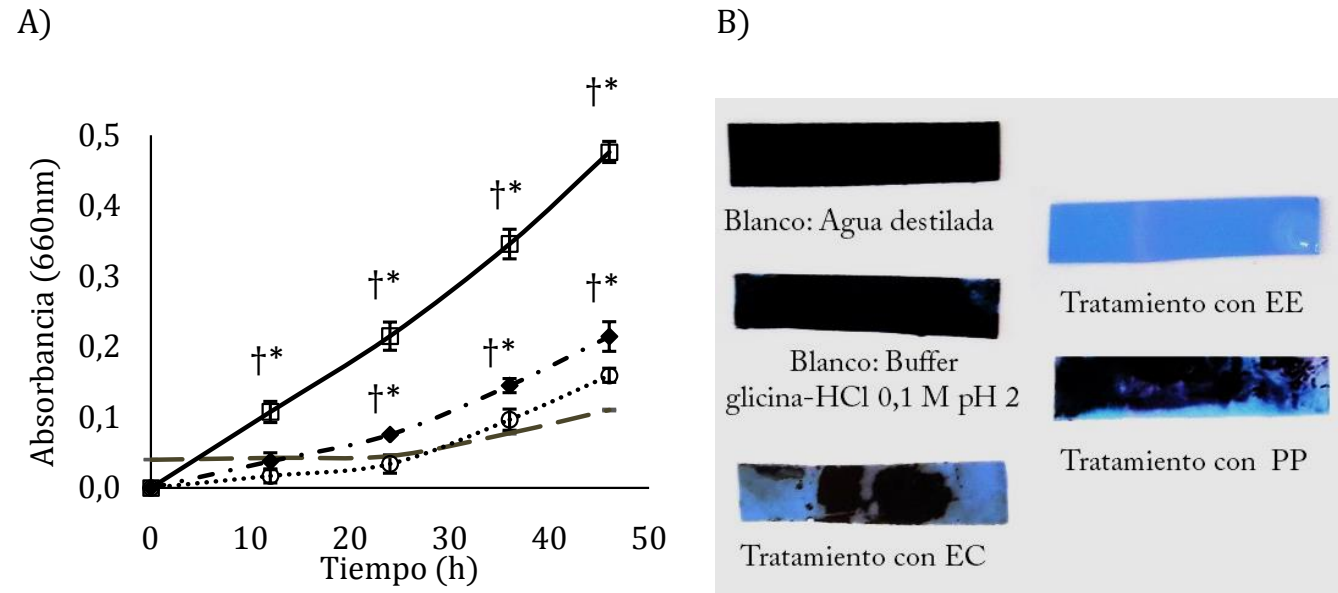


Figura 4.10. Hidrólisis de la gelatina de las placas fotográficas. A) Incremento neto de la turbidez de las soluciones de extracto crudo (◆), extracto enzimático (⊞), pepsina porcina (⊕) y buffer glicina-HCl 0,1 M (- -) a pH 2 y 40°C. Las barras representan la media \pm DS (n=3). * $p < 0.05$: EC y EE *versus* PP; † $p < 0.05$: EC *versus* EE. B) Imagen de las placas fotográficas al final del tratamiento.

