



El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

**Efecto de la Mutación A233N en los Parámetros Bioquímicos
y Termodinámicos de Tripsina III de Sardina Monterey
(*Sardinops sagax caerulea*)**

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Presenta:

M.C. Manuel Ignacio Carretas Valdez

Hermosillo, Sonora

Noviembre de 2018

RESUMEN

Las tripsinas son enzimas que pertenecen al grupo de las serina proteasas y tienen la función de hidrolizar péptidos, reconociendo en forma específica a residuos de aminoácidos básicos como lisina y arginina. Las tripsinas de peces, como la sardina Monterey, se caracterizan por poseer una mayor eficiencia catalítica a bajas temperaturas y una menor estabilidad térmica. Las tripsinas de peces se clasifican en tres isoformas (I, II y III) y se diferencian de acuerdo a su secuencia de aminoácidos. Las tripsinas III contienen menos residuos polares, más residuos hidrofóbicos y aromáticos, lo cual les confiere una mayor flexibilidad estructural a bajas temperaturas.

En este trabajo, se realizó una de mutante dirigida A233N en la estructura de la tripsina III recombinante de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) para obtener información acerca de la relación estructura-función de la enzima en los mecanismos de adaptación al frío. Las tripsinas III silvestre y mutante A233N de sardina Monterey se obtuvieron en su forma soluble y activa con alto grado de purificación, presentando pesos moleculares de alrededor 24 kDa. De acuerdo a la caracterización bioquímica de las tripsinas III de sardina, la enzima silvestre exhibió valores de K_M y k_{cat} para BAEE de $0.11 \text{ mM} \pm 0.03$ y 3.35 ± 0.08 respectivamente, mientras que la enzima mutante A233N mostró valores de K_M y k_{cat} de 0.14 ± 0.01 y 3.11 ± 0.09 , respectivamente.

Al determinar las energías de activación para ambas tripsinas III, se encontró un valor mayor para la tripsina III mutante (54.5 ± 3.5) respecto a la tripsina III silvestre (42.3 ± 1.9). Al comparar los parámetros termodinámicos de ambas enzimas, se encontraron valores muy semejantes para ΔG^* para tripsina III silvestre (71.42 ± 0.07) y para tripsina III A233N (71.23 ± 0.06). En cuanto al ΔH^* , la tripsina silvestre mostró un valor menor (39.78 ± 1.97) al compararlo con la tripsina III mutante A233N (51.97 ± 3.53), lo que significa que la mutación A233N incrementa la barrera energética de la reacción. Por último, la tripsina III silvestre presentó un valor mayor (31.45 ± 2.03) de $-\Delta TS^*$ al ser comparado con la enzima mutante (19.44 ± 3.6), lo que puede significar un número mayor de estados conformacionales

entre enzima y sustrato. Por otro lado, la temperatura óptima de ambas tripsinas III fue de 30 °C, sin embargo, a temperaturas elevadas la tripsina A233N presentó mayor porcentaje de actividad en contraparte con la enzima silvestre, lo que podría representar un ligero incremento en su estabilidad respecto a la temperatura.

El cambio de un residuo hidrofóbico (alanina) por un residuo polar (asparagina) en la alfa hélice del C- terminal en la estructura de la tripsina de sardina Monterey afecta las propiedades bioquímicas y termodinámicas respecto a la enzima silvestre, posiblemente al modificar la red de puentes de hidrógenos. Las características bioquímicas y termodinámicas de tripsinas de *S. sagax caerulea* silvestre y mutante A233N son interesantes desde una perspectiva tecnológica, especialmente en procesos industriales que se realicen a temperaturas moderadas de aproximadamente 30 °C.