



Effect of high voltage electric field on papain residual activity

Efecto del campo eléctrico de alto voltaje sobre la actividad residual de la papaina

María de Lourdes Meza-Jiménez^{1*}, Minerva Aurora Hernández-Gallegos¹, María Reyna Robles-López¹, Humberto Hernández-Sánchez¹, Raúl René Robles-de la Torre²

¹Departamento de Graduados en Alimentos, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Biotecnología Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Av. Wilfrido Massieu Esq. Cda. Miguel Stampa s/n, C.P. 07738 Delegación Gustavo A. Madero México D.F. ²Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700, México.*lulu1866@hotmail.com

ABSTRACT

Non-thermal technologies are an alternative to avoid or reduce the heat use or thermal energy on food preservation products. Some examples are High Voltage Electric Field (HVEF), Pulsed Electric Field and Ultrasound, among others. On this research HVEF was applied to papain to determine if it has some effect in papain residual activity (RA). A Central Compound Design (CCD) was conducted to treat the enzyme, after that papain RA was measured by Kunitz method. The factors studied were: electric field (EF) (2.15, 5.0 and 7.85 kV/cm) and time (1, 15.5 and 30 minutes). The results were analyzed by the ANOVA test; a quadratic response surface model was obtained. The residual activity of the treated enzyme was 89.9% and 92.8%, with 1 min of treatment at EF of 2.15 and 7.85 kV/cm, respectively. The main reduction in RA (AR=47.7%) was obtained at 7.85 kV and 30 minutes. It was observed that both factors decrease the RA, and interaction was also significant. Finally, according to our results HVEF is a non-thermal technology capable to affect papain enzymatic activity and this effect could be extended into others products.

Key words: High Voltage electric Field, Papain, and Residual Activity.

RESUMEN

Las tecnologías no térmicas son una alternativa para evitar o disminuir el uso de calor o energía térmica en la conservación de alimentos. Algunos ejemplos son Campo Eléctrico de Alto Voltaje (CEAV), Campo Eléctrico Pulsado, y Ultrasonido, entre otras. En este proyecto se aplicó CEAV a la papaína para determinar su efecto sobre la Actividad Residual (AR). Lo cual se realizó con un Diseño Central Compuesto (DCC), posteriormente se determinó la AR por el método de Kunitz. Los factores de estudio fueron Campo Eléctrico (CE) (2.15, 5.0 y 7.85 kV/cm) y tiempo (1, 15.5 y 30 minutos). Los resultados se analizaron por ANOVA obteniendo un modelo cuadrático de superficie respuesta. El menor efecto en la reducción de la AR fue de 89.8 y 92.8%, con 1 minuto de tratamiento en ambos casos y CE de 2.15 y 7.85 kV/cm. El principal efecto en la AR (AR = 47.7 %) con 7.85 kV y 30 minutos. Ambos factores modifican la AR, además se presentó interacción entre ambos para generar tal efecto. Finalmente, de acuerdo a los resultados el CEAV es una tecnología no térmica que afecta la actividad enzimática de la papaína y este efecto puede extenderse a otras enzimas.

Palabras clave: Actividad Residual, Campo Eléctrico de Alto Voltaje, and Papaina.

