

INMOVILIZACION DE PAPAINA POR ATRAPAMIENTO

FERNANDO ZAUSCHER VERGARA

Químico, Ph D.

Profesor Asociado UIS

ELIZABETH MURILLO

Química, M. So.

Profesora Universidad del Tolima

RESUMEN

Se desarrolló un método de fácil aplicación para inmovilizar la papaína por atrapamiento en biopolímeros entrecruzados insolubles en agua. Se determinaron las condiciones óptimas de trabajo de la enzima inmovilizada con cuatro soportes diferentes y se estableció que la retención de la actividad proteolítica es del orden del 50%. La aplicación de los sistemas estudiados para la clarificación de cerveza, dio resultados satisfactorios.

INTRODUCCION

Avances recientes en la tecnología enzimática han permitido inmovilizar una enzima a un soporte sólido, utilizando técnicas tales como el atrapamiento, la adsorción o el enlace covalente (1,2). Como consecuencia de esta técnica se han modificado drásticamente los procesos enzimáticos, puesto que la enzima al permanecer unida al soporte insoluble puede recuperarse al final del proceso o puede ser usada en forma continua.

La utilidad de la inmovilización enzimática se incrementa cuando el método utilizado es simple y efectivo y permite lograr fácilmente la remoción de la enzima de la mezcla final de la reacción. Además el portador debe ser resistente a las tensiones mecánicas para facilitar su adaptación en una columna empacada con el soporte sólido.

La papaína es una enzima proteolítica cuya molécula elipsoidal está compuesta por dos partes unidas por puentes de hidrógeno y efectos electrónicos e hidrofóbicos. Cada una de estas dos partes de la molécula contienen aproximadamente 100 residuos de aminoácidos. El centro activo de la enzima se encuentra situado entre estas dos partes y contiene tres grupos ionizables (Cis 25, Asp 158

e His 159) (3).

El objetivo de este trabajo consiste en inmovilizar la papaína por atrapamiento utilizando como soportes biopolímeros entrecruzados insolubles en agua, tales como: agar, agarosa, poliacrilamida y K-carragenina. Se determina la actividad de la enzima libre y de la enzima inmovilizada con cada soporte, se reporta el efecto del pH y de la temperatura sobre la actividad de la enzima y se efectúa un estudio cinético utilizando caseína como sustrato.

Finalmente se aplica la papaína en el proceso industrial de clarificación de cerveza con el objeto de conocer la efectividad de los métodos de inmovilización estudiados. Esta aplicación se hizo por cochadas y en forma continua.

MATERIALES Y METODOS

La papaína utilizada fue suministrada por Miles Internacional Co. de Cali. El agar, la agarosa, la K-carragenina y la caseína eran marca Sigma Chemical Co. La acrilamida, la bisacrilamida, el persulfato de amonio, la tetrametildiamida (TEMED) y el Tritón X-100 eran marca Merck (Reactivos de alta pureza). Otros reactivos usados en este trabajo fueron: cloruro de potasio, cloruro de sodio, Acido etilen diamino tetra-acético (EDTA), L-cisteína-HCl.H₂O, buffer tris-HCL 0,05M pH 5,5-9,0.

El agar es un coloide de naturaleza hidrofílica proveniente de algas marinas rojas, que se utilizó en forma de polvo translúcido, ligeramente amarillo.

La agarosa es un polisacárido lineal que tenía las siguientes características: contenido de sulfato, 0,35%; punto de gelificación, 36 °C y electroendósmosis, 0,16-0,19.

La K-carragenina es un polisacárido obtenido a partir de algas rojas, con peso molecular entre 100.000 y 800.000 y contenido de Ester sulfato entre el 20 y 30% del peso unidad.

