

## EXTRACCIÓN E INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS PROTEOLITICAS DE TRES TIPOS DE FRUTAS MEDIANTE DOS MÉTODOS Y SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA, EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR

García M<sup>1</sup>, Solórzano E<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Estatal de Bolívar. Guanujo 92. Guaranda, Ecuador.

### RESUMEN

Hoy en día la tecnología enzimática ocupa un lugar preponderante dentro de la biotecnología y específicamente dentro del sector alimentario. Alrededor de un 40% de las enzimas que se producen industrialmente están de una u otra manera relacionadas con la industria agroalimentaria, empleando procedimientos sencillos para la extracción y sin aplicar métodos de purificación de enzimas, se trabajó con la papaína, ficina y bromelina, y como soportes se empleó los biopolímeros agar-agar para el método de atrapamiento en gel y el alginato de sodio para el método unión a un soporte, a concentraciones o niveles de 1,5% y 3,5%. Se valoró la actividad proteolítica de las enzimas inmovilizadas (papaína, Ficina y bromelina), en tres tipos de sustratos, leche y carne, obteniéndose como mejor tratamiento a la combinación (alginato 1,5% + papaína). Después de realizar cinco corridas experimentales bajo las mismas condiciones para evaluar la reutilización en tres tipos de sustratos (leche y carne), se determinó el 57,8 % de actividad residual promedio. Se evaluó el porcentaje de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento al día 15 y al día 30 con el 64,9% y el 53,4% de actividad proteolítica promedio sobre los sustratos (leche y carne).

**Palabras clave:** Enzima, papína, ficina, bromelina, biopolímeros, actividad proteolítica.

### ABSTRACT

Today enzymatic technology occupies a preponderant place within the biotechnology and specifically within the alimentary sector. About 40% of the enzymes that are produced industrially are in one way or another related to the agrifood industry, using simple procedures for extraction and without applying enzyme purification methods, worked with papain, ficina and bromelain, and Agar-agar biopolymers for the gel-entrapment method and sodium alginate for the support-binding method were used as substrates at 1.5% and 3.5%

concentrations or levels. The proteolytic activity of the immobilized enzymes (papain, Ficina and bromelain) was evaluated in three types of substrates, milk and meat, obtaining the best combination treatment (1.5% alginate + papain). After performing five experimental runs under the same conditions to evaluate the reuse in three types of substrates (milk and meat), 57.8% of average residual activity was determined. The percentage of the proteolytic activity of the immobilized enzyme submitted to storage at day 15 and at day 30 was evaluated with 64.9% and 53.4% of average proteolytic activity on the substrates (milk and meat).

**Keywords:** Enzyme, papain, ficin, bromelain, biopolymers, proteolytic activity.

## INTRODUCCIÓN

Las enzimas son proteínas con actividad biológica que catalizan reacciones bioquímicas, no reaccionan químicamente con las sustancias sobre las que actúan ni alteran el equilibrio de la reacción. Su función consiste sólo en aumentar la velocidad de las reacciones interviniendo como biocatalizadores y actuando donde se precisa su acción y no en más puntos, lo que facilita que no se altere el sustrato. En el caso de la elaboración de alimentos intervienen en el desarrollo de una reacción, de forma que sin su existencia ésta es muy complicada o imposible. Estas proteínas se mantienen además inalterables durante mucho tiempo, lo que las hace especialmente interesantes desde el punto de vista industrial, biotecnológico, y la seguridad de los alimentos.

## MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en el cantón Guaranda de la Provincia de Bolívar, en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Estatal de Bolíva. Las enzimas en estudio fueron la ficina presente en el higo (*ficcus*), la papaína presente en la papaya (*carica papaya*) y la bromelina presente en la piña (*Ananas comosus*), frutas que no alcanzan su estado de madurez óptimo debido a que en éstas se encuentra la mayor concentración de enzima, se aplicó un diseño completamente al azar, con dos factores de estudio.

