

UTILIZACION DEL HUESO DE POLLO PARA LA INMOVILIZACION DE ENZIMAS: I. INMOVILIZACION DE PAPAINA

Rubén D. Velásquez Miranda*, Carmen G. Castillo Narvaez**, Magda T. Flores López**, Nancy E. López Estrada**
Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC

RESUMEN

El hueso de pollo granular es un material que permite la inmovilización de enzimas por adsorción. En el presente estudio se pretendía ensayar la utilización del hueso de pollo para la inmovilización de papaína. Se produjo localmente, a pequeña escala, huso de pollo granular a partir de hueso de pollo crudo; un Kg. de éste rindió 109 gr. de material seco de distintos tamaños de partículas (mesh 12-60) y un costo de producción de aproximadamente Q.200.00/Kg. El hueso de pollo con partículas mesh 14-20 fue ensayado para determinar su capacidad y eficiencia como soporte para la inmovilización de papaína. Este mostró una capacidad de inmovilización de 10.84 ± 0.36 mg de papaína/gr. peso seco ($x \pm n=3$), la papaína inmovilizada fue activa y exhibió el 26.9 ± 5 por ciento ($x \pm n=3$) de su actividad de enzima nativa. Las pruebas de estabilidad indicaron que la papaína inmovilizada sobre el hueso es reutilizable, conservando en un segundo ensayo un 59-67 por ciento ($n=3$) de la actividad exhibida en el primero. Los resultados demostraron que sí es posible la producción local de hueso de pollo granular, y su utilización como material para la inmovilización de papaína.

INTRODUCCION

La inmovilización de un enzima

produce un material biocatalítico de difícil disolución y difusión. Desde el punto de vista de su utilización en procesos biotecnológicos, resulta deseable inmovilizar un enzima para permitir su retención en un reactor (1). Las enzimas inmovilizadas presentan múltiples ventajas en comparación con las solubles, entre las que destacan un mejor control del proceso, una mayor estabilidad y la posibilidad de reutilizar el biocatalítico. Por estos motivos, el uso de enzimas inmovilizadas se ha generalizado en la industria alimenticia, farmacéutica y química (1,2).

Se puede inmovilizar enzimas mediante procedimientos con los cuales se les adhiere, atrapa o entrecruza con un material de soporte. El material utilizado es el que determina en gran medida el método de inmovilización y las condiciones físicas del material biocatalítico resultante. Una serie de materiales orgánicos e inorgánicos poseen las condiciones adecuadas para tal fin, y han sido utilizados exitosamente para la inmovilización de enzimas (3,4). Generalmente, estos materiales son de difícil obtención en el país, debido principalmente a su costo y/o procedencia.

El hueso de pollo granular (HPG) es un material que ha sido empleado para la inmovilización de algunas enzimas, como la amiloglucosidasa, la glucosa isomerasa y para la coinmovilización de amiloglucosidasa y pullulanasa (5). El HPG es un

material de soporte muy adecuado puesto que (a) las enzimas pueden ser inmovilizadas por simple adsorción, sin necesidad de tratamiento químico para la unión, (b) el hueso es un producto natural, por lo que su uso es compatible con procesos de producción de alimentos y (c) es barato, por ser un producto de desecho (5). Por estas características, el HPG podría ser un material indicado para uso local. El presente estudio se realizó con el objetivo de ensayar, en nuestro medio, la utilización del HPG como material de soporte para la inmovilización de enzimas. En este informe se presentan los procedimientos y resultados de la producción a escala de laboratorio del HPG, y de su evaluación como soporte para la inmovilización de papaína.

MATERIALES Y METODOS

Materia prima y Químicos:

El pollo crudo para la obtención de los huesos fue adquirido en expendios ciudadanos; se separó el músculo, y los huesos se congelaron (-15°C) hasta el momento de su utilización. La papaína pura soluble (5XUSP 30,000 USP-U/mg) y la caseína tipo *Hamerstein* (para fines bioquímicos) fueron adquiridos de la compañía Merck (Darmstadt, Alemania). El resto de químicos fueron de la calidad más pura disponibles, y empleados sin tratamiento previo.