El procedimiento general utilizado para inmovilizar la enzima con agar, agarosa y K-carragenina está esquematizado en la Figura 1. En el caso del agar y la agarosa, el sistema consta de una fase acuosa y de una fase inerte hidrofóbica. La mezcla de una solución acuosa de la enzima

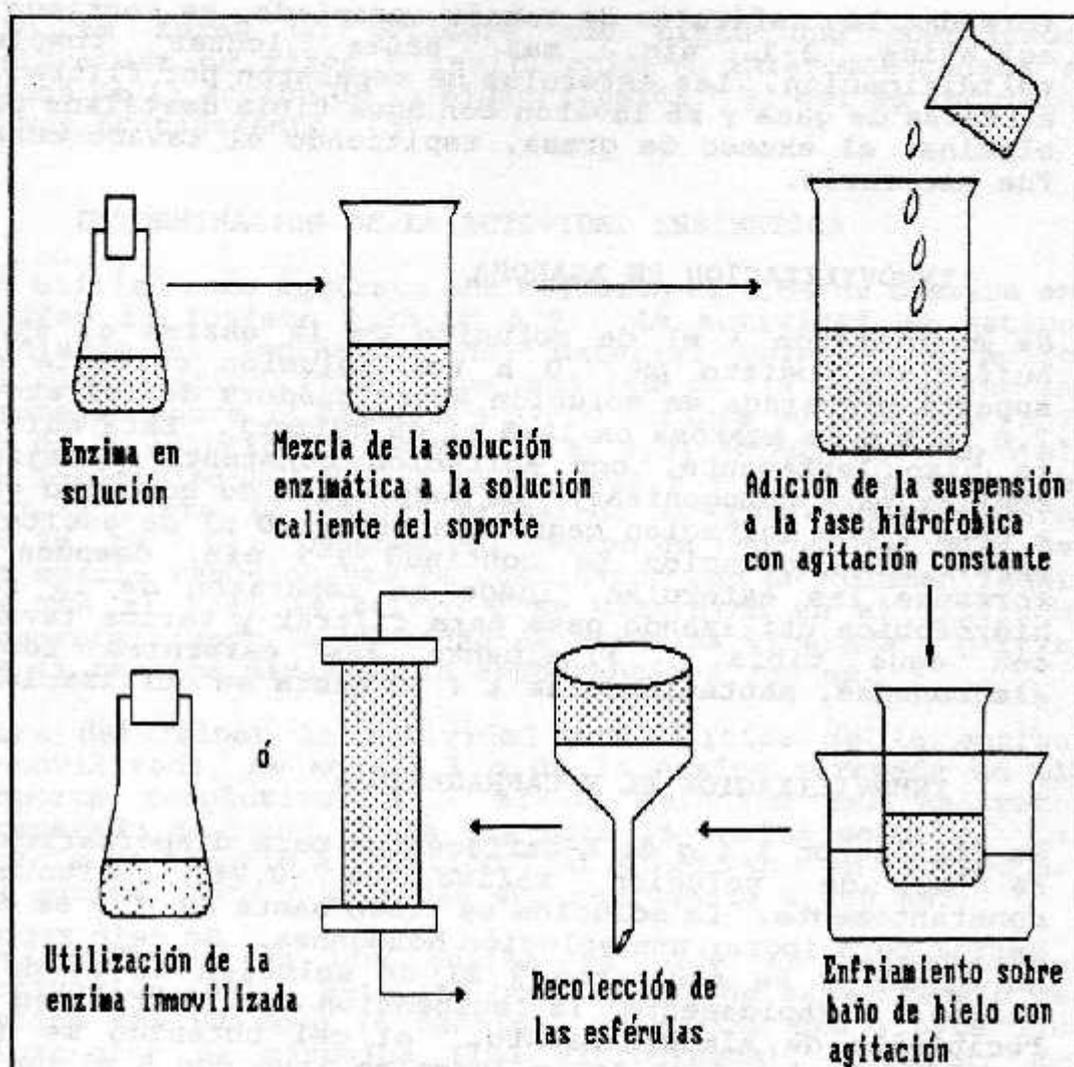


Figura 1. Diagrama esquemático de la obtención de las esférulas.

y del coloide preparados separadamente, se adicionó sobre la fase hidrofóbica bajo agitación.