✓ Actividad coagulante de la leche

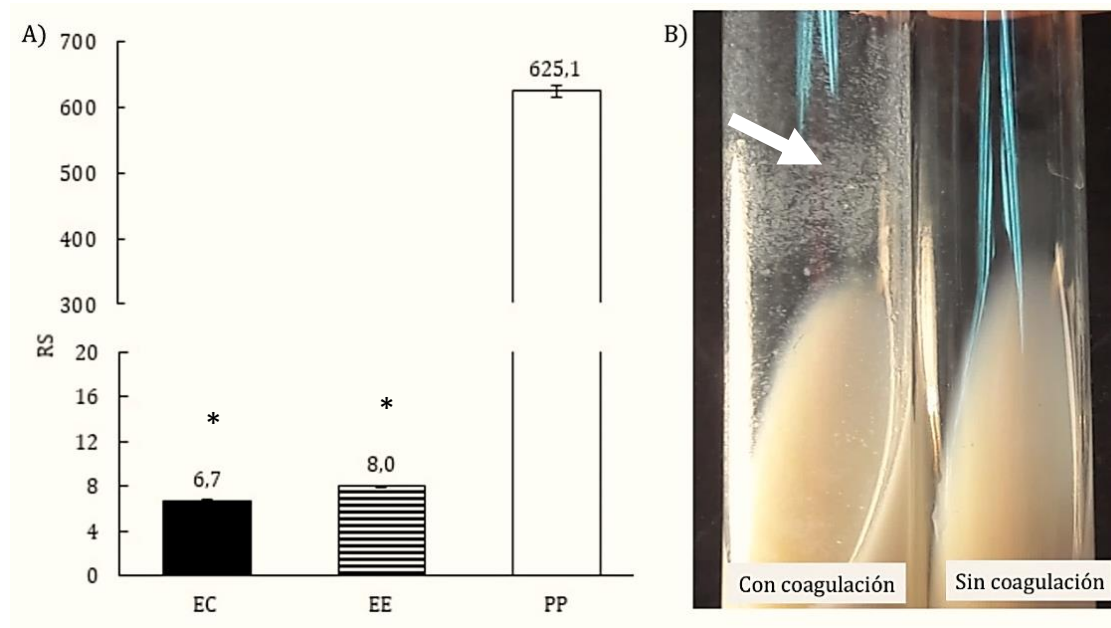


Figura 4.11. Actividad coagulante de la leche. A) Fuerza del cuajo (RS) de la pepsina porcina (□), el extracto crudo (■), extracto enzimático (≡) a pH 5, a 37°C. Las barras representan la media \pm DS (n=3). * $p < 0.05$: EC y EE *versus* PP. B) Fotografía de tubos conteniendo leche, la presencia de flóculos en las paredes del tubo indica coagulación (flecha).

✓ Hidrólisis de colágeno

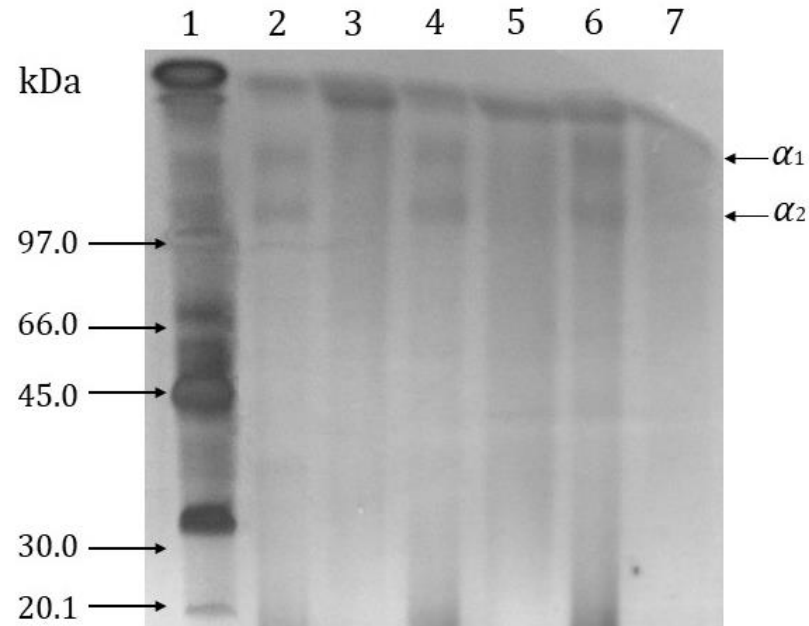
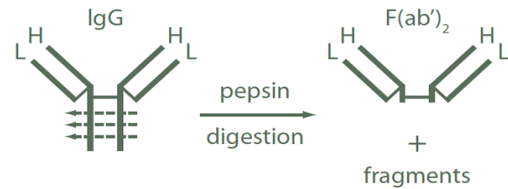


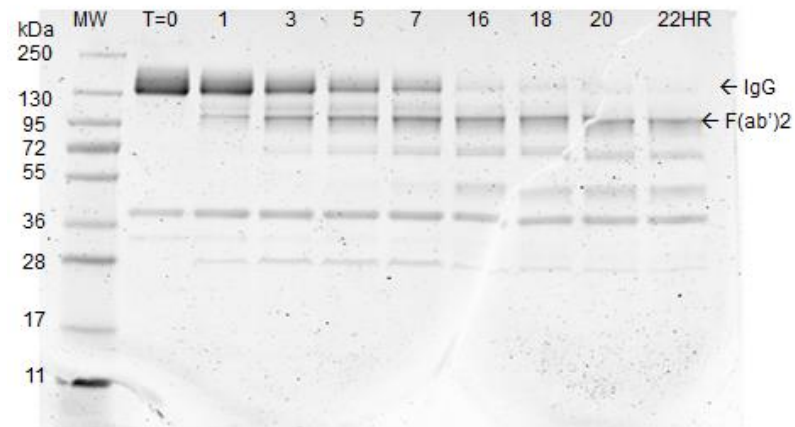
Figura 4.12. Hidrólisis del colágeno tipo I de cola de rata por acción de EC, EE y EP. Calle 1: marcadores de masa molecular (en kDa): fosforilasa (97); albúmina de suero bovino (66); ovoalbúmina (45); anhidrasa carbónica (30); inhibidor de tripsina (20,1); α -lactoalbúmina (14,4). Calle 2: Colágeno control incubado con buffer 0,1 M glicina-HCl por 24h. Calle 3: Hidrólisis con EC por 24h. Calle 4: Colágeno control incubado con buffer 0,1 M glicina-HCl por 24h. Calle 5: Hidrólisis con EE por 24h. Calle 6: Colágeno control incubado con buffer 0,1 M glicina-HCl por 24h. Calle 7: Hidrólisis con PP por 24h.