* Coordinador del Departamento de Bioquímica, Facultad de CC.QQ. y Farmacia, USAC/Edificio T-12, Ciudad Universitaria zona 12/01012 Ciudad de Guatemala/ FAX N.º: 769808.
** Estudiantes de la carrera de Químico Biólogo

Procesamiento del hueso de pollo:

La preparación del HPG se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento: El hueso de pollo crudo fue separado de los restos de músculo y sumergido en una solución 5% (p/v) de KOH por 48 hrs. Los huesos se cortaron transversalmente y fueron puestos nuevamente en KOH por otras 24 hrs. Al finalizar este período, éstos fueron lavados con abundante agua, posteriormente secados y lavados dos veces sucesivas con 3 volúmenes de hexano. Después de evaporar el hexano, los huesos fueron fragmentados con un molino (Wiley Mill, Modelo Nr. 3) a través de un tamiz N° 8 y posteriormente de uno N° 20. El material obtenido fue tamizado diferencialmente para separar las partículas en base a sus distintos tamaños.

Inmovilización de papaína sobre hueso de pollo:

1.0 ± 0.02 g de HPG (mesh 14-20) fueron agregados a 10 ml de una solución 10 mg/ml de papaína en buffer de acetatos 100 mmol/l, pH 4.5, y agitados orbitalmente a 23°C por 30 min. Al final de este tiempo el material biocatalítico obtenido (papaína-HPG) fue filtrado y lavado dos veces con 10 ml de buffer de acetatos. El lavado se repitió otras 2 veces utilizando buffer tris/HCl 50 mmol/l, pH 8.0 (buffer TH). La cantidad de proteínas totales en el filtrado y los lavados fue determinada por el método de Lowry (6), y por diferencia se calculó la cantidad de papaína (mg) retenida por unidad de peso seco (g) de HPG. Como control se llevó a cabo el mismo procedimiento de inmovilización, utilizando una solución de 10 mg/ml de albúmina en lugar de la solución de papaína.

Medición de la actividad del enzima inmovilizada:

La actividad catalítica de la papaína-HPG y del material control

(albúmina-HPG) fue determinada usando caseína como sustrato, mediante el método modificado de la USP XXI (7), descrito resumidamente a continuación: Se pesaron 200 ± 4 mg de papaína-HPG, y se añadió 0.5 ml de una solución 5 mmol/l de cisteína y 20 mmol/l de EDTA, se aforó a 10 ml con el buffer TH y se preincubó a 37°C por 5 minutos. Se agregó 1 ml de caseína al 1 por ciento (p/v) en buffer TH precalentada a 37°C, y se incubó la mezcla a 37°C agitando orbitalmente. Después de 10 minutos exactos de reacción la mezcla se filtró, al filtrado se le agregó inmediatamente 1 ml de ácido tricloroacético al 5 por ciento (p/v), y se dejó reposar para permitir la coagulación y precipitación de las proteínas. Se centrifugó por 10 minutos a 1000 rpm, se filtró el sobreabundante y los productos de la reacción se determinaron mediante espectrometría UV (280 nm). Paralelamente a los ensayos con papaína-HPG, se realizaron otros con albúmina-HPG (control) y con papaína soluble.

La actividad de la papaína inmovilizada (papaína-HPG) fue comparada con la actividad exhibida por una cantidad del enzima soluble. Además, para tener una idea de la estabilidad de la papaína inmovilizada y conocer si el material biocatalítico es reutilizable, se realizaron dos ensayos sucesivos de actividad enzimática, utilizando en ambos el mismo material biocatalítico. Una vez

terminado el primer ensayo el sustrato fue removido por filtración, la papaína-HPG se lavó cuatro veces con 10 volúmenes del buffer TH y se empleó en un segundo ensayo de actividad enzimática con sustrato fresco. Se calculó la actividad del biocatalítico en el segundo ensayo, y se expresó como porcentaje de la actividad exhibida en el primero.

