

Inmovilización de proteasas en nanopartículas

Immobilization of proteases on nanoparticles

Eduardo Durazo Beltrán

Universidad Autónoma de Baja California

edurazo@uabc.edu.mx

María Teresa Viana Castrillón

Universidad Autónoma de Baja California

mtviana@hotmail.com

Resumen

En el estudio realizado se evaluó la capacidad de inmovilizar la proteasa papaína en una matriz de nanopartículas de aluminosilicatos (zeolita) a través de la formación de enlaces covalentes, en el producto de la inmovilización se determinó la actividad enzimática para estimar su uso en la hidrólisis de ingredientes proteicos utilizados en la elaboración de alimentos acuícolas formulados. Al término del proceso de inmovilización de la papaína en zeolita la actividad enzimática específica del producto final se comparó con la actividad de la papaína soluble al inicio del proceso, se determinó una diferencia entre las muestras de 0.44 U/mg, lo cual indica que la enzima inmovilizada presentó una actividad del 86% con relación a la concentración inicial de la forma soluble. La determinación de la capacidad proteolítica relativa de papaína inmovilizada mostró que harina de pescado presentó el mayor porcentaje (79.3%) y harina de soya el menor (25.8%).

Abstract

In the study done was evaluated the capacity to immobilize the protease papain in a matrix of aluminosilicate nanoparticles (zeolite) through the formation of covalentes bonds. In the final product of enzyme immobilization process was determined the enzymatic activity, to evaluate its use in hydrolysis of protein ingredients used in formulated feeds for aquaculture. Ending the process of immobilization of the

papain on zeolite the specific enzyme activity between the final product and papain soluble at start process was compared. A difference between the samples of 0,44 U/mg was found, which indicates that the immobilized enzyme had an activity of 86% in relation to the initial concentration of the soluble form. The relative proteolytic capacity of immobilized papain showed the higher percentage (79.3 %) in fishmeal and the lower value (25.8%) in soybean flour.

Palabras clave / Key words: Papaína, inmovilización, nanopartícula, zeolita, proteína / Papain, immobilization, nanoparticle, zeolite, protein.