De las frutas empleadas en el estudio: la piña y la papaya se adquirieron del mercado 10 de noviembre proveniente del sub trópico de la Provincia, mientras que los higos se recolectaron de la parroquia San Lorenzo del Cantón Guaranda. Para la extracción del látex de la papaya y del higo usando un visturí, se realizó incisiones verticales de 1-2 mm con intervalos de 30

minutos hasta que el látex empiece a disminuir, recogiendo en una caja petri, mientras que para la piña se procedió a triturar en un motero (pulpa y cáscara), hasta obtener el jugo el cual se maceró por cinco días, luego filtró en una gasa y el jugo se colocó en una caja petri. Se realizó un secado en la estufa a temperatura inferior a los 40°C hasta obtener un polvo el cual se trituró en un mortero. Para preparar la solución de enzimas se mezcla 1 mg de la enzima en polvo con 1 ml de agua destilada. Los soportes para la inmovilización se prepararon según las concentraciones en estudio 1,5 y 3,5% (m/v) en agua destilada, en las planchas de calentamiento con agitación, el agar-agar a una temperatura de 85 °C y una revolución de 125 rpm, hasta lograr la dilución, manteniendo la disolución de agar-agar a 40 °C para mantenerlo licuado. El alginato de sodio a una temperatura de 80 °C y una revolución de 125 rpm, hasta lograr la dilución. Se mezcló la solución de enzimas con la solución de cada uno de los soportes en la misma proporción 1:1 v/v, con una aguja hipodérmica de 20 ml se hizo caer gota a gota toda la mezcla dentro del vaso de precipitación que contenía las soluciones endurecedoras sumergidas en un recipiente con un baño de agua-hielo para mantenerlas frías y con agitación constante de 100 rpm; aceite vegetal para el atrapamiento en gel usando como soporte el agar-agar y de esta manera se consiguió formar gotas de gel quedando la enzima adherida por unión física al soporte, las cuales se lavaron tres veces en agua destilada con movimientos rotatorios suaves para eliminar el aceite de la superficie, y, cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$  0,5 M) para unión a un soporte con el alginato de sodio los cuales reaccionan quedando la enzima atrapada en el soporte por adsorción iónica formando partículas esféricas de gel de Alginato de Calcio.



Figura 1. Proceso de obtención de la enzima inmovilizada.

## **Variables de estudio y generación de indicadores**

Las variables que se estudiaron fueron: porcentaje de la enzima inmovilizada, porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada, porcentaje de actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento.

## **Tratamiento y análisis de información**

Se aplicó un diseño completamente al azar, con dos factores de estudio correspondiendo al factor A los soportes para la inmovilización (agar 1,5%, agar 3,5% y alginato de sodio 1,5% y alginato de sodio 3,5%) mientras al factor B correspondió a las enzimas proteolíticas (papaína, ficina y bromelina), doce tratamientos con tres repeticiones dando un total de 36 unidades experimentales. Para establecer las diferencias entre los tratamientos se aplicó el análisis de varianza (ADEVA), y la prueba de Tukey al 5% para comparar promedios de tratamientos A, B y la interacción AxB, los datos obtenidos fueron procesados en los programas estadísticos STATGRAPHICS y STATISTIX9.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Porcentaje de la enzima inmovilizada**, por medio de un análisis de proteína por el método de Bradford tanto de la solución original de enzima y en la solución endurecedora al final del proceso de inmovilización, calculando el porcentaje de la diferencia entre la cantidad de la proteína atrapada en el soporte y la cantidad de la proteína de la solución original.

$$\% \text{ Enzima Inmovilizada} = \frac{\text{proteína atrapada}}{\text{proteína inicial}} \times 100$$

Se aplicó la enzima inmovilizada a los alimentos (leche, cerveza y carne), evaluando:

**Porcentaje de la reutilización de la enzima inmovilizada**, se realizaron cinco corridas experimentales, tomando en cuenta a la corrida inicial como el 100%, y, **Porcentaje de actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento**, donde se determinó la estabilidad de la enzima al almacenamiento al medir la actividad proteolítica de las enzimas a los días 0, 15, 30, las mismas que fueron almacenadas a temperatura de refrigeración (4 °C) en agua destilada, por medio de un análisis de proteína antes y después de someter al alimento a la actividad enzimática en la leche y la carne, mientras que en la

cerveza se midió la turbidez de la misma manera antes y después de aplicar las enzimas inmovilizadas.

En el ADEVA correspondiente al porcentaje de enzima inmovilizada (PEI), se obtuvo un nivel de significancia altamente significativo, lo que nos indica que el tipo de enzima, el soporte y la concentración del mismo tienen gran influencia, debido a que a una mayor concentración de soporte este formará geles más sólidos en donde se quedará atrapada la enzima y evitándose que esta pase por la membrana a la sustancia endurecedora, el soporte agar-agar al 1,5% no logró inmovilizar la enzima al representar una concentración muy baja de soporte y no logró formar las esferas de gel perdiéndose la solución en la solución endurecedora (aceite vegetal), mientras la combinación (alginato 3,5% + papaina), se obtuvo un porcentaje de inmovilización del 96,67% de enzima inmovilizada en el soporte, ocupando el primer rango o nivel de significancia, concluyendo que el porcentaje de enzima inmovilizada es directamente proporcional a la concentración del soporte.