✓ Hidrólisis de inmunoglobulinas

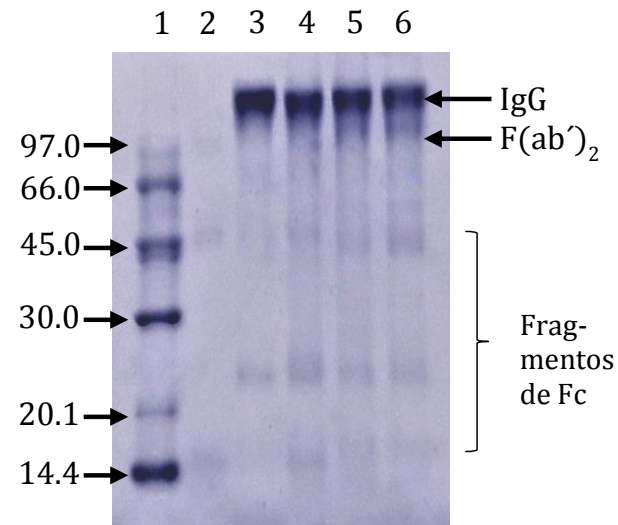
A



B



A)



B)

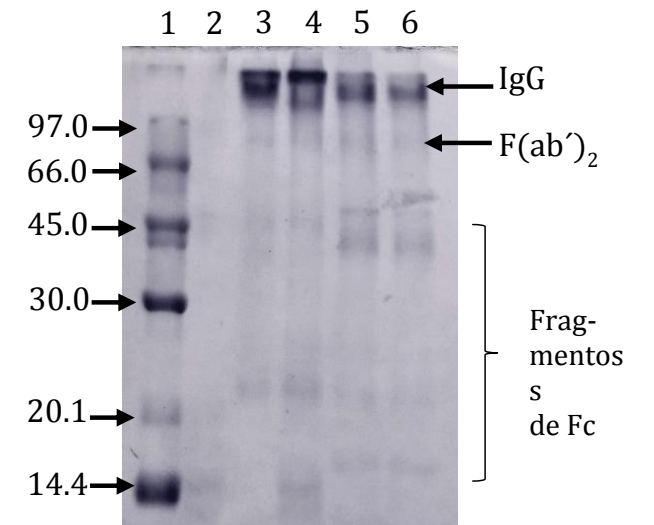


Figura 4.13. Hidrólisis de inmunoglobulinas. A) Tratamiento con EC. B) Tratamiento con EE. En ambas figuras se corresponde lo siguiente. Calle 1: marcadores de masa molecular (en kDa): fosforilasa (97); albúmina de suero bovino (66); ovoalbúmina (45); anhidrasa carbónica (30); inhibidor de tripsina (20,1); α -lactoalbúmina (14,4). Calle 2: EC o EE; Calle 3: IgG incubada con buffer 0,1M glicina-HCl por 48h. Calle 4: digestión a tiempo 0 h. Calle 5: digestión a tiempo 24 h. Calle 6: digestión a tiempo 48h.

Figura 1.13. A) Esquema de acción de la pepsina sobre inmunoglobulina G. B) SDS-PAGE de Fragmentos de IgG después de una digestión limitada por la enzima pepsina en un estudio de curso de tiempo. La IgG y el fragmento F(ab')₂ resultante están marcados a la derecha. Fuente: <https://rockland-inc.com/antibody-fragmentation-services.aspx>.

✓ Obtención de colágeno de la piel de sábalo

Tabla 4.2. Composición de la piel de sábalo en base húmeda

	Composición % -base húmeda (g/100g piel)				Hidroxiprolina (mg/g piel)
	Humedad	Proteína	Grasa	Ceniza	
Piel de Sábalo	52,54±0,94	12,82±0,11	28,12±1,49	5,51± 0,09	3,48± 0,49

Los valores representan la media ± DS (n=3).