INMOVILIZACION EN AGAR

Se preparó una solución acuosa al 4% de agar. Esta solución se preparó en caliente y con agitación constante, dejando ebullición hasta lograr homogenización total. Se dejó enfriar 3-4 minutos y se agregó 1,5 ml de solución de la enzima al 4% preparada en buffer de fosfato pH 7,0. La suspensión se dispersó gota a gota y mediante agitación magnética en la fase hidrofóbica (40 ml. de aceite de soya). Una vez

formadas las esférulas de tamaño apropiado, se continuó la agitación 2-3 min. más hasta lograr completa solidificación. Las esférulas se separaron por filtración a través de gasa y se lavaron con agua tibia destilada para eliminar el exceso de grasa, repitiendo el lavado cuando fue necesario.

INMOVILIZACIÓN EN AGAROSA

Se adicionaron 3 ml de solución de la enzima al 4% en buffer de fosfato pH 7,0 a una solución caliente del soporte preparada en solución amortiguadora de fosfato pH 7,0 (0,5 g de agarosa en 12,5 ml de buffer). Esta adición se hizo lentamente, con agitación constante y dejando ebullición para homogenizar. La suspensión se adicionó gota a gota y con agitación magnética sobre 40 ml de aceite de soya. La agitación se continuó 2-3 min. después de formadas las esférulas, luego se separaron de la fase hidrofóbica utilizando gasa para filtrar y varios lavados con agua tibia. Finalmente las esférulas fueron almacenadas, manteniéndolas a 4 °C hasta su utilización.

INMOVILIZACIÓN EN K-CARRAGENINA

Se utilizaron 3,4 g de K-carragenina para dispersarlos en 68 ml de solución salina al 0,9%, calentando constantemente. La solución se llevó hasta 80 °C y se dejó hervir para lograr una solución homogénea. Se dejó reposar un minuto y se agregaron 3 ml de solución al 4% de la enzima. Rápidamente la suspensión se vertió en el recipiente de almacenamiento. el gel obtenido se dejó enfriar 30 min. a 10 °C, y luego se lavó con 5 ml de KCl 0,3M para mejorar su estabilidad.

INMOVILIZACIÓN EN POLIACRILAMIDA

Inicialmente se preparó una solución stock del monómero mezclando 17,6 g de acrilamida y 1,2 g de N,N-metilen bisacrilamida disuelto en 100 ml de buffer Tris-HCl 0.005M pH 7,0.

Se tomaron 8 ml de la solución de monómero previamente preparado y se mezcló con 3 ml de solución de la enzima al 4% en buffer Tris-HCl 0.05M Ph 7,0. Se añadieron 20 ml (0,5 g/ml) de persulfato de amonio y 100 ml de TEMED para iniciar y controlar la polimerización. Al cabo de unos 30

min se forma un polímero que tiene una complicada estructura de rizos y ramificaciones interconectadas, a causa de la acción de la bisacrilamida. El gel es incoloro y muy transparente.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Se utilizó como sustrato una solución al 0,5% de caseína en buffer de fosfato 0,2M pH 7,0. La actividad se estimó midiendo el incremento del material soluble en ácido tricloroacético (TCA), que resulta de la acción de la proteasa sobre la caseína a 37 °C durante 30 minutos. A 7 ml de la solución del sustrato al 0,5% se adicionaron 5 ml de L-cisteína-HCl.H₂O, 1 ml de EDTA y 1 ml de solución de enzima libre (2 mg/ml) preparada en buffer de fosfato (0,2M, pH 7,0). Después del tiempo de incubación, 5 ml de la mezcla reaccionante se combinaron con un volumen igual de TCA al 10%; se filtró y se determinó en el filtrado desproteinizado la cantidad de tirosina liberada a partir de la caseína midiendo la absorvancia a 280 nm.

Para determinar la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada, se agregó 1 g de la enzima atrapada en el soporte respectivo, a 8 ml de solución del sustrato preparado de igual forma que para la enzima soluble. La mezcla se sometió a idéntico tratamiento que en el caso de la enzima libre y se midió su absorvancia a 280 nm.

La actividad de una enzima se mide en unidades de activación (UA). Bajo las condiciones de este trabajo se define una UA como la cantidad de enzima que libera 1,0 micromoles de tirosina (181 microgramos), a partir de caseína, por minuto, a pH 7,0 y a 37 °C.

