



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**INMOVILIZACIÓN DE PROTEASAS ÁCIDAS DE
ESTÓMAGO DE SARDINA MONTEREY (*Sardinops sagax
caerulea*) EN SOPORTES A BASE DE QUITINA Y
QUITOSANO**

Por:

Jesús Aarón Salazar Leyva

TESIS APROBADA POR LA
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de


DOCTOR EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora


Enero 2014

APROBACIÓN

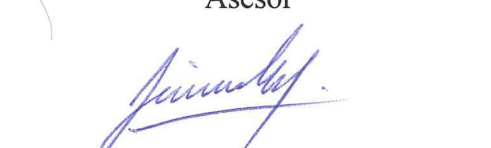
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Jesús Aarón Salazar Leyva, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias



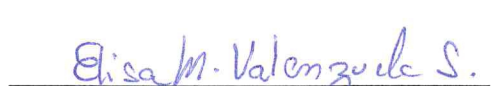
Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Director de Tesis




Dr. Juan Carlos Ramírez Suarez
Asesor



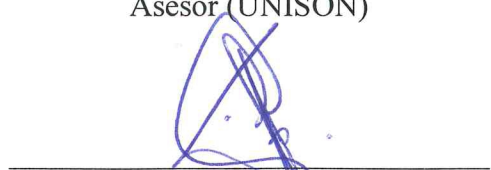
Dr. Jaime Lizardi Mendoza
Asesor



Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto
Asesor



Dra. Josafat Marina Ezquerro Brauer
Asesor (UNISON)



Dr. Francisco Javier Castillo Yañez
Asesor (UNISON)

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., (CIAD) por haberme aceptado en su Programa de Doctorado y con ello permitirme adquirir una formación científica de alta calidad.

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Politécnica de Sinaloa, por el apoyo e impulso brindado para la realización y culminación de mis estudios de Doctorado.

A mi Director de Tesis, Dr. Ramón Pacheco Aguilar por todas sus enseñanzas transmitidas desde etapas tempranas de mi formación profesional. Agradezco la confianza que tuvo hacia mi persona para realizar una tesis doctoral bajo su tutela. Sin duda sus prácticos consejos me serán de gran utilidad tanto en el ámbito personal como profesional.

A cada uno de los miembros de mi comité de tesis:

Dr. Juan Carlos Ramírez Suarez, gracias por el apoyo y enseñanzas transmitidas, sobre todo en lo relacionado con la redacción de los manuscritos.

Dr. Jaime Lizardi Mendoza, gracias por sus valiosas aportaciones, las cuales fueron de gran relevancia para que la idea inicial del proyecto de tesis se convirtiera en una realidad.

Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto, sin duda su guía durante el primer semestre fue de gran importancia, ayudándome bastante a “ordenar” las ideas y delimitar el trabajo de investigación.

Dra. Josafat Marina Ezquerro Brauer, gracias por haber sido parte de mi formación, desde la etapa de Licenciatura hasta Doctorado. Agradezco además su apoyo y amistad incondicional.

Dr. Francisco Javier Castillo Yañez, gracias por sus valiosos comentarios y disposición para que este trabajo de investigación saliera adelante.

A todo el grupo del Laboratorio de Bioquímica y Calidad de Productos Pesqueros (LBCPP): Dra. Susana Scheuren Acevedo, Dra. Teresa Gollas Galván, Dra. Celia Olivia García Sifuentes, Dr. Marcel Martínez Porchas, M.C. Aristeo Villalobos Rodríguez. Asimismo expreso un especial agradecimiento al trío dinámico del LBCPP:

Maestra María Elena Lugo Sánchez: Gracias por su excelente disponibilidad y apoyo para que muchas cosas en el laboratorio “caminaran” adecuadamente. Además

agradezco sus charlas en el laboratorio, que siempre le ponían “sal y pimienta” a las jornadas de trabajo.

Maestra Guillermina García Sánchez: Agradezco el apoyo brindado durante toda mi estancia en el LBCPP, pero sobre todo la ayuda brindada cuando estaba recién llegado a CIAD, la cual me fue de gran utilidad para ubicarme y sentirme en confianza en un nuevo entorno de trabajo.