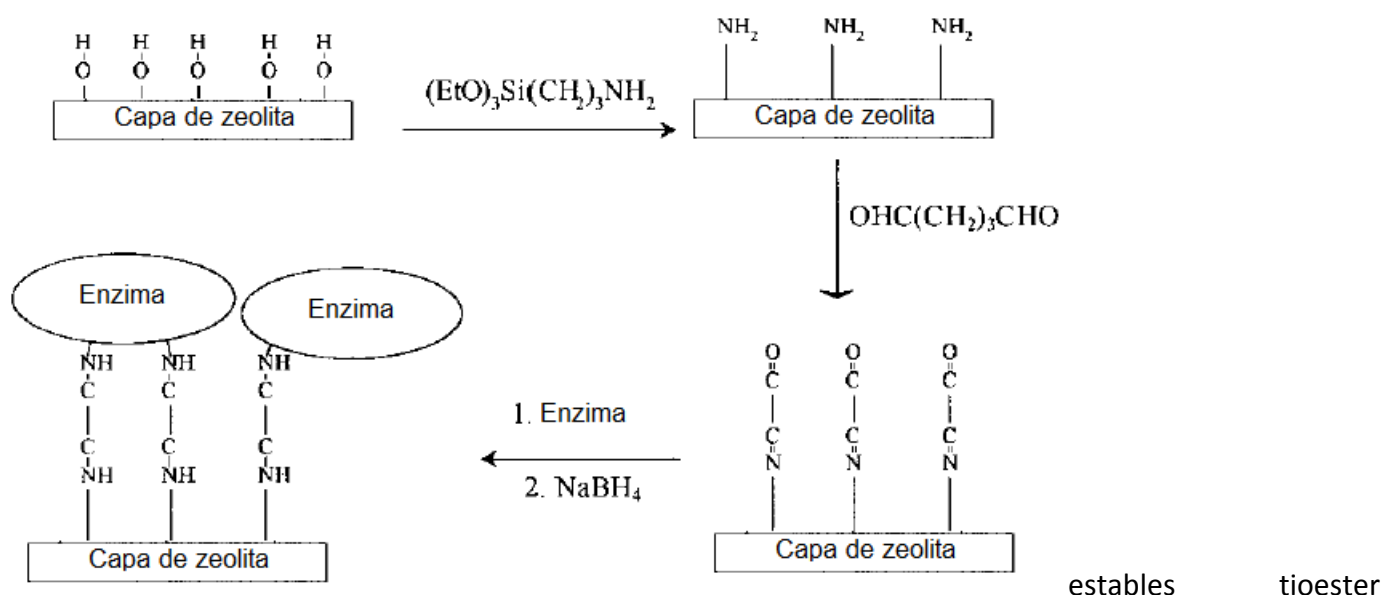
Introducción

En las últimas décadas se ha prestado considerable atención a la preparación de enzimas inmovilizadas, y se han desarrollado diversos soportes y técnicas de inmovilización, la cual se puede efectuar mediante mecanismos como atrapamiento, interacción iónica, formación compleja con metal, enlace covalente, encapsulación y adsorción en superficies hidrofóbicas o hidrofílicas (Biasutti et al., 2006). A nivel industrial y comercial se utilizan y se cuenta con una diversidad de enzimas inmovilizadas, las cuales presentan una mayor eficiencia en su uso con relación a las enzimas en solución, como es el caso de proteasas, lipasas e invertasa, las cuales son utilizadas en procesos de producción a gran escala. Una técnica para inmovilizar enzimas es a través de generar enlaces covalentes con un soporte de estructura porosa, lo cual favorece el incremento de la superficie de fijación que puede reflejarse en una mayor actividad enzimática específica (Homaei et al., 2013). Las nanopartículas, que comprenden partículas entre 1 y 100 nm, son soportes que muestran un alto potencial para uso en biotecnología y nanomedicina, dentro de las cuales las inorgánicas de sílice por sus propiedades físico-químicas como resistencia mecánica, estabilidad química, ausencia de toxicidad, biocompatibilidad y versatilidad sintética son muy atractivas para uso en nanotecnología (Llinàs y Sánchez-García, 2014).

La inmovilización de enzimas proteolíticas con actividad digestiva es una tecnología que presenta ventajas para su aplicación a nivel industrial y de investigación. Un ejemplo es la papaína, una cisteína

endopeptidasa, que se obtiene de variedades de Carica papaya, la enzima presenta una amplia actividad proteolítica hacia proteínas, péptidos de cadena corta, enlaces amida y ésteres de aminoácido, por lo cual se utiliza ampliamente en alimentación y medicina (Homaei et al., 2013). El interés de inmovilizar la papaína se ha asociado con su aplicación en la industria, por ejemplo como agente de estabilización por frío en la fabricación de cerveza, para el ablandamiento de carnes y en la síntesis enzimática de péptidos (Biassuti et al., 2006). Así mismo, muestra un uso potencial en nutrición animal, dentro de la cual hay interés para su aplicación en producción acuícola en el aprovechamiento de fuentes proteicas de fuentes animal y vegetal.

Estudios de la fijación de papaína en matrices con iones metálicos ha mostrado que parámetros como actividad enzimática y estabilidad no se modifican con relación a la enzima en solución (Hyndman et al., 1992; Afaq y Iqbal, 2001). La inmovilización de enzimas por formación de enlaces covalentes se realiza a través de reacciones con grupos funcionales que están presentes en la superficie de la proteína y del material del material de soporte (Figura 1). Los residuos de cisteína, que contienen el grupo tiol, se utilizan con frecuencia para la inmovilización de la estructura proteica, los cuales mediante adición conjugada con carbonilos insaturados pueden generar enlaces.



(Corma et al., 2002; Thanh y Green, 2010).