Tabla 4.3. Rendimiento del colágeno extraído de la piel de sábalo en base húmeda

Muestra	Hidroxiprolina (mg/g piel) ^A	Colágeno (mg/g piel)	Rendimiento (%)
ASC	0,53 ± 0,06 ^a	4,21 ± 0,49 ^a	14,92 ± 1,74 ^a
PSC	0,62 ± 0,09 ^b	4,99 ± 0,75 ^b	17,70 ± 2,65 ^b
ECSC	0,61 ± 0,01 ^b	4,89 ± 0,10 ^b	17,35 ± 0,34 ^b
EESC	0,89 ± 0,05 ^c	7,13 ± 0,41 ^c	25,29 ± 1,44 ^c

Los valores representan la media ± DS (n=3). ^A El factor de conversión de hidroxiprolina a colágeno utilizado fue 8, considerando que el 12,5% del colágeno es Hyp (Reddy & Enwemeka, 1996). ^{a,b,c} Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la misma columna ($p < 0,05$).

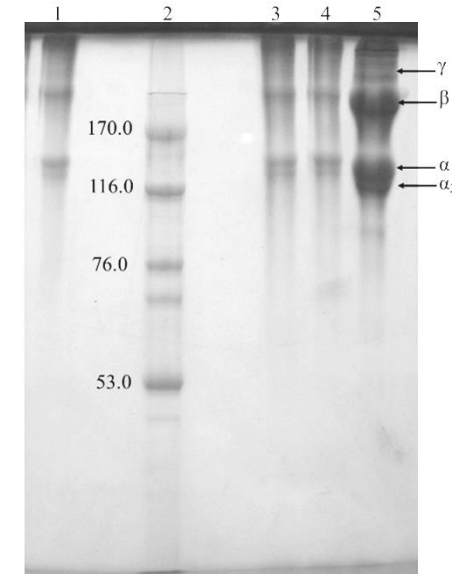


Figura 4.14. SDS-PAGE de colágeno obtenido de piel de sábalo por tratamiento ácido y con adición de EC, EE y PP. Calle 1: ASC- colágeno soluble obtenido solo con ácido. Calle 2: marcadores de masa molecular (en kDa): α -macroglobulina (170 kDa); β -galactosidasa (116 kDa); transferrina (76 kDa); glutamato deshidrogenasa (53 kDa). Calle 3: PSC- colágeno soluble obtenido con adición de pepsina porcina. Calle 4: ECSC- colágeno soluble obtenido con adición de extracto crudo. Calle 5: EESC- colágeno soluble obtenido con adición de extracto enzimático.



Digestive aspartic proteases from sábalo (*Prochilodus lineatus*): Characterization and application for collagen extraction



Antonella Valeria Acevedo Gomez^{a,b}, Gabriela Gomez^b, Ester Chamorro^a, Soledad Bustillo^b,
Laura Cristina Leiva^{b,*}

^a Centro de Investigación en Química Orgánica-Biológica (QUIMOBIO), IMIT, UNNE, CONICET, FACENA (UTN-FRRE French N°414), 3500 Resistencia, Argentina

^b Laboratorio de Investigación en Proteínas (LabinPro), IQUIBA-NEA, UNNE, CONICET, FACENA (Campus "Deodoro Roca" Av. Libertad N°5460), 3400 Corrientes, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

Acidic protease

Stomach

Collagen

Sábalo (*Prochilodus lineatus*)

Chemical compounds studied in this article:

Acetic acid (PubChem CID: 176)

Butyl alcohol (PubChem CID: 263)

Hydrochloric acid (PubChem CID: 313)

Glycine (PubChem CID: 750)

Methanol (PubChem CID: 887)

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PubChem CID:

4784)

Sodium chloride (PubChem CID: 5234)

Ethylenediaminetetraacetic acid (PubChem

CID: 6049)

Sodium hydroxide (PubChem CID: 14798)

Sodium dodecyl sulfate (PubChem CID:

3423265)

ABSTRACT

Acid proteases from sábalo stomach mucosa were recovered using salting-out procedure. This single step produced an enzyme extract purified 1.8-fold over the crude extract with a recovery of 45.1% of its initial proteolytic activity. Sábalo proteases exhibited the highest activity at 45 °C-pH 2.0, showed pH stability between 2.0 and 5.0 and retained more than 70% of its activity after incubation at pH 7.0 for 2 h. Fish extract was unstable at temperatures greater than 45 °C. Its activity was inhibited by pepstatin A but not by PMSF, while EDTA and SDS showed partial inhibitory effects. Presence of CaCl₂ and MgCl₂ increased the proteolytic activity, while increasing concentrations of NaCl strongly decreased it. In addition, compared to the acid extraction method, the use of sábalo enzymatic extract increased 1.7 times the yield of collagen extraction.