PERFIL DE PH

Se utilizaron 7,0 ml de solución de caseína preparada en la forma ya descrita, a los cuales se agregó 1 ml de solución de enzima libre en buffer de fosfato. Para la enzima inmovilizada se aplicó 1 g de enzima en 8 ml de sustrato. El tiempo de incubación y demás parámetros analíticos fueron similares para ambos tipos de enzimas. La medición de la absorvancia se hizo en un rango de pH entre 5,5 y 9,0.

PERFIL DE TEMPERATURA

La influencia de la temperatura sobre las actividades relativas de la enzima libre y de la enzima inmovilizada se determinó entre 26 y 80 °C. Los procedimientos utilizados fueron los mismos descritos anteriormente. Se trabajó al pH de máxima actividad en cada caso.

ESTUDIO CINETICO

Para determinar el efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad inicial y elaborar las gráfica de Lineweaver-Burk para la hidrólisis de caseína por la papaína, se varió la concentración del sustrato entre 0,25 a 0,4%, para lo cual se utilizó el buffer de fosfato. Se trabajó en las condiciones de pH y temperatura a las cuales la enzima libre o inmovilizada demostró tener su máxima actividad.

MEDIDA DE LA DUREZA DEL GEL

Para medir esta propiedad se utilizó un consistenciómetro Hopler equipado para determinar el punto de fluencia bajo un cono de cualquier sustancia. El cono de acero de dimensiones específicas penetra en la muestra, bajo una carga que puede ajustarse gradualmente entre 0,25 y 50 Kg, hasta que se alcanza el punto de fluencia. El Angulo de la punta del cono es exactamente 53°10' de modo que el diámetro de cada base es igual a la altura respectiva. La profundidad de penetración es igual al diámetro de la superficie de base del cono penetrado.

El punto de fluencia se obtiene de la ecuación:

$$Fp = (M \times g)/p = (12,5 \times M)/S$$

Donde,

Fp: Punto de fluencia bajo un cono en Kp/cm
g : Aceleración de la gravedad = 9,81 m/s
p : Superficie de base del cono penetrado en cm
S : Profundidad de la penetración en cm
M : Masa efectiva total en Kg

TRATAMIENTO ENZIMATICO SOBRE LA CERVEZA

El tratamiento de cerveza en cochadas se efectuó mediante la adición de 1 g de papaína inmovilizada a 100 ml de cerveza, la cual se mantuvo a temperatura ambiente en

reposo durante 1 hr. En las mismas condiciones experimentales se trabajó con una muestra de cerveza con enzima libre (10 mg/100 ml) y con una muestra control sin enzima.

Para el tratamiento en continuo se utilizó una columna de 0,8 cm de diámetro interno y 25 cm de longitud, la cual estaba provista de una camisa para recirculación de agua. Se efectuaron dos ensayos para cada sistema de inmovilización: uno a temperatura ambiente y otro con agua circulante a temperatura entre 2 a 4 °C. El flujo de cerveza era aproximadamente de 2 ml/min.

Resultaron así tres tratamientos para cada sistemas de inmovilización, cuyos resultados se compararon con los obtenidos para cerveza en botella y en lata. Y con los de la cerveza control y los de la muestra tratada con enzima libre.

Al final las 17 muestras de cerveza se sometieron a lecturas de turbidez en un nefelómetro, el cual da lecturas directas en unidades de turbidez nefelométricas (NTU).

RESULTADOS Y DISCUSION

PROCEDIMIENTO DE INMOVILIZACION

El tamaño de las esférula obtenidas al inmovilizar con agar y agarosa se pudo ajustar fácilmente entre 0,5-1.0 mm de diámetro, aunque las esférulas obtenidas con agar son de mayor tamaño que las de agarosa. Esto parece que se debe a que el punto de solidificación con agar se alcanza en forma más lenta.

Por recomendación de la literatura (4) y ensayos efectuados en el laboratorio, se utilizo aceite de soya para formar una fase hidrofóbica, cuya finalidad es disolver las partículas de enzima y facilitar la formación de esférulas de un tamaño adecuado.