Maestra M. Gisela Carvallo Ruíz: Gracias por mostrar siempre una excelente actitud hacia el trabajo. Agradezco su ayuda para la adquisición de las muestras de sardina, así como también su asesoría en el reconocimiento del sistema digestivo de las sardinas.

A mis compañeros del LBCPP, de antes y de hoy: Ana Gloria, Marco, Gabriel, Carlos, Mario, Andrés, Wendy y Hugo.

Al personal del Laboratorio de Biopolímeros de CIAD: Q.B. Alma Campa Mada, M.C. Alma Rosa Toledo y en especial al Dr. Jaime Lizardi Mendoza y M.C. Karla Gpe. Martínez Robinson, por su asistencia técnica en lo relacionado a la extracción de quitina y uso del FTIR.

A la Dra. Gloria Yépiz Plascencia, por su excelente trabajo en la Coordinación de Programas Académicos, así como también al personal de la mencionada coordinación, por su amable atención.

Al personal de biblioteca, Gerardo Reyna, Fernando Alejo y Luis Conde por su amable y eficiente atención en el momento requerido.

A mis compañeros del Posgrado (y del comedor): Alonso, Jorge, Gonzalo, Adriana, Ana Luisa, Karina, Hugo (otra vez), Rey David (de vez en cuando iba al comedor), Juan Pablo, Monserrath, José Alfredo. Sin duda muchos de los antes mencionados se convirtieron en mis amigos, les doy las gracias por eso.

Un especial agradecimiento a mi segunda familia en Hermosillo: Sra. María Luisa, Tía Martha, Memo, Lore, Memito, Hertha y Paco (compa de toda la vida) y sus “Romeritos”. Gracias por hacerme pasar momentos muy agradables a su lado, y por haberme adoptado como un miembro más de su familia.

DEDICATORIA

A mis padres: Manuel Salazar Chávez (Q.E.P.D.) y María del Rosario Leyva Solorzano.

Su gran ejemplo de vida me enseñó a siempre “ir por más”

A mis hermanos: Carlos, Marisol y Charis.

De alguna manera cada uno de ustedes me ha influenciado e inspirado a alcanzar mis metas y seguir adelante. Gracias hermanos.

A mis mujeres: Idalia, Camila y Sofía.

Son mi motor y mayor fuente de inspiración. Las amo.

CONTENIDO

	Página
SINOPSIS.....	1
CAPÍTULO I. Revisión del estado del arte de la temática en estudio.....	17
CAPÍTULO II. Diseño de un sistema biocatalítico inmovilizado compuesto de proteasas ácidas aisladas de estómagos de sardina Monterey (<i>Sardinops sagax caerulea</i>) y soportes a base de quitina y quitosano obtenidos de cabezas de camarón (<i>Penaeus spp.</i>).....	40
CAPÍTULO III. Obtención de las condiciones óptimas de inmovilización de proteasas ácidas de sardina Monterey (<i>Sardinops sagax caerulea</i>) en soportes de quitina parcialmente desacetilada.....	52
CAPÍTULO IV. Caracterización bioquímica y operacional de proteasas ácidas de sardina Monterey (<i>Sardinops sagax caerulea</i>) inmovilizadas en quitina parcialmente desacetilada.....	79
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN.....	112

NOTA: Las páginas de los capítulos I y II corresponden a la compaginación asignada por la revista donde se publicaron los artículos.

RESUMEN

Actualmente la mitad de la captura pesquera mundial es considerada como desechos o subproductos de proceso. Generalmente, estos desechos son dispuestos al ambiente de forma indebida ocasionando serios problemas de contaminación. Debido a lo anterior y para obtener un beneficio a partir de estos desechos de la pesca, es que se planteó el presente estudio. El mismo consistió en la extracción de compuestos valiosos a partir de cabezas de camarón y vísceras de sardina Monterey, con la finalidad de obtener y caracterizar un sistema biocatalítico inmovilizado.