Obtención y caracterización de
la pepsina de sábalo



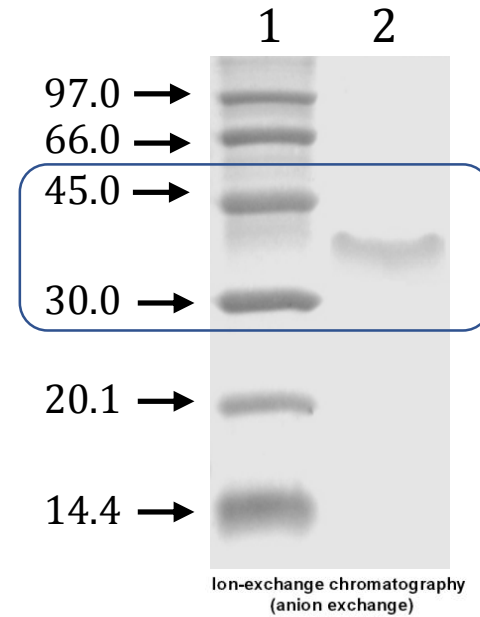
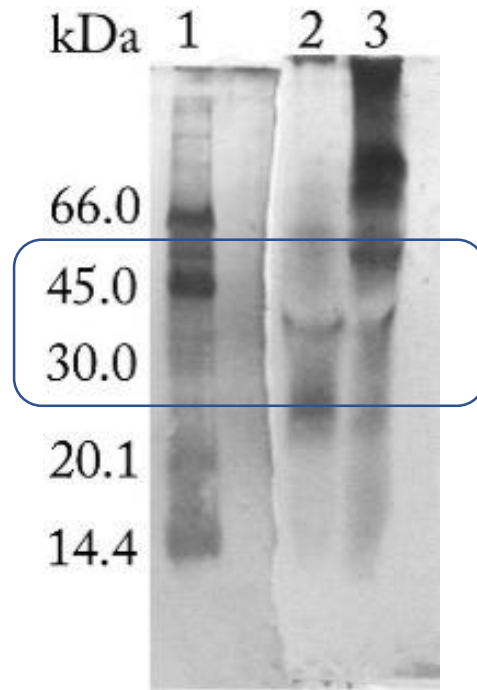
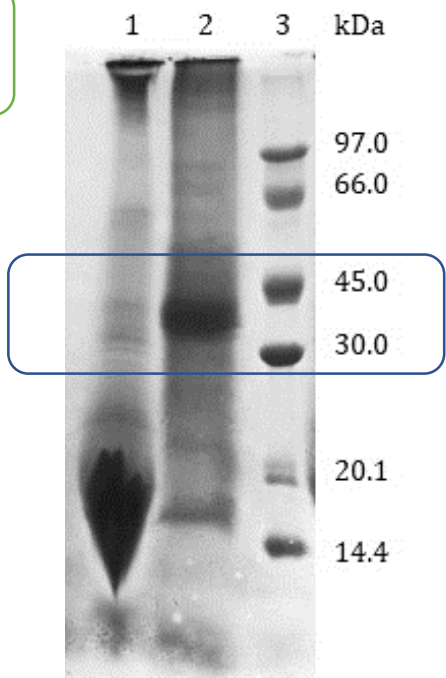
Aislamiento de la pepsina