En el caso de K-carragenina, resultó más adecuado trabajar con un sistema de cubos que con un sistema de esférulas, debido a que el punto de solidificación se alcanza con demasiada rapidez, lo cual impide realizar un goteo permanente sobre la fase hidrofóbica. Se observó que la rigidez del gel se mejora al agregar una solución diluida de NaCl. El sistema cúbico presenta gran facilidad de manejo y mayor área superficial, aunque deja muchos

de NaCl. El sistema cúbico presenta gran facilidad de manejo y mayor área superficial, aunque deja muchos espacios vacíos cuando se usa en la columna.

El gel de poliacrilamida, preparado con tetrametildiamina, presentó un punto de solidificación demasiado rápido como para facilitar la formación de esférulas, por lo cual este soporte se aplicó en forma de membrana. Este es un gel de alta viscosidad, que dificulta en parte su manejo. Sin embargo, las membranas se subdividieron en superficies más pequeñas que se adaptaron bien al trabajo en la columna.

OPTIMIZACION DEL PH

En la Tabla 1 se presenta el rango de pH óptimo observado con relación a la actividad de la enzima libre e inmovilizada, utilizando caseína como sustrato y trabajando a temperatura ambiente. El efecto del pH sobre la actividad relativa de la enzima libre e inmovilizada se puede observar en la Figura 2.

TABLA 1. pH óptimo para la actividad enzimática de la papaina usando caseína como sustrato.

Sistema	Rango de pH óptimo
Enzima libre	6,5 - 6,7
Enzima Agarosa	7,0 - 7,3
Enzima Agar	7,2 - 7,6
Enzima K-carragenina	7,5 - 7,8
Enzima poliacrilamida	7,0 - 7,4

Se encontró que el pH óptimo para la papaina libre es de 6,6, lo cual coincide con datos reportados usando el mismo sustrato (5). Sin embargo, con sustratos diferentes se ha reportado otros valores de pH, por ejemplo con benzoil-L-arginina etil éster el pH óptimo está en 7,2 (5).

El incremento en los valores de pH para la enzima inmovilizada es de esperarse, puesto que el impedimento estérico que ofrecen los soportes debe limitar la difusión de protones en la solución. Con la papaina inmovilizada en quitosán, reportó un pH de 8,0, usando caseína como sustrato. (6)

PERFIL TERMICO

En la Figura 3 se observan los efectos de la temperatura sobre las actividades relativas de la enzima libre e inmovilizada. Utilizando caseína como sustrato, se determinó que la máxima actividad de la enzima soluble se obtiene a 62 °C, en tanto que para la papaína inmovilizada en agar y agarosa se obtiene a 37 °C y para la inmovilizada con K carragenina y poliacrilamida a 52 °C.

en general, la curva correspondiente a la enzima libre presenta un ascenso más regularizado y un máximo más pronunciado que las otras curvas. El ascenso más irregular corresponde al sistema enzima-poliacrilamida, lo cual sugiere que este es el menos estable térmicamente de todos los sistemas estudiados.

Se sabe que la papaína posee una gran estabilidad térmica, que precisamente permite utilizarla a elevadas temperaturas donde el riesgo de contaminación microbiana es mínimo (7). Por esto, no es sorprendente encontrar que su actividad máxima se desarrolla a 62 °C. Con relación a los sistemas inmovilizados, el tratamiento físico a que ha sido sometido la enzima para atraparla, aparentemente ha desnaturado parte de la proteína, lo cual hace disminuir su estabilidad térmica y su actividad relativa.

ESTUDIO CINETICO

Este estudio se llevó a cabo para determinar la constante de Michaelis Km y la velocidad máxima Vm de la enzima soluble e inmovilizada. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 2. Se utilizó como sustrato la caseína y el trabajo se efectuó al pH y la temperatura de máxima actividad para la enzima. Los valores de Km y Vm se obtuvieron de las correspondientes gráficas de Linweaver-Burk.