1. INTRODUCCIÓN

La papaína (EC 3.4.22.2) es una enzima que proviene del látex de la fruta de la papaya (Yeom et al., 1999). La enzima tiene diversas aplicaciones, en el área alimentaria, textil, farmacéutica, etc. Debido a ello la enzima ha sido objeto de diversas investigaciones en todo el mundo y actualmente se conocen todos sus niveles estructurales. Por otro lado, debido a los efectos adversos de algunas tecnologías de conservación de alimentos se han desarrollado y se siguen estudiando una serie de tecnologías no convencionales llamadas tecnologías emergentes, dentro de las cuales se pueden citar: Altas Presiones Hidrostáticas (APH), Ultrasonido (US), Microondas, Campo Eléctrico Pulsado (CEP) y Campo Eléctrico de Alto Voltaje (CEAV). El interés y la importancia de estas tecnologías radican en que utilizan menos energía o hacen un uso más eficiente de la misma, de tal suerte que también se conocen como Tecnologías no térmicas, por lo que pueden utilizarse para disminuir el deterioro en los alimentos causado por el efecto negativo de la energía térmica (Amri & Mamboya., 2012, Llerena-Suster et al., 2012, Katsaros et al., 2009, Castorena-García et al., 2013). Por lo tanto, la finalidad de este trabajo fue evaluar el efecto del Campo eléctrico de Alto Voltaje (CEAV), (una tecnología no térmica relativamente nueva y eficiente) sobre la actividad residual y poder inferir si la reducción en actividad pudiera deberse a cambios estructurales de la de la papaína.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La papaína grado alimentario, estandarizada con maltodextrina se adquirió en Enzimas Mexicanas (ENMEX), México. Para disolver la enzima se utilizó un regulador de acetatos con pH de 7.5, concentración 10 mM. Como sustrato para la enzima se utilizó caseína (MERCK, Alemania). La actividad enzimática se determinó en la muestra tratada y control mediante el método de Kunitz (280 nm). Los resultados se expresaron como porcentaje de Actividad Residual. Para los tratamientos con CEAV se utilizó el equipo diseñado y construido por personal del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA- IPN). El sistema está compuesto por: *a*) fuente de alto voltaje variable, con su unidad de control, *b*) Cámara de tratamiento con dos electrodos de acero inoxidable, arreglo en paralelo, diámetro 9.6 cm, *c*) modulador de frecuencia, (BEK Precision, 4011) y *d*) osciloscopio (Tecktronix TDS 1001 B®). El arreglo del equipo permite tratar las muestras sin que hay contacto con los electrodos por lo que no se tiene el efecto Joule. La temperatura del material se monitorea con un termómetro infrarrojo (Fluke 62 mini) para determinar los posibles cambios de temperatura en la muestra durante y después del tratamiento. Para el estudio se estableció un diseño experimental del tipo Central Compuesto (DCC), analizado a través de una Superficie de Respuesta, (SR) y el Análisis de Varianza usando el software de MiniTab. Los factores de estudio fueron intensidad de CE (2.15, 5.0, 7.85 kV/cm) y t (1.0, 15.5 y 30 minutos). Los niveles de campo eléctrico se establecieron con base a las características permitidas por el equipo, dentro de las cuales debe cuidarse la formación de arco eléctrico.

3. RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestra el resumen de los resultados del DCC mientras que en la Figura 1 se muestra la superficie de respuestas de la variable AR (Actividad Residual), en la Tabla 2 se presentan los resultados del ANOVA.

Tabla 1. Resumen de resultados de la Actividad Residual de la papaína tratada con el CE

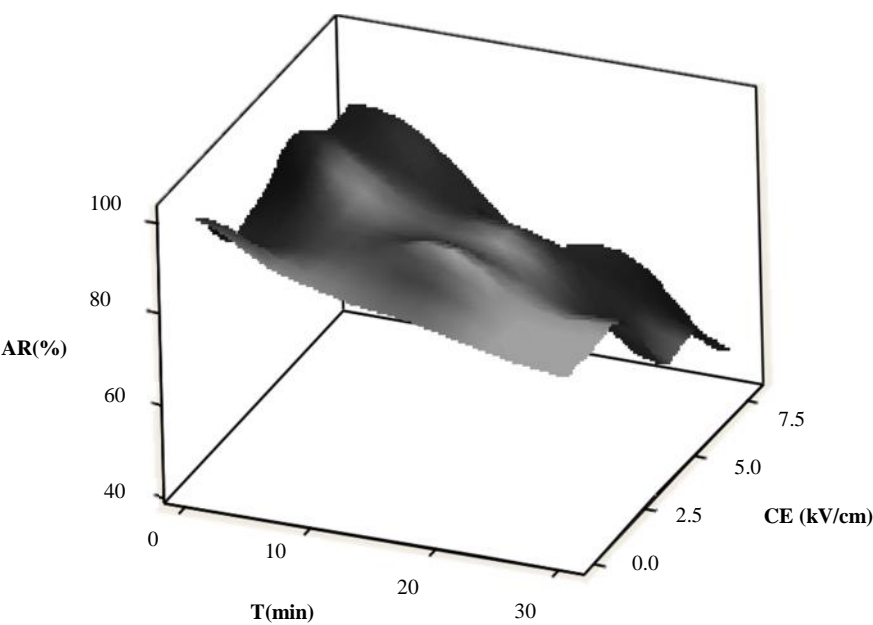
EDatos experimento Campo		Actividad Residual	
Tiempo(min)	(kV/cm)	Promedio	Desv-Est.
0	0	100	0.00
1	2.15	81.6	0.38
1	2.15	89.8	1.70
1	5	94.6	3.14
1	7.85	92.8	2.04
1	7.85	82.3	0.31