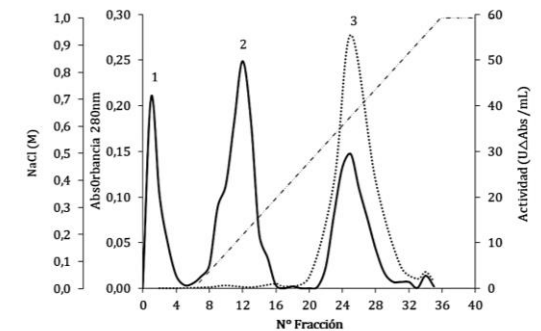
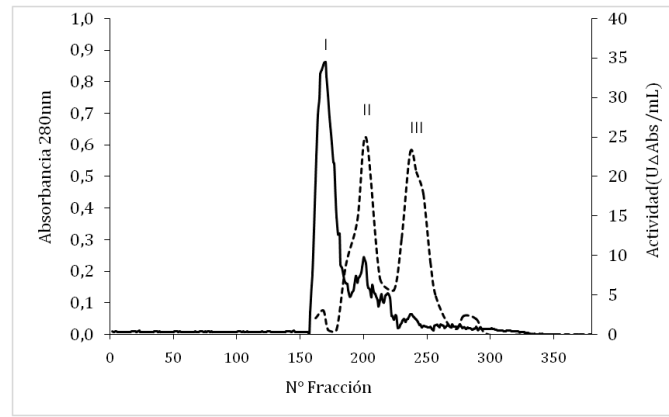
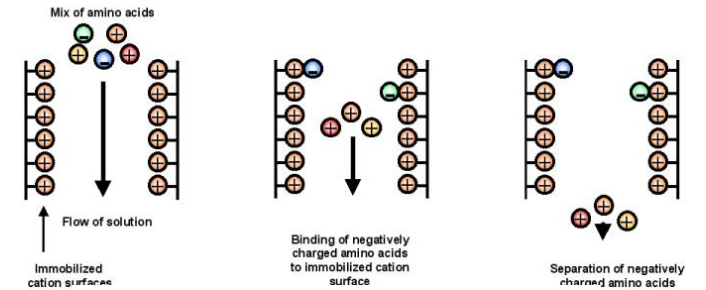
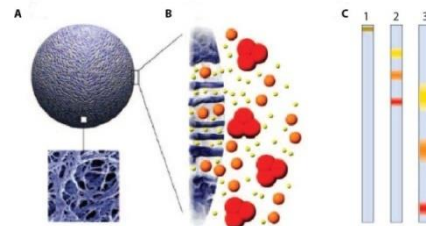
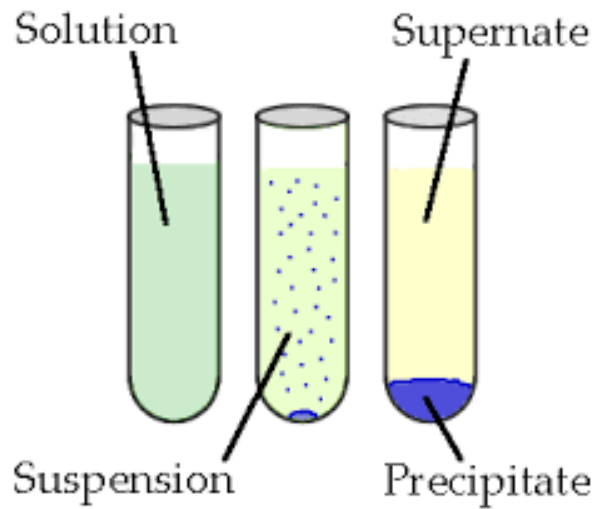
Caracterización de la pepsina

- Inhibición con pepstatina A
- Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad
- Obtención de colágeno

Aislamiento de la pepsina



Ion-exchange chromatography (anion exchange)