Figura 1. Inmovilización covalente de enzimas sobre zeolita (Corma *et al.*, 2002)

La proteína es uno de los nutrientes que presenta una relevancia significativa en la nutrición y alimentación de organismos animales, ya que influye en las características funcionales y nutricionales al suministrar aminoácidos esenciales y como una fuente de energía. La velocidad de absorción de la proteína a nivel intestinal está dada por la capacidad de enzimas digestivas para hidrolizar las fuentes proteicas del alimento, para que estas puedan ser asimiladas (Pond *et al.*, 2005). En la producción acuícola animal el uso de papaína en la elaboración de alimentos formulados, como aditivo para favorecer la digestibilidad de la dieta, debe de tener en cuenta las características de los ingredientes proteicos a utilizar y los tipos de sistemas de cultivo que se usarán (Munguti *et al.*, 2014). Es necesario también el considerar el estadio del organismo, ya que la capacidad digestiva está determinada por la combinación de sus propias enzimas digestivas y de la flora microbiana intestinal. (Hlophe-Ginindza *et al.*, 2015).

En el estudio realizado se evaluó la capacidad de inmovilizar la proteasa papaína en una matriz de nanopartículas de aluminosilicatos (zeolita) a través de la formación de enlaces covalentes, en el producto de la inmovilización se determinó la actividad enzimática para estimar su uso potencial en la hidrólisis de ingredientes proteicos utilizados en la elaboración de alimentos acuícolas formulados.

Metodología.

Preparación del material de soporte.

Zeolita en polvo se lavó con isopropanol anhidro por 24 horas a temperatura ambiente con agitación continua. Enseguida se centrifugó la mezcla y se descartó el sobrenadante, el sólido se secó a presión reducida. La zeolita lavada se sometió a silanización, con 3-aminopropiltriethoxisilano por 16 horas a temperatura ambiente, posteriormente el material se lavó varias veces con diclorometano, de acuerdo al método reportado por Mukhopadhyay *et al.* (2003).

Inmovilización de papaína en el material de soporte.

Zeolita funcionalizada se mezcló con papaína soluble (Merck) en solución buffer de fosfatos pH=5, posteriormente se adicionó clorhidrato de N'-(3-dimetil laminopropil)-N-etilcarbodiimida y la mezcla se

sometió a agitación por un periodo de 2 horas a 22°C. El material particulado se separó mediante centrifugación y se sometió a lavados con solución buffer de fosfatos pH=5. La zeolita acoplada a la papaína se secó a 30°C y posteriormente el producto (Figura 2) se almacenó a -10°C para su ulterior uso.



Figura 2. Producto final del proceso de inmovilización de papaína en zeolita

Determinación de actividad enzimática.

La actividad enzimática de la papaína inmovilizada se determinó mediante uso de azocaseína 2% por el método de Sarath et al. (1989) modificado, en el cual se incluyó una solución de activación con cisteína 40 mM y Na₂EDTA 20 mM. La actividad específica fue expresada como el cambio en absorbencia/min/mg de proteína bajo las condiciones del ensayo. El contenido de proteína en las muestras analizadas se cuantificó mediante el método de Bradford (1976) con suero de albumina de bovino como estándar.

Determinación de actividad hidrolítica de papaína inmovilizada.

Se analizó la capacidad proteolítica relativa de papaína inmovilizada mediante el método modificado de Chaiwut et al. (2007) en harina de pescado (68% proteína cruda:PC), harina de ave (68% PC) y harina de soya (47% PC), en el cual se determinó la absorbencia a 275 nm, asociada al contenido de tirosina, presente en los productos de la hidrolisis enzimática de las fuentes proteicas con relación a muestras sin adición de papaína.

Resultados y discusión.

La inmovilización de enzimas mediante enlaces covalentes sobre soportes inorgánicos como la zeolita es un procedimiento clásico para proteasas, el cual presenta la ventaja de generar productos que son relativamente estables a hidrólisis a pH neutro (Homaei et al., 2013). La presencia de grupos hidroxilos en la superficie de la zeolita permite que mediante tratamiento químico se generen cambios en sus grupos funcionales y se puedan generar enlaces con biomoléculas como enzimas (Datta et al., 2013). En la primera fase del presente estudio la zeolita utilizada como material de soporte para la inmovilización de papaína se sometió a modificación química, la cual consistió en la reacción de grupos hidroxilo de la zeolita con 3-aminopropiltriethoxisilano (Figura 2) para incorporar grupos amino a la superficie del soporte (Thanh y Balkus 2011).