Datos experimento Campo		Actividad Residual	
Tiempo(min)	(kV/cm)	Promedio	Desv-Est.
30	2.15	79.1	5.033
30	2.15	80.1	3.321
30	5	58.4	1.143
30	7.85	42.2	0.141
30	7.85	53.2	3.769

Datos experimento Campo		Actividad Residual	
Tiempo(min)	(kV/cm)	Promedio	Desv-Est.
15.5	2.15	90.9	0.339
15.5	5	67.7	1.891
15.5	5	81.9	2.144
15.5	5	84	4.639
15.5	5	87.9	3.666
15.5	5	77	4.993
15.5	5	83.2	3.98
15.5	5	76.1	4.078
15.5	5	93.2	2.537
15.5	7.85	63.4	3.921

La enzima tratada con una baja intensidad de campo (2.15 kV/cm) en los diferentes tiempos (1, 15.5 y 30 minutos), tuvo un promedio en la AR de 91.73%. Conforme incrementó el tiempo de tratamiento existió un mayor efecto del mismo en la AR, llegando a una AR promedio de 84.3% a 30 minutos, en los 15.5 minutos se encontró una AR de 85.7 y 90.9% respectivamente. Lo mismo ocurrió con esta variable a nivel intermedio (5.0 kV/cm) donde al incrementar el tiempo, la actividad residual promedio disminuyó hasta llegar a 58.4% a los 30 minutos en comparación con 1 (94.6%) y 15 minutos (81.4%). En los tratamientos con una alta intensidad de campo eléctrico (7.85 kV/cm) se observó un mayor efecto sobre la AR al incrementar el tiempo. El mejor efecto en la AR se encontró con un campo de 7.85 kV/cm y 30 minutos de tratamiento, al obtener un promedio de AR de 47.7%. Comparada con 1 y 15 minutos donde se obtuvo 87.5 y 92.8% de AR respectivamente. Cabe resaltar que en tiempos cortos de tratamiento, al observar la AR de la enzima, se encuentra un efecto oscilante, mientras que la tendencia de la AR cuando se fija el tiempo en 15.5 minutos resulta en un descenso lento pero gradual. En la Figura 1 puede observarse el efecto global del tratamiento a través de la superficie de respuesta, se observa que al incrementar la intensidad de campo y/o el tiempo de tratamiento, la actividad residual de la enzima tiende a disminuir. Estos dos factores tienen un gran efecto en la reducción de la AR, lo anterior se refleja numéricamente en la Tabla del Análisis de Varianza (ANOVA)

(Tabla 2), donde ambos factores así como su interacción resultaron significativos, por lo tanto en términos generales se puede concluir que el campo eléctrico y el tiempo son factores que tienen un efecto notable para reducir la AR. El coeficiente de correlación múltiple ($R = 0.8882$) se considera aceptable. El efecto sobre la AR puede ser interpretado como un cambio en la estructura secundaria/terciaria de la proteína, (ya que resultados no publicados en este trabajo, acerca de mediciones instrumentales como infrarrojo y dicroísmo circular indican que la molécula de papaína se va modificando con el tratamiento con el campo eléctrico).