TABLA 2. Parámetros cinéticos de la papaína.

sistema	Km (mg/l)	Vm (ug/l.min)
Enzima libre	6,29 x 10 ²	0,392
Enzima Agarosa	4,42 x 10	0,284
Enzima Agar	4,00 x 10	0,280
Enzima K-carragenina	1,27	0,192
Enzima poliacrilamida	2,96	0,270

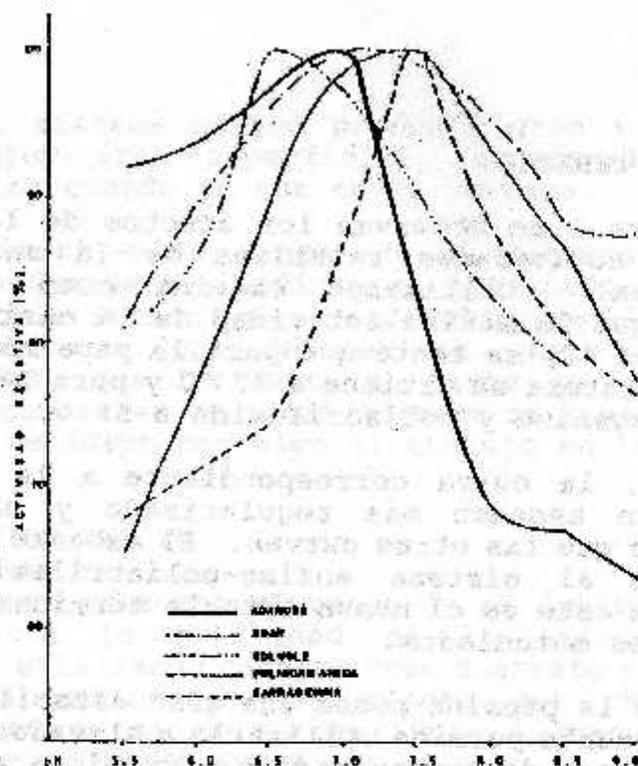


FIGURA 2. EFECTO DEL pH SOBRE LAS ACTIVIDADES RELATIVAS DE LA ENZIMA LIBRE E INMOBILIZADA.

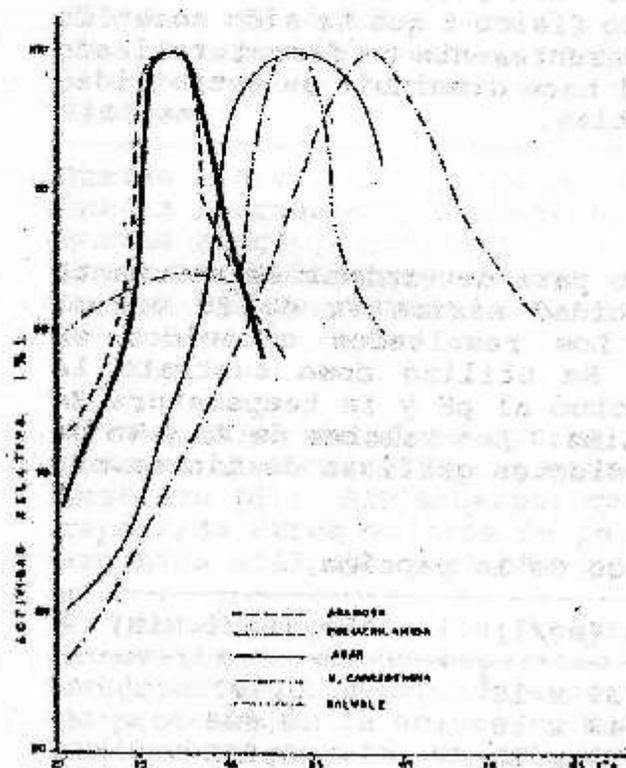


FIGURA 3. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LAS ACTIVIDADES RELATIVAS DE LA ENZIMA LIBRE E INMOBILIZADA.