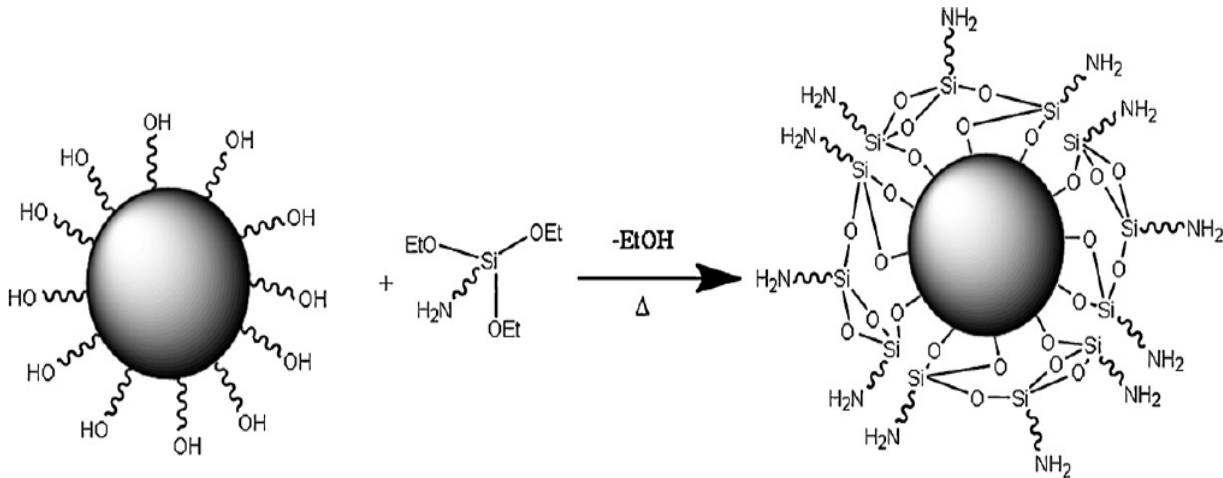


Figura 3. Reacción de silanización para añadir grupos amino a zeolita (Thanh y Green 2010).

La siguiente etapa del ensayo consistió en una reacción de activación mediante el uso de carbodiimida (Figura 3), en la cual se genera una bioconjugación entre los grupos amino de la superficie de matriz inorgánica y grupos funcionales de la enzima de interés, lo cual se postula ocurre mediante la formación de enlaces amidas. En este proceso participa un grupo carboxílico que se activa, en presencia de la 1-etil-3-(dimetilaminopropil) carbodiimida como agente de acoplamiento, para formar un éster de la N-hidroxisuccinimida, posteriormente la amina reacciona con el éster activado para generar la amida (Smith et al., 2010; Llinàs y Sánchez-García, 2014).