RESULTADOS Y DISCUSION

El procedimiento del hueso de pollo crudo permitió obtener un material homogéneo y limpio, con una rigidez y peso específico que permitirían su uso tanto en reactores *batch*, como en reactores continuos de lecho fijo o fluidizo. Las dimensiones de las partículas variaron entre mesh 12 y 60; después de una selección en base al tamaño de partícula (tamizaje) se obtuvieron distintos materiales, cada uno con partículas de dimensiones determinadas; esto permitiría elegir un material adecuado para distintos requerimientos y aplicaciones. Un kilogramo de hueso rindió un total de 109 gr. de material seco (Tabla I). El costo de producción a pequeña escala fue de aproximadamente Q.200.00/Kg. Este es claramente inferior al precio de los materiales de soporte disponibles comercialmente. En una producción a gran escala su costo podría disminuir significativamente; además, hay que considerar que el hueso es un producto de desecho de algunas industrias alimenticias.

Tabla I. Hueso de pollo granular (HPG) producido a partir de 1 Kg de hueso de pollo crudo

Tamaño de partícula (N° de mesh)	Cantidad	
	Peso (g)	Relativa (%)
12-14	4.6	4.2
14-20	20.6	19.0
20-32	27.4	25.3
32-60	29.9	7.7
60	26.0	24.0
Total	108.5	100.0

El HPG fue utilizado para inmovilizar papaína. La capacidad de inmovilización se determinó midiendo la cantidad de proteína retenida por unidad de peso seco de HPG, y la eficiencia de la inmovilización comparando la actividad exhibida por unidad de peso de papaína inmovilizada con la actividad de una cantidad equivalente de enzima soluble. Los ensayos revelaron que el HPG (mesh 14-20) une 10.84 ± 0.36 mg de papaína/g peso seco ($x \pm$; $n=3$), este es un valor comparable con los reportados en la literatura: ligando de aluminato-organofosfatos utilizados como materiales de soporte unen entre 0.3 y 20.3 mg de papaína por gramo de material (8). Comparativamente, sólo 4.33 ± 0.20 mg de albúmina ($x \pm$; $n=3$) fueron unidos al HPG en el experimento control. La diferencia se explica en base al principio fisicoquímico de unión entre las proteínas y el HPG.

Las proteínas se inmovilizan sobre el hueso por simple adsorción, es decir no existe una unión covalente. La adsorción es un proceso fisicoquímico que resulta de interacciones electrostáticas, hidrofílicas e hidrofóbicas, y fuerzas de Van der Waals. El hueso está compuesto por un 80 por ciento de peso seco de hidroxapatita y un 19 por ciento de colágeno (9), la primera es un mineral cuya composición aproximada es $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3\text{Ca}(\text{OH})_2$, mientras que el colágeno es una proteína con un contenido significativo de 4-hidroxiprolina y 5-hidroxilisina (10). Ambos componentes, especialmente la hidroxapatita, poseen abundantes átomos de oxígeno con pares electrónicos no apareados que favorecen las interacciones electrostáticas con grupos cargados positivamente. La albúmina y la papaína presentan distintos valores de p*H*: 4.7 y 8.9, respectivamente (11, 12). Al p*H* en el que se realiza el proceso de

inmovilización (4.5), ambas proteínas están cargadas positivamente; la papaína posee un número considerablemente mayor de grupos aminoácídicos con carga positiva, lo que podría explicar su mayor afinidad hacia el HPG. Sin embargo no existe otro tipo de evidencia experimental que apoye esta explicación. El resto de factores que intervienen en los procesos de adsorción son difíciles de analizar separadamente.

La papaína inmovilizada sobre HPG exhibió el 26.9 ± 5 por ciento ($x \pm$; $n=3$) de la actividad de una cantidad equivalente del enzima soluble. La aparente disminución de la actividad enzimática se debe, probablemente, a las interacciones entre el soporte y el sustrato (hueso y caseína, respectivamente), y a la orientación geométrica inespecífica que adopta la enzima en relación al soporte. Las interacciones hueso-caseína pueden disminuir la concentración efectiva del sustrato, mientras que una posible unión de la papaína con su sitio activo dirigido hacia el hueso, dificultaría las interacciones sitio activo-sustrato.

Los resultados de capacidad y eficiencia de unión obtenidos experimentalmente son comparables a los reportados en la literatura, y podrían ser mejorados al optimizar las condiciones utilizadas en el proceso de inmovilización (buffer, p*H*, concentración de enzima, temperatura, y tiempo).