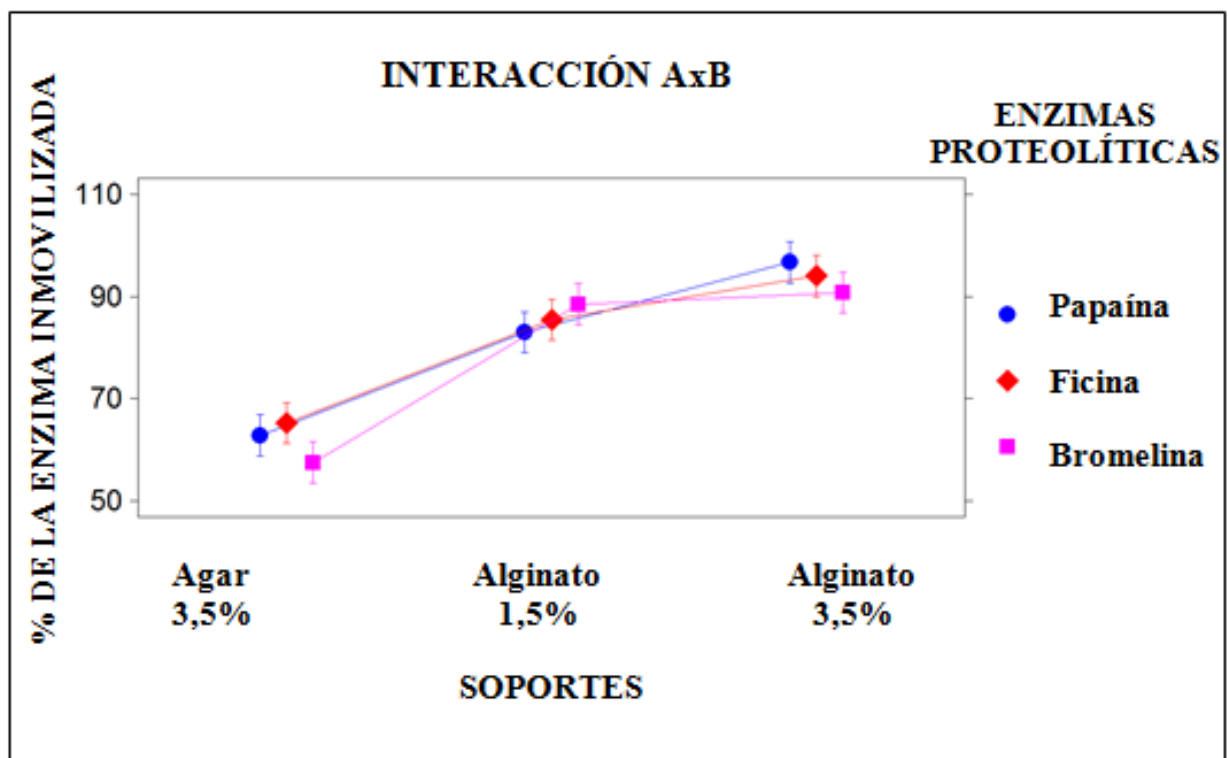
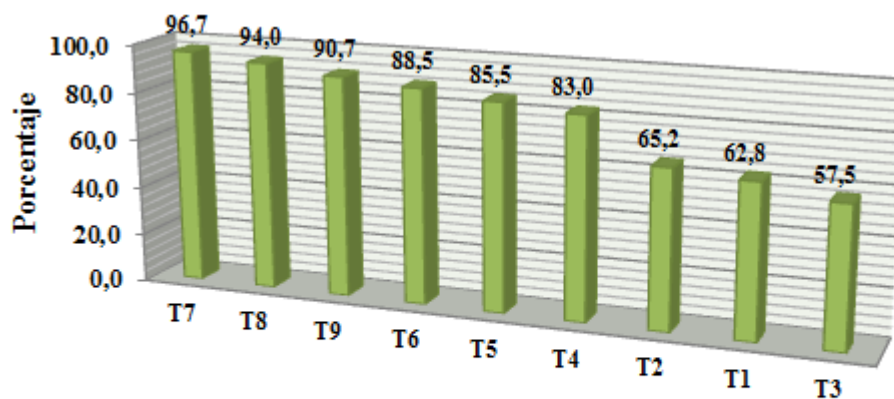


Figura 2. Interacción AxB para la variable porcentaje de la enzima inmovilizada (PEI).