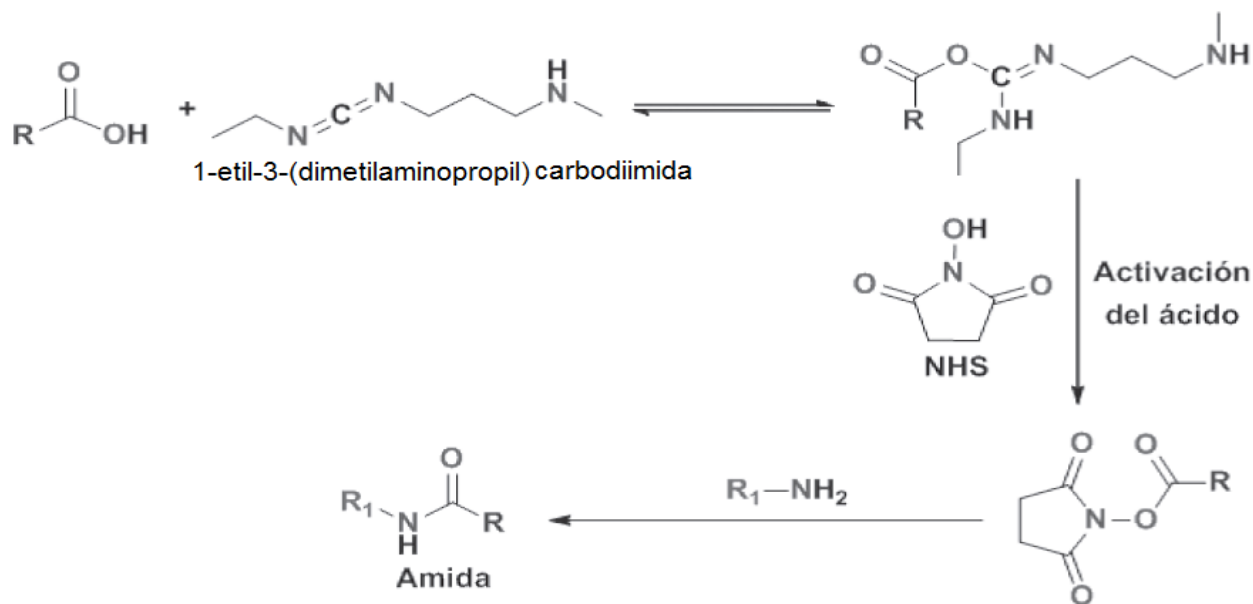


Figura 4. Formación de una amida en presencia de 1-etil-3-(dimetilaminopropil) carbodiimida (Llinàs y Sánchez-García, 2014).

Al término del proceso de inmovilización de la papaína en zeolita se analizó la actividad específica (unidades de enzima/mg proteína) del producto final, la cual se comparó con la actividad de la papaína al inicio del proceso (Figura 4). Se determinó una diferencia entre las muestras de 0.44 U/mg, lo cual indica que la enzima inmovilizada presentó una actividad del 86% con relación a la concentración inicial de la forma soluble. Se conoce que la papaína está compuesta por una cadena polipeptídica de 212 aminoácidos, con una estructura terciaria con 2 subunidades, la cual contiene 3 enlaces disulfuro, un sitio activo conformado por 3 aminoácidos y 7 subsitios asociados a este (Kamphuis et al., 1984), por lo cual se estima que la dinámica de enlazado de la papaína con la matriz puede influir en su conformación y la disponibilidad del sitio activo, lo cual se denotaría en cambios en su actividad específica.

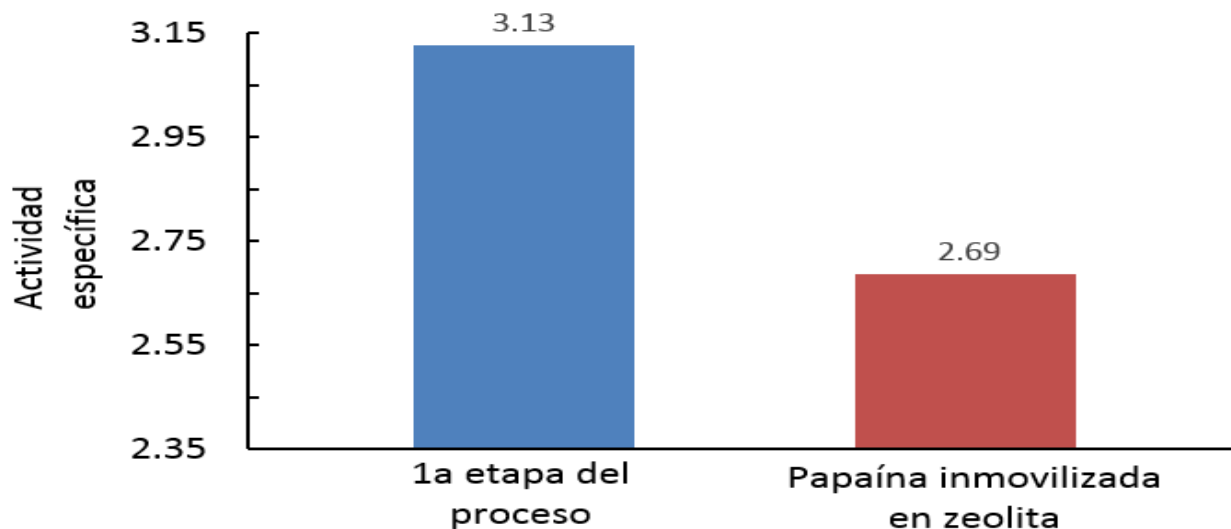


Figura 5. Actividad específica de papaína al inicio y al término del proceso de inmovilización en zeolita.