Aislamiento de la pepsina

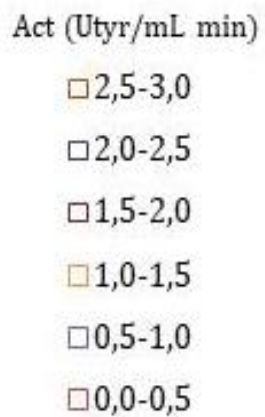
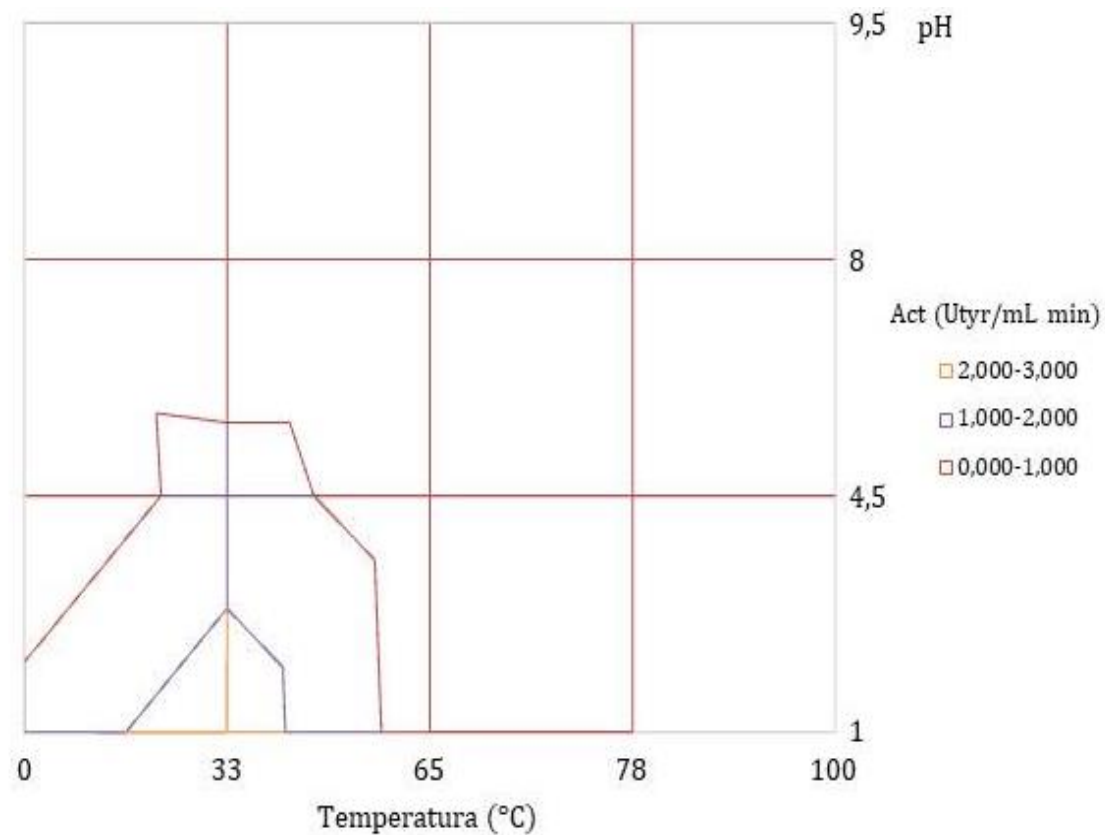
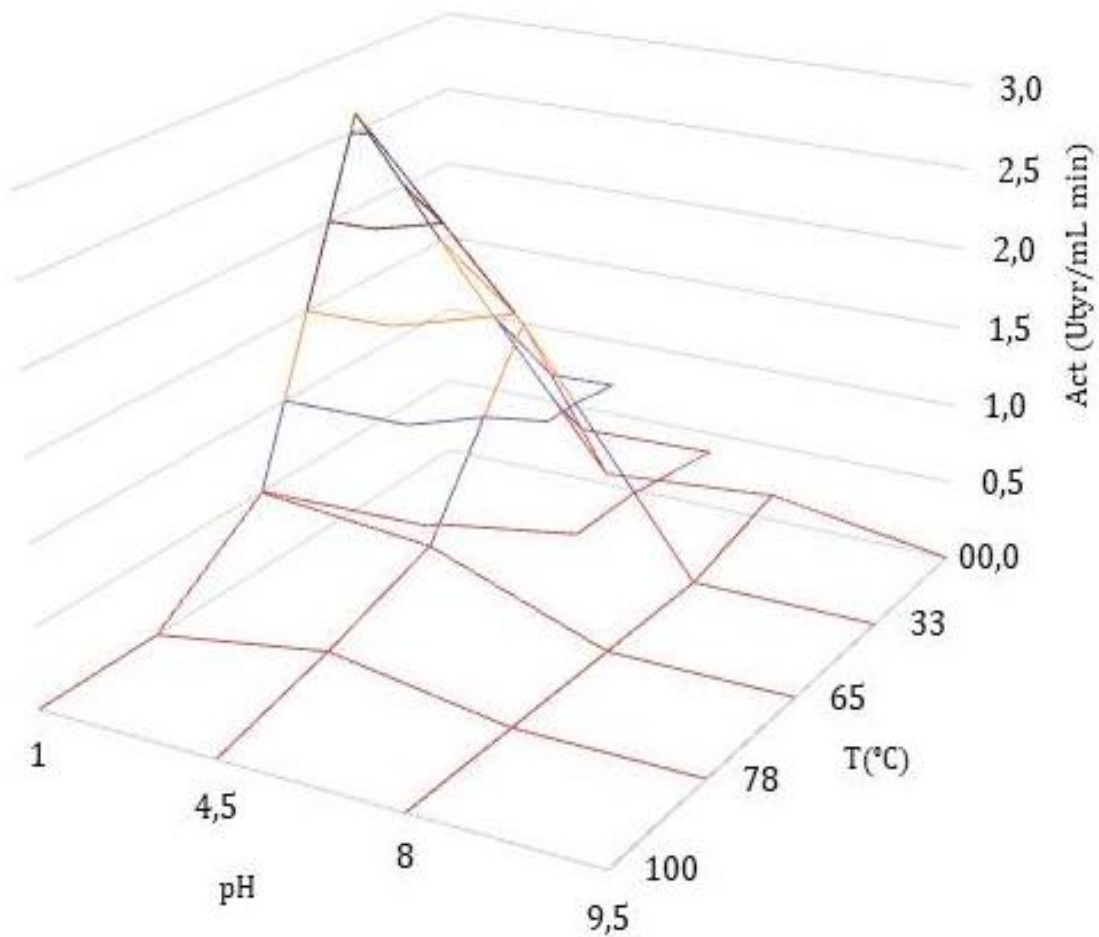
Tabla 4.4. Purificación de pepsina de sábalo. Rendimiento