#### Tratamientos

T1 Agar 3,5% + Papaína	T2 Agar 3,5% + Ficina	T3 Agar 3,5% + Bromelina
T4 Alginato 1,5% + Papaína	T5 Alginato 1,5% + Ficina	T6 Alginato 1,5% + Bromelina
T7 Alginato 3,5% + Papaína	T8 Alginato 3,5% + Ficina	T9 Alginato 3,5% + Bromelina

Figura 3. Prueba de Tukey al 5% para la variable porcentaje de la enzima inmovilizada (PEI).

Para el porcentaje de actividad proteolítica de la enzima inmovilizada se obtuvo el 86,3% en el sustrato leche, 23,2 % en la cerveza y 96% en la carne, correspondientes a Alginato 1,5% + Papaína, obteniendo niveles más bajos con la enzima bromelina en los soportes agar-agar y alginato de sodio al 3,5%. Después de la primera corrida experimental no se logró recuperar la enzima inmovilizada en el soporte agar-agar al 3,5% debido a que se perdió en el producto.

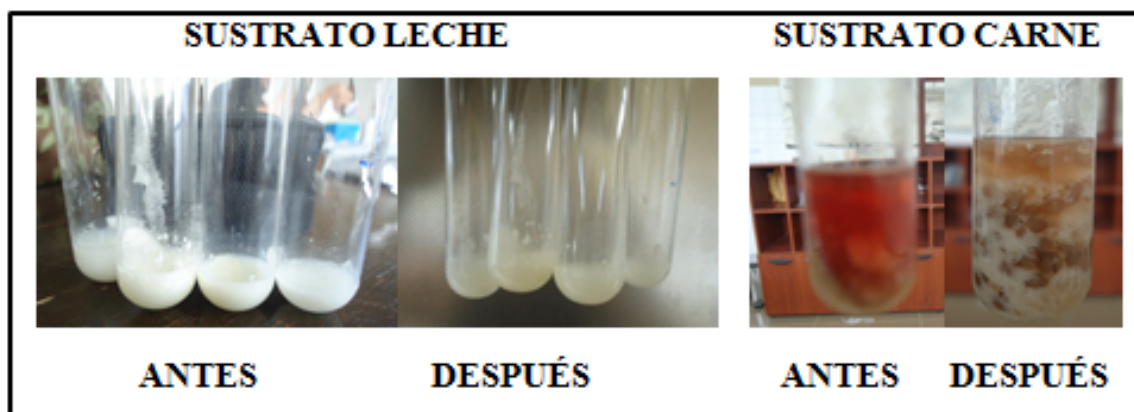


Figura 4. Sustrato antes y después de la acción proteolítica de la enzima papaína inmovilizada.

Para el porcentaje de reutilización de la enzima inmovilizada luego de 5 corridas experimentales bajo las mismas condiciones, en las cuales se recupera las esferas de soporte-enzima y se lava con agua destilada, se reportó lo siguiente: 74,2% para el sustrato leche,

67,3% para la cerveza y 72,8% para la carne, correspondiente a corresponde a la combinación (alginato 1,5% + papaína). Según Won K y col (2005), en su estudio “Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads”, obtienen un porcentaje de actividad relativa del 72% al reutilizar tres veces lipasa inmovilizada en esferas de alginato. También se ha reportado valores de actividad residual para proteasas de origen fúngico como la lipasa empleando como soporte de inmovilización celite y poliacrilamida de 98% después de 18 ciclos de reacción según Mansour E, Dawoud F. (2003) en su estudio “Inmovilization of invertase on celite and on polyacrylamide by an absorption procedure”. Además se reporta una actividad residual de 43% después de haber sido reutilizada cinco veces continuas bajo las mismas condiciones de operación, la mexicana inmovilizada en el soporte de alginato de sodio, en la investigación “Efecto de un proceso de inmovilización sobre la actividad proteolítica de mexicana” de Flores G. (2011). Mostrando que el uso repetitivo provoca una pérdida de la actividad debido a que existe una posible liberación de la enzima de las esferas de alginato, además del daño mecánico que sufren las mismas al ser utilizadas y recuperadas en repetidas ocasiones.