El análisis preliminar de la capacidad proteolítica relativa de papaína inmovilizada en zeolita sobre fuentes proteicas, utilizadas usualmente en la elaboración de alimentos formulados para peces, mostró que la harina de pescado presentó el mayor valor relativo de hidrólisis y el menor correspondió a la harina de soya (Tabla 1).

Tabla 1. Hidrólisis relativa (%) de fuentes proteicas

Muestra	% Hidrolisis relativa
Harina de pescado	79.3
Harina de ave	66.3
Harina de soya	25.8

Se estima que las diferencias en la composición aminoacídica entre las fuentes proteicas influyeron en la capacidad hidrolítica de la papaína, las harinas de pescado y de ave, de fuente animal, presentan contenidos similares de aminoácidos en contraste con el de la harina de soya (Tacon et al., 2009). Se reporta que la papaína presenta 7 subsitios de enlace los cuales muestran afinidad estereoespecífica por residuos de la estructura del sustrato, como lisina, arginina, leucina, fenilalanina y valina (Schack y Kaarsholm, 1984), aminoácidos presentes en mayor concentración en las fuentes de harina animal analizadas con relación a la harina de soya (Martínez-Montaño et al, 2011; Parés-Sierra et al., 2014), lo cual se relaciona con la actividad proteolítica de la enzima sobre la proteína.

La papaína inmovilizada en zeolita mostró capacidad para hidrolizar fuentes proteicas utilizadas en la elaboración de alimentos para producción acuícola, lo cual muestra potencial para mejorar la digestibilidad de las dietas y su consecuente efecto en el desarrollo de organismos bajo cultivo. El efecto del uso de papaína en alimentación acuícola se ha evaluado en el cultivo de peces con resultados que denotan ventajas en su aplicación (Tewari y Ram, 2012; Munguti et al., 2014). De nuestro estudio se derivó, en forma preliminar, la alternativa de utilizar papaína inmovilizada en un soporte sólido para mejorar la digestibilidad de ingredientes proteicos, de la cual no se tienen antecedentes de su uso en alimentación animal. La inmovilización restringe el movimiento de la molécula del polipéptido, por efecto del ligado al soporte inerte mediante enlaces químicos, lo cual le aporta estabilidad a las proteínas. De esta forma, los dominios se mantienen en la orientación correcta para conservar la actividad por un mayor período de tiempo en comparación con la enzima en solución libre (Biasutti et al, 2006).

En el futuro será necesario el desarrollar estudios para determinar el grado de hidrólisis en diversos ingredientes proteicos, cinética y estabilidad de la papaína inmovilizada en diferentes condiciones fisicoquímicas y evaluar su efecto en la digestibilidad in vivo de alimentos formulados en organismos en condiciones de cultivo, para estimar la conveniencia del uso de la enzima en su forma inmovilizada.