Etapa de Purificación	Volumen Total (mL)	Actividad Total (U _{ΔAbs})	Proteína Total (mg)	Actividad específica (U _{ΔAbs} /mg)	Rendimiento (%)	FP* (veces)
EC	310	2716	62,60	43,4	100	1
EE (NH ₄) ₂ SO ₄	236	1224	15,74	77,8	45,1	1,8
SP G-75 II	4,8	319	3,97	80,4	11,7	1,9
SP G-75 III	7,0	289	1,15	251,3	10,6	5,8
DEAE	8,0	208	0,38	547,4	7,7	12,6

* FP, Factor de purificación.

Se preparó EC. a partir de 60 estómagos de sábalos, que representan una masa de 1,3 Kg de víscera inicial, 73 g de mucosa gástrica, que rinden 63 mg de proteína inicial.

Caracterización de la pepsina



Caracterización de la pepsina

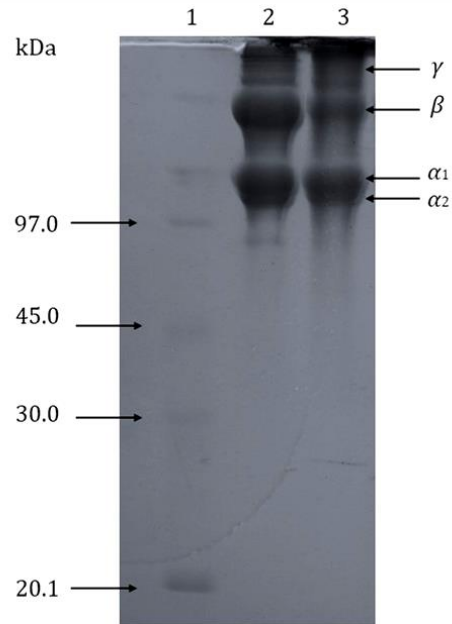


Figura 4.20. SDS-PAGE de colágeno obtenido de piel de sábalo por tratamiento ácido y con adición de PP y PS. Calle 1: marcadores de masa molecular (en kDa): fosforilasa (97); ovoalbúmina (45); anhidrasa carbónica (30); inhibidor de tripsina (20,1). Calle 2: PSPC- colágeno soluble en ácido con la adición de pepsina de sábalo. Calle 3: PSC- colágeno soluble en ácido con la adición de pepsina porcina.

Tabla 4.5. Rendimiento del colágeno extraído de la piel de sábalo en base húmeda por tratamiento ácido con la adición de PP y PS

Muestra	Hidroxi-prolina (mg/g piel) ^A	Colágeno (mg/g piel)	Rendimiento (%)
PSC	0,78 ± 0,13 ^a	6,22 ± 1,00 ^a	19,9 ± 3,20 ^a
PSSC	1,13 ± 0,35 ^b	9,01 ± 2,77 ^b	28,9 ± 8,90 ^b

Los valores representan la media ± DS (n=3). ^A El factor de conversión de hidroxiprolina a colágeno utilizado fue 8, considerando que el 12,5% del colágeno es Hyp (G. Kesava Reddy & Enwemeka, 1996). ^{a,b,c} Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la misma columna ($p < 0,05$).

Conclusiones finales

Tanto la pepsina aislada como los extractos reúnen propiedades atractivas para su uso industrial, principalmente en la extracción de colágeno de la propia piel del sábalo.

Este pescado, el cual representa el 50-90% de la biomasa total de peces en la cuenca del río Paraná, y entre el 75-85% de las capturas totales de la pesca artesanal, tiene un bajo nivel de pepsina, no obstante, la simplicidad de preparación del extracto rico en esta enzima, vuelve de interés el aprovechamiento de su víscera.

Teniendo en cuenta el impacto económico del sábalo en las pesquerías de América del Sur, el uso de su piel para la extracción de colágeno utilizando un extracto de enzimático estomacal del mismo pez es una opción atractiva para la región, a pesar del hecho de que la piel del sábalo tiene una baja cantidad de colágeno. Esta opción podría representar un doble beneficio: económico y ambiental, al generar valor agregado a un residuo cuya disposición final causa polución.