CE= Campo Eléctrico (kV/cm), T=Tiempo (minutos), AR = Actividad Residual (%).

Figura 1. Efecto del tratamiento con CEAV en la AR de la papaína, gráfica de superficie respuesta de % de AR, Campo (kV/cm) y tiempo (min).

Tabla 2. Tabla de ANOVA del modelo utilizado en el presente estudio.

Fuente	Suma Aj. de Cuadrados	Grados Libertad	Media Aj. de Cuadrados	Valor de F	Valor de P
Campo eléctrico (kV/cm)	845.27	2	422.64	8.09	0.0069
Tiempo (min)	1,708.45	2	854.23	16.35	0.0005
Campo*tiempo	705.74	4	176.44	3.38	0.0492
Residuos (error)	574.59	11	52.24		
Total	3,842.44	19			

4. DISCUSIONES

Los resultados del presente proyecto muestran claramente que la reducción de la AR de la enzima papaína se debe al efecto del campo eléctrico y el tiempo del tratamiento, dado que el monitoreo de la temperatura no mostró cambios importantes en la temperatura de la muestra ni aun después de los 30 minutos de tratamiento, teniendo incrementos de temperatura de 1 o 2 °C al final de los tratamientos más largos. De los dos factores resulta más significativo el tiempo de tratamiento a juzgar por su valor de F, sin embargo el efecto de campo eléctrico es de relevancia porque es quien aporta la fuerza necesaria para modificar la enzima, esto se confirma.

Se ha demostrado que estos factores también resultaron importantes en la inactivación de polifenol oxidasa (PPO), en la cual Castorena-García *et al.*, (2013) identificó una AR de 12%, de PPO obtenida en pulpa de aguacate desgrasada y liofilizada de la cual se obtuvo un extracto enzimático y se trató con campo eléctrico constante (9kV/cm) y un tiempo de tratamiento (3 minutos) empleando longitud de onda de forma cuadrada bajo un diseño experimental completamente aleatorio. La frecuencia constituyó otra variable de estudio a niveles de 0-760 kHz. Sin embargo, en este proyecto la frecuencia no fue considerada debido a que en estudios preeliminares no presentó efecto significativo en la AR de la papaína.

Debido a la escasa literatura presente acerca del efecto de CEAV en enzimas se realizó la comparación de nuestros resultados con la tecnología de Campo Eléctrico Pulsado, tal es el caso de Yeom *et al.*, 1999 quienes aplicaron Campo Eléctrico Pulsado (CEP) (20-50 kV/cm) a la papaína (duración de pulso 4 μ s; frecuencia 1500 pulsos y una velocidad de flujo de la enzima 0.77 ml/s (proceso continuo) almacenada por 0, 24 y 48 horas y determinando la actividad residual para cada tiempo). La AR obtenida por Yeom fue alrededor de 10% con 48 horas de almacenamiento la cual es comparada con una AR promedio 47.7 % obtenida en el presente proceso (proceso por lotes) con voltaje y tiempo altos, sin almacenamiento. Se obtuvo una menor reducción en la AR en el presente trabajo pero es de considerar que el campo utilizado fue menor.