Bibliografía

- Afaq, S., Iqbal, J., 2001. Immobilization and stabilization of papain on chelating sepharose: a metal chelate regenerable carrier. *Electronic Journal of Biotechnology*, 4 (3), 120-124.
- Biasutti, E., De Marco, L.M., Afonso, W.O., Silva, V.D.M., Lopes, D.C.F., Silvestre, M.P.C., 2006. Utilización de dos soportes para la inmovilización de la papaína. *Ars Pharmaceutica* 47(4), 425-435.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Chaiwut, P., Nitsawang, S., Shank, L., Kanasawud, P., 2007. A comparative study on properties and proteolytic components of papaya peel and latex proteases. *Chiang Mai Journal of Science* 34(1), 109-118.
- Corma, A., Fornes, V., Rey, F., 2002. Delaminated zeolites: an efficient support for enzymes. *Advanced Materials* 14(1), 71-74.
- Datta, S., Christena, L.R., Rajaram, Y.R.S., 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotech* 3, 1-9.
- Hyndman D., Burrell, R., Lever, G., Flynn, T.G., 1992. Protein immobilization to alumina supports: II. Papain immobilization to alumina via organophosphate linkers. *Biotechnology and Bioengineering* 40, 1328-1336
- Hlophe-Ginindza, S.N., Moyo, N.A.G., Ngambi, J.W., Ncube, I., 2015. The effect of exogenous enzyme supplementation on growth performance and digestive enzyme activities in *Oreochromis*

mossambicus fed kikuyu-based diets. *Aquaculture Research*, online 1 July 2015, 11 p.,

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/are.12828/epdf>.

Homaei, A.A., Sariri, R., Vianello, F., Stevanato, R., 2013. Enzyme immobilization: an update. *Journal of Chemical Biology* 6(4), 185-205.

Kamphuis, I.G., Kalk, K.H., Swarte, M.B., Drenth, J., 1984. Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 179, 233-256.

Llinàs, M.C., Sánchez-García, D., 2014. Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. *Afinidad* 565, 20-31.

Martínez-Montañó, E., Peña, E., Viana, M.T., 2011. In vitro amino acid absorption using hydrolysed sardine muscle or soybean meal at different intestinal regions of the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Aquaculture Nutrition* 17 (3), e789–e797.

Mukhopadhyay, K., Phadtare, S., Vinod, V.P., Kumar, A., Rao, M., Chaudhari, R.V., Sastry, M., 2003. Gold nanoparticles assembled on amine-functionalized Na-Y zeolite: a biocompatible surface for enzyme immobilization. *Langmuir* 19, 3858-3863.

Munguti, J.M., Ogello, E.O., Liti, D., Waidbacher, H., Straif, M., Zollitsch, W., 2014. Effects of pure and crude papain on the utilization and digestibility of diets containing hydrolysed feather meal by Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *International Journal of Advanced Research* 296), 809-822.

Parés-Sierra, G., Durazo, E., Ponce, M.A., Badillo, D., Correa-Reyes, G., Viana, M.T., 2014. Partial to total replacement of fishmeal by poultry by-product meal in diets for juvenile rainbow

trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their effect on fatty acids from muscle tissue and the time required to retrieve the effect. *Aquaculture Research* 45, 1459-1469.

Pond, W.G., Church, D.C., Pond, K.R., Schoknecht, P.A., 2005. *Basic Animal Nutrition and Feeding*. 5th ed., John Wiley and Sons Inc., 608 p.

Sarath, G., La Motte, S., Wagner, F.W., 1989. Protein assay methods. In: Beynon, R.J., Bond, J.S., *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, p. 25-55.

Schack, P., Kaarsholm, N.C. 1984. Subsite differences between the active centres of papaya peptidase A and papain as revealed by affinity chromatography. Purification of papaya peptidase A by ionic-strength-dependent affinity adsorption on an immobilized peptide inhibitor of papain. *Biochemical Journal* 219 (3), 727-33.

Smith, E., Schroeder, M., Guebitz, G., Shen, J., 2010. Covalent bonding of protease to different sized enteric polymers and their potential use in wool processing. *Enzyme and Microbial Technology* 47, 105-111.

Tacon, A.G.J., Metian, M., Hasan, M.R., 2009. *Feed ingredients and fertilizers for farmed aquatic animals*. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 540. Rome, FAO, 209 p.

Tewari, G., Ram, R. N., 2012. Role of plant based digestive enzyme 'papain' on growth performance of fingerlings of common carp, *Cyprinus carpio*. *International Journal of Agricultural and Statistical Sciences* 8(2), 611-617.

Thanh, N.T.K., Green, L.A.W., 2010. Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today* 5, 213-230.

Tran, D.N., Balkus, Jr., K.J., 2011. Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. ACS Catalysis 1, 956-968.