Las pruebas en que se utilizó la misma muestra del biocatalítico para dos ensayos sucesivos indican que la papaína inmovilizada sobre el HPG es reutilizable. En el segundo ensayo, la papaína exhibió 59-67 por ciento de la actividad observada en el primer ensayo ($n = 3$). Esta disminución de la actividad, más que representar inactivación de la papaína, se debe probablemente a la lixiviación del enzima durante el primer ensayo. La actividad enzimática se mide incu-

bando la mezcla enzima-sustrato a 37°C con agitación constante por más de 10 minutos. Estas condiciones, sumadas a la filtración y lavados posteriores, son suficientemente "rigurosas" como para causar el lavado de una porción del enzima inmovilizada.

A la fecha, aplicaciones industriales en las que la papaína inmovilizada podría utilizarse están en fase experimental. Por el contrario, este enzima en su forma soluble es utilizada desde hace algún tiempo en la industria. Por ejemplo, la papaína soluble se utiliza corrientemente en la fabricación de cerveza como un estabilizante que evita el enturbiamiento de la cerveza fría, esta práctica data desde 1911 (13). La estabilización de la cerveza con papaína, para evitar la floculación de la proteína contenida en la misma, tiene gran significado especialmente en aquellos países en donde se acostumbra almacenar la cerveza a temperaturas muy bajas (2). Algunos autores han especulado sobre la posibilidad de que en el futuro, la utilización de proteinasas inmovilizadas, como la papaína, (2) facilitará la estabilización de la cerveza.

CONCLUSIONES

La producción local de materiales que puedan ser utilizados para la inmovilización de enzimas, como el hueso de pollo granular, es posible mediante la utilización de materia prima, procedimientos y equipo de bajo costo, accesibles en el medio nacional.

El hueso de pollo procesado es un material que permite la inmovilización por adsorción de papaína, con capacidad y eficiencia de unión comparables a las reportadas en la literatura.

REFERENCIAS

1. Gacesa P, Hubble J. Enzyme Technology. England-USA: Open University Press-Taylor and Francis, 1987, viii+185p.
2. Brodelius P. Industrial Apliations of Immobilized Biocatalysts. pp.75-129. In: Ghose TK., Fiechter A., Blakebrough N. Advances in Biochemical Engineering. Vol 10. Heidelberg: Springer-Verlag, 1978. VIII+177p.
3. Uhling H. Enzyme arbeiten für uns: technische Enzyme und ihre Anwendung. München: Hansa, 1991. VIII+436 S.
4. Messing RA. Carriers for Immobilized Biologically Active Systems. pp.51-73. In: Ghose TK., Fiechter A., Blakebrough N. Advances in Biochemical Engineering. Vol 10. Heidelberg: Springer-Verlag, 1978. VIII+177p.
5. Schafhauser DY, Story KB. Co-immobilization of amyloglucosidase and pullulanase on to granular chicken bone for enhanced starch degradation. Biotechnol. Appl. Biochem., 1993;17:103-113.
6. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951;193-265-275.
7. The United States Pharmacopeia 21th. Rev. Rockville, Md.: US Pharmacopeial Convention, Inc., 1984. Lvii+1683p.
8. Hyndman D., Lever G., Burrell R., Flynn G. Protein Immobilization to alumina supports: I. Characterization of alumina-organophosphate ligand interactions and use in the attachment of papain. Biotechnol. Bioeng., 1992;40:1319-1327.
9. Kuchel PW., et al. Bioquímica General. Ramírez MC., Cortés DN., trads. México: McGraw-Hill, 1994. xii+698p.pp.145.
10. Lehninger AL. Principles of Biochemistry. New York: Worth Publishers, 1986. viii+1011p.pp.145,158.
11. Peters T, Jr. Serum albumin. pp.133-181 (p.147). In: Putnam FW, edit. The Plasma Protein; Structure, Function, and Genetic Control. 2 ed. New York: Academic Press, 1975. xvi+481p.
12. Glazer AN., Smith EL. Papain and other sulfhydryl proteolytic enzymes. pp.501-545. In: Boyer PD, edit. The Enzymes Vol. III. New York: Academic Press, 1971.
13. Wallerstein L.: US-Patent 995.825 (1911).

rank[®]
RANITIDINA

PARA UN AMANECER
 TRANQUILO Y SIN
 DOLOR

LABORATORIO
DONOVAN WERKE
 INTERNACIONAL 