Para el porcentaje de actividad proteolítica de la enzima inmovilizada sometida al almacenamiento (APEIA). Según Kilincte (2012), el proceso de inmovilización aporta estabilidad a las proteínas, al restringir el movimiento de la molécula y ligándola a un cuerpo inerte mediante enlaces químicos, de esta forma, los diversos dominios se mantienen en la orientación correcta para conservar la actividad al menos durante un largo periodo de tiempo, en comparación con las enzimas en solución libre. En el estudio “Efecto de un proceso de inmovilización sobre la actividad proteolítica de mexicana” de Flores G. (2011), se reporta una actividad proteolítica en la enzima inmovilizada en el soporte de alginato de sodio sometida al almacenamiento a temperatura de refrigeración superior al 60% después de tres meses. En presente investigación se estudió al día 15 y 30.

**Tabla 1.** Porcentajes de actividad enzimática

SUSTRATO	DIA 15	DIA 30
LECHE	73,7 %	59,6 %
CERVEZA	63,8 %	46,0 %
CARNE	75,5 %	74,9 %

En la investigación se observó una superioridad de los tratamientos que en su combinación está presente la enzima papaína, esto debido a que esta enzima al ser extraída y secada directamente del látex que produce al realizar incisiones verticales a la papaya inmadura se

encuentra presente mayor concentración de la papaína, lo que no sucede con el higo a pesar que según la bibliografía esta es mayor con 0,28g de proteína por cada 100g de fruta a la papaya, esto debido a que el látex proveniente de la extracción no fue purificado, sino simplemente secado a temperatura controlada. Lo que se pudo evidenciar durante el desarrollo del trabajo de campo, es que la ficina presentaba un alto contenido celulósico (látex) el cual no se consiguió disolver completamente en el agua destilada al formar la solución de enzima, lo que nos indica que el mg de enzima seca que se pesó, no era completamente ficina como tal sino también el látex resultado del proceso de secado.

Con la enzima bromelina sucedió algo muy similar a pesar que según la bibliografía es mayor con 0,07g de proteína por cada 100g de fruta a la papaya, tampoco fue purificada, ya que para ello se necesitan realizar métodos más complejos y el proceso de extracción consistió en triturar la fruta, cáscara y corona, luego se maceró, filtro y se secó a temperatura controlada, lo que tampoco nos garantiza que 1 mg de enzima seca que pesamos esté libre de otros componentes de la piña como puede ser la fibra.

La actividad proteolítica en el sustrato cerveza es inferior con respecto a los sustratos leche y carne, debido a que la aplicación de enzimas para la clarificación se realiza en proceso de fermentación y maduración para controlar la turbidez adicionando una proporción entre 1-1,5g de enzima por cada hectolitro de cerveza, lo que en el trabajo de campo se adicionó la enzima inmovilizada a la cerveza artesanal a temperatura de incubación 40-42°C por media hora, razón por la cual no hidrolizó más contenido proteico, lo que se ve reflejado en los datos de porcentaje de actividad proteolítica.

## CONCLUSIONES

Se extrajo e inmovilizó enzimas proteolíticas de tres tipos de frutas (papaya, higo, piña) mediante el método de atrapamiento en gel en el soporte agar-agar por adhesión o retención física en las cavidades interiores de la matriz sólida porosa y el método de unión a un soporte por adsorción o gelación iónica con la formación de esferas de alginato de calcio como resultado del intercambio iónico de la reacción del soporte alginato de sodio con la solución endurecedora de cloruro de calcio al 0,5 molar, posteriormente se aplicó en la industria alimentaria para medir la actividad proteolítica en tres sustratos (leche y carne).

Se determinó que el mejor método para la inmovilización de enzimas con el cual se obtuvo mejores resultados en las variables de respuesta, fue el de unión a un soporte por gelación



iónica usando como soporte el alginato de sodio a una concentración de 1,5%, el cloruro de calcio al 0,5 molar como la solución endurecedora y con la enzima papaína.