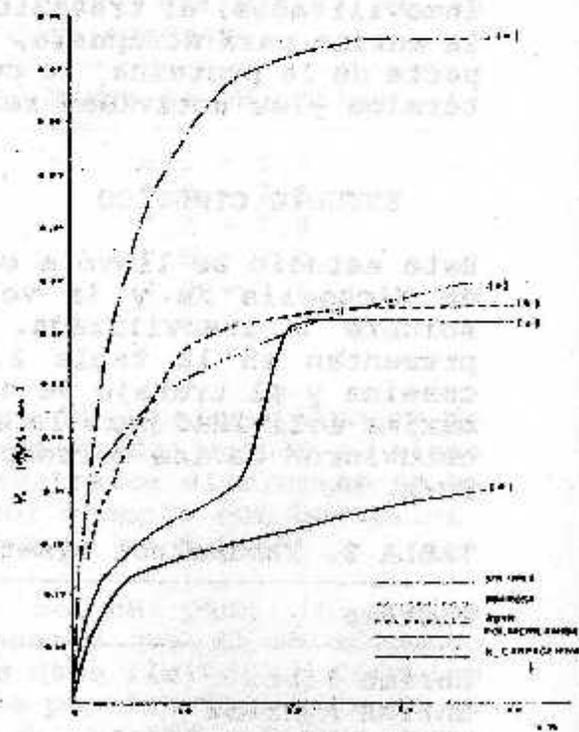


FIGURA 4. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO SOBRE LA VELOCIDAD DE LA REACCION ENZIMATICA INMOBILIZADA.

En estos resultados se observa que el mayor valor par Km corresponde a la enzima libre. Esto se debe a que la enzima inmovilizada está menos accesible para el sustrato que cuando no está atrapada. Por la misma razón, la velocidad máxima para la enzima inmovilizada también tiene valores inferiores comparados con la enzima libre. En otras palabras, existe mayor afinidad por el sustrato cuando se trabaja con la enzima libre. Sin embargo, el hecho de que la enzima disminuye su actividad y su afinidad por el sustrato a causa de su inmovilidad, está compensado por que la enzima puede usarse en forma continua durante largo tiempo sin que se observe una pérdida notoria de su actividad.

También se determinó el efecto de la concentración de caseína sobre la velocidad inicial de la papaína soluble e inmovilizada, trabajando en condiciones de máxima actividad para cada caso (Figura 4). Se observa que para la enzima libre, una concentración de sustrato superior al 2,75% permite mantener la actividad enzimática constante. En todos los sistemas inmovilizados excepto en la poliacrilamida, una concentración de sustrato igual o inferior al 1,0% fue suficiente para que la actividad de la enzima se mantenga sin cambio.

Esta diferencia puede atribuirse a la aparente saturación del sustrato o a la posible penetración del sustrato dentro del soporte.

ACTIVIDAD ENZIMATICA

En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos al medir la actividad relativa de la papaína inmovilizada en los soportes utilizados en este trabajo. En todos los casos se trabajó a pH 7.0 y 37 °C en un baño termostático manteniendo agitación constante.

TABLA 3. actividad relativa, factor de efectividad y punto de fluencia de la enzima inmovilizada.

Sistema	1	2	3
Enzima libre	100	1,0	---
Enzima Agar	56	0,28	25,9
Enzima Agarosa	50	0,18	25,9
Enzima K-carragenina	42	0,16	19,1
Enzima poliacrilamida	49	0,16	16,4

- 1 : Actividad retenida %
- 2 : Factor de efectividad
- 3 : Punto de fluencia (dureza) en Kg/cm²

La pérdida de actividad a causa de la inmovilización fue en promedio de 50%, lo cual puede explicarse por las resistencias difusionales internas y por la posible acumulación de producto en el microentorno de la enzima inmovilizada (7).

También se presenta el factor de efectividad, el cual se considera como una medida de la limitación difusional. Este factor se estimó como la relación existente entre la actividad de la enzima inmovilizada y la actividad de una cantidad equivalente de enzima libre bajo las mismas condiciones.

La tercera columna de la Tabla 3 presenta el punto de fluencia, que indica la dureza alcanzada en la preparación de los geles. A mayor dureza, mayor es la actividad retenida por el sistema.