Además cabe resaltar que los dispositivos de CEP requieren sólo unos pocos segundos para el tratamiento mientras que los dispositivos de CEAV utilizan varios minutos para alcanzar un efecto adecuado. También ha sido tratada la pectinmetil esterasa (PME) de diferentes fuentes de alimentos (plátano, tomate, naranja y zanahoria) por Campo Eléctrico Pulsado de Alta Intensidad (CEPAI) el tratamiento aplicado fue de 40 μ s con pulsos de onda cuadrada aplicando un tiempo de tratamiento de 1.6 μ s a 0.5 o 5 Hz y un campo eléctrico entre 13.2 y 19.1 kV/cm. La máxima inactivación fue de 45, 87, 87 y 83% para plátano, tomate, naranja y zanahoria, respectivamente (Espachs-Barroso *et al.*, 2006). Comparando con lo observado en la papaína el efecto principal se generó utilizando un campo de 7.85 kV/cm, menor al empleado en PME. Y el efecto en la papaína se logró con un largo periodo de tiempo comparado con CEPAI. El efecto mínimo en la actividad residual de la papaína se alcanzó con un campo eléctrico de 2.15 kV/cm. Para CEP se ha analizado que las variables principales que afectan a la inactivación enzimática son la intensidad de campo, duración, número de pulsos y forma de pulso. En este caso las variables que tuvieron efecto significativo en la inactivación son el voltaje y tiempo. Ohsima *et al.*, 2007 propuso que las enzimas generalmente son más resistentes que los microorganismos a CEP. Por ejemplo, después de la exposición a 20 pulsos de 0,7 μ s a 6,2 kV/cm la actividad de la proteasa de *Pseudomonas fluorescens* disminuyó en un 30%. Sin embargo, el mecanismo de inactivación de la enzima con el tratamiento CEP no está claro. Ahora, en el caso de la aplicación de CEP a enzimas existe una amplia gama de literatura que ha demostrado que el tratamiento con CEP puede reducir la actividad de las enzimas y su resistencia varía de enzima a enzima (Zaho *et al.*, 2012). En el presente trabajo se alcanzó un mayor porcentaje de inhibición pero utilizando un voltaje y tiempo más altos que los reportados por Ohsima *et al.*, 2007, finalmente la literatura manifiesta que los cambios conformacionales de las enzimas sometidas a CEP conducen a su desnaturalización (Ohsima *et al.*, 2007). Por ende, de acuerdo a lo expresado a lo largo del presente documento referente a la importancia de las enzimas en los alimentos la

inactivación enzimática es crítica en el procesamiento y preservación de los mismos. (Zaho *et al.*, 2012). El campo eléctrico como tecnología no térmica tiene la capacidad de disminuir la actividad enzimática de la papaína afectando la actividad residual en los tratamientos con CEAV con diferente intensidad, existiendo una interacción significativa entre los factores intensidad de campo y tiempo. Finalmente, podemos inferir que el efecto de reducción en la AR generada por el campo eléctrico puede deberse a modificaciones estructurales de la enzima, ya que mediciones instrumentales (no publicadas aquí) así lo indican.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

REFERENCIAS

- Amri E. & Mamboya F. 2012. Papain, a plant enzyme of biological importance: a review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8 (2): 99-104.
- Castorena-García J. H., Martínez Montes J. S., Robles-López M. R., Welti-Chanes J. S., Hernández-Sánchez H. & Robles-de-la-Torre R. R. 2013. Effect of electric fields on the activity of polyphenol oxidases. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12 (3): 391-400.
- Espachs-Barroso A., Loey A.V., Hendrickx M. & Martín-Belloso O. 2006. Inactivation of plant pectin methylesterase by thermal or high intensity pulsed electric field treatments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7:40 – 48.
- Katsaros G., Katapodis P. & Taoukis P. 2009. High hydrostatic pressure inactivation kinetics of the plant proteases ficin and papain. *Journal of Food Engineering*, 42-48.
- Llerena-Suster C., José C., Collins S., Briand L. & Morcelle S. 2012. Investigation of the structure and proteolytic activity of papain in aqueous miscible organic media. *Process Biochemistry*, 47: 47-56.
- Ohsima, T., Tamura T. & Sato M. 2007. Influence of pulsed electric field on various enzyme activities. *Journal of Electrostatics*, 65:156-161.
- Yeom H. W., Zhang H. & Patrick D. 1999. Inactivation of papain by pulsed electric fields in a continuous system. *Food Chemistry*, 67:53-59.
- Zaho W., Yang R. & Zhang H.Q. 2012. Recent advances in the action of pulsed electric fields on enzymes and food component proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 83-96.