Las enzimas proteolíticas (papaína, ficina y bromelina) al actuar sobre la leche, descienden el punto isoeléctrico de las proteínas a 3,6 provocando la ruptura de molécula kapa caseína a nivel de los enlaces 105-106 entre los aminoácidos fenilalanina-metionina lo que provoca que se desestabilice las micelas y la caseína se divide de su fase líquida llamada suero formando coágulos, logrando una cuajada más firme, flexible e impermeable, obteniéndose un 66% de actividad proteolítica en este sustrato, en la carne provocan la hidrólisis de las proteínas, rompiendo la elastina y disminuyendo la resistencia del colágeno, modificando la textura, lo que se ve reflejado en el ablandamiento con un 88% de sustrato hidrolizado.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arroyo M. (2008) "Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones" Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, España. 16p.
- Barbosa CMS, Morais HA, Delvivo FM, Mansur HS, Oliveira MC, Silvestre MPC. (2005) "Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres" *J. Sci, Food Agric, Estados Unidos*. 84 p.
- Bhardwaj A, Lee J, Glauner K, Ganapathi S, Bhattacharyya D, Butterfield DL. (2008) "Biofunctional membranes: an EPR study of active site structure and stability of papain non-covalently immobilized on the surface of modified poly(ether)sulfone membranes through the avidin-biotin linkage" *J. Memb. Sci, Estados Unidos*. 241-252 p.
- Cabra J y Sánchez M. (2007) "Biotecnología para el desarrollo en Colombia" *Mercado y consumo, Innovación y ciencia Vol. VI, No 3*. 44-52 p.
- Carrera J. (2006) "Enzimas Industriales, Biorreactores, Variables de Control, Guías de Laboratorio y Biotecnología Agrícola y Vegetal" *Módulos de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad del Cauca, Colombia*. 55p.
- FAO (2013) "ficha técnica higo"
- Gacesa P. y Hubble J. (2006) "Tecnología de la Enzimas", Zaragoza. España. 80p.
- García J. (2012) "Biología en la línea 2000"
- Godfrey T y Reichelt J. (2011) *Industrial Enzymology*.
- Goldstein L. (2006) "Kinetic behaviour of immobilized enzyme systems". *Methods Enzymol, Estados Unidos*. 397-443 p.
- Herrera C, Bolaños N, (2010) "Manual de Química de Alimentos", Universidad de Costa Rica, Costa Rica. 55p.
- Honda Y, Kako M, Abiko K. y Sogo Y. (2008) *Industrial Application of immobilized enzymes*, Tanaka, A. et al. eds. Marcel Dekker, pág. 209-234.
- Illanes A. (2009) "Biotecnología de Enzimas", Ediciones Universitarias. Universidad Católica de Valparaíso.
- Izquierdo y De la Riva G. (2009) "Plantbiotechnology and food security in Latin América and the caribbean" *Electronic Journal of Biotechnology*.
- Klei H, Sundstrom, D.W.; Shim D, (2005) *Immobilization of enzymes by microencapsulation en Immobilized cells and enzymes: a practical approach* J. Woodward,
- Lin H, Wang H, Xue C, Ye M. (2008) *Preparation of chitosan oligomers by immobilized papain*. *Enz. Microb. Technol.* 2002; 31: 588-592.
- Mansour E. y Dawoud F. (2003) "Inmovilization of invertase on celite and on polyacrylamide by an absorption procedure" 35p
- Pestano B. (2005) *El Cultivo de la Papaya (Primera parte)*
- Roland J.F. (2005) *Requirements unique to the food and beverage industry en Pitcher, W.H. et al. (eds.) Immobilized enzymes for food processing, CRC Press, Boca Raton, pp. 55-80.*

Scouten W.H, Luong, J.H.T, Brown, R.S. (2005) "Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design", Trends Biotechnol. 178-185 p.

Schmidt H y Pennacchiotti I, (2011) "Las enzimas en los alimentos, su importancia en la química y la tecnología de los alimentos", Colombia. 55p.

Taylor R. (2007) "Protein Immobilization: fundamentals and applications", Marcel Dekker, New York. 65p.

Tucker G. y Woods L.(2010) Eds . "Enzymes in Food Processing", Blackie and Son Ltd. London. 73p.

Wiseman A. (2006) "Handbook of enzyme biotechnology", 2da edición, England. 45p.

Whithaker JR. (2009) "Effect of substrate concentration on rates of enzyme catalyzed reaction In: Principles of enzymology for the food science", Marcel Dekker, California. 95p.

Won K. y col. (2005) "Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads" 40p.

<http://www.dietaynutricion.net/informacion-nutricionalde/papaya/>, (2013).

<http://www2.udec.cl/~lilherna/enzimas.html>, (2012).

<http://sotelo-ficus.blogspot.com/p/valor-nutricional-del-higo-100gr.html> (2013).

<http://www.dietaynutricion.net/informacion-nutricional-de/pina/>(2013).

<http://www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/pina.pdf> (2013).