TRATAMIENTO DE CERVEZA CON PAPAINA

Estos ensayos se efectuaron con la colaboración de la empresa Bavaria. Se deseaba determinar la eficiencia de los diferentes sistemas para clarificar la cerveza. Los tratamientos se realizaron en cochadas y en columna y se compararon con la enzima libre y con cerveza sin tratamiento. En la Tabla 4 se presentan los resultados.

En general, el proceso continuo fue más efectivo que el tratamiento en cochada, en particular cuando se efectuó con la cerveza en frío. El mejor resultado se obtuvo en E-agar, trabajando a temperatura ambiente con el cual la turbidez disminuye más del 100% con relación al control y más o menos el doble con relación a la enzima libre. Estos resultados preliminares demostraron la eficiencia y estabilidad de los sistemas inmovilizados ensayados.

CONCLUSIONES

- El método de inmovilización de la papaina por atrapamiento puede efectuarse en condiciones de operación moderadas y sin el uso de reactivos químicos que puedan alterar la estructura de la enzima.

- Se presenta la ventaja de trabajar con la enzima atrapada en soportes que puedan tener diferentes formas, tales como esférulas, cubos o membranas, lo cual facilita el diseño de un reactor apropiado para una aplicación específica.
- Se determinaron las condiciones de trabajo óptimas para cada sistema de inmovilización y se observó una retención de la actividad enzimática del orden del 50% en promedio.
- La aplicación de los sistemas estudiados para la clarificación de la cerveza fue eficiente, en especial cuando se trabaja en proceso continuo, a temperaturas entre 2-4 °C.

TABLA 4. Valores de turbidez de la cerveza antes y después del atrapamiento enzimático.

No Exp.	Enzima	Tratamiento	NTU
1	Control	Sin ningún tratamiento	18
2	E-libre	Añadida directamente	3,2
3	E-agar	Cochada	3,1
4	E-agar	Columna temp ambiente	1,6
5	E-agar	Columna 2-4 °C	1,3
6	E-agarosa	Cochada	3,2
7	E-agarosa	Columna temp ambiente	1,9
8	E-agarosa	Columna 2 - 4 °C	1,5
9	E-carragenina	Cochada	3,0
10	E-carragenina	Columna temp ambiente	2,0
11	E-carragenina	Columna 2 - 4 °C	2,5
12	E-poliacrilamida	Cochada	3,0
13	E-poliacrilamida	Columna temp ambiente	2,9
14	E-poliacrilamida	Columna 2 - 4 °C	2,6
15	Cerveza comercial	En botella	16
16	Cerveza comercial	En lata	10
17	Cerveza comercial	en botella	12

Los ensayos 15 y 16 fueron realizados utilizando cerveza de la misma empresa que facilitó la cerveza sin ningún tratamiento enzimático. El ensayo 17 fue aplicado a cerveza de otra empresa.

BIBLIOGRAFIA

1. TREVAN, M.D. Immobilized enzymes: An introduction and applications en biotechnology. Jonh Wiley & Sons, New York, USA, 1986.
2. KLIVANOV, A.M. Immobilized enzymes and cells as practical catalyts. Science, 219, 722-727, 1983.
3. OZAWA, K. OHNISHI, T. y TANAKA, S. Activation and inhibition of papain. J. Biochem, 51, 372, 1962
4. NILSSONM, K. y otros. A general method for the immobilization of cells with preserved viability. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech., 17, 319, 1983.
5. KILARA, A. y SHANANI, M., Preparation and properties of immobilized papain and lipase. Biotech. & Bioeng. 19, 1977.
6. FINLEY, J. W. y otros, Removal of chill haze from beer with papain immobilized on chitin. Biotech. & Bioeng. 19, 1895, 1977.
7. CHIOU, R, Y BEUCHAT, L. Immobilization of papain on an anion exchange resin by physical adsorption followed by cross linking with glutaraldehyde, J Food Biochem. 11, 163, 1987.

ABSTRACT

A practical method involving entrapment of papain by cross linked insoluble biopolymers was developed. The optimal working conditions to use the immobilized system with four different carriers were evaluated and it was found that the proteolytic activity was retained by about 50%. The use of the immobilized system to remove chill haze from beer was satisfactory.