Se realizó la inmovilización de un extracto semipurificado de proteasas ácidas obtenido de estómagos de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) en diferentes soportes de inmovilización como esferas de quitosano, hojuelas de quitosano y hojuelas de quitina parcialmente desacetilada. Los diferentes soportes fueron activados con genipina (inmovilización covalente) y tripolifosfato de sodio (inmovilización iónica). Los sistemas de inmovilización con esferas de quitosano fueron los que presentaron la mayor capacidad de unir proteína (mg proteína/g soporte) pero a su vez exhibieron la menor retención de actividad proteolítica. El sistema de inmovilización que presentó la mayor retención de actividad enzimática ($P < 0.05$) fue el constituido por hojuelas de quitina parcialmente desacetilada activadas con tripolifosfato de sodio. Por lo tanto, este sistema fue caracterizado bioquímica y operacionalmente.

Las proteasas inmovilizadas presentaron su máxima actividad enzimática a 50°C, diez grados por arriba de la temperatura óptima de las proteasas solubles. Asimismo, la estabilidad térmica de las proteasas inmovilizadas fue mayor ($P < 0.05$) que la de las proteasas sin inmovilizar. El pH óptimo de reacción, tanto de las proteasas solubles como inmovilizadas se mantuvo en 2; sin embargo, las proteasas inmovilizadas presentaron mayor estabilidad a este pH que su contraparte soluble. El sistema biocatalítico mantuvo el 40.7% de su actividad enzimática inicial después de dos ciclos de reacción. La estabilidad al almacenamiento a 6 y 25°C de las proteasas ácidas de sardina fue influida positivamente por el proceso de inmovilización, observándose que

después de 60 días de almacenamiento las proteasas inmovilizadas presentaron una mayor actividad enzimática residual ($P < 0.05$) que las proteasas solubles.

Los resultados obtenidos indican que el proceso de inmovilización aplicado confiere efectos positivos en las características bioquímicas y de estabilidad operacional de las proteasas ácidas provenientes de vísceras de sardina Monterey potenciando su aplicación como herramienta biotecnológica.

Palabras clave: Proteasas, inmovilización, quitina, desechos de la pesca

ABSTRACT

Nowadays half of total weight of worldwide fisheries is considered as byproducts. Generally, these byproducts are wasted and dumped to the milieu constituting a serious environmental problem. Thus, the recovery of valuable biomolecules from seafood byproducts (fish viscera and shrimp head waste) was conducted in the present study as a means to obtain and characterize a biocatalytic immobilized system.

Semipurified acidic proteases from Monterey sardine stomachs (*Sardinops sagax caerulea*) were immobilized onto chitin and chitosan materials extracted from shrimp head waste. Several supports (chitosan beads, chitosan flakes, and partially deacetylated flakes) were activated either with genipin (covalent immobilization) or Na-tripolyphosphate (ionic immobilization). The immobilization systems based on chitosan beads achieved the highest protein loads (mg protein/g support) but showed the lowest retained catalytic activities. The best catalytic behavior was obtained using partially deacetylated chitin flakes activated either with genipin or Na-tripolyphosphate. The higher activity retention ($P < 0.05$) was achieved when Na- tripolyphosphate was used as crosslinker, therefore this immobilized system was further characterized.

The optimum temperature for free and immobilized proteases was 40 and 50°C, respectively. Thermal stability of immobilized proteases was greater ($P < 0.05$) than free proteases. Maximal enzyme activity of free and immobilized proteases was detected at pH 2, pH value where the immobilized form showed higher stability than free enzymes. Reusability studies showed that after a second catalytic cycle, the immobilized system maintain around 40% of enzyme activity. The immobilization process enhanced the long term storage stability of sardine acidic proteases with respect to free enzymes at 6 and 25°C.

Results suggest that immobilization process influence the biochemical and operational features of acidic sardine proteases in a positive way; thus, the potential of application of these enzymes, as a biotechnological tool, is improved.

Keywords: Proteases, immobilization, chitin, seafood byproducts

SINOPSIS

Subproductos de la Pesca y Recuperación de Compuestos de Interés Industrial

No existe una definición clara y universal de subproductos de la pesca. Usualmente, las vísceras, cabezas, huesos, piel, organismos marinos dañados (no aptos para consumo humano o posterior procesamiento) y fauna de acompañamiento pueden ser considerados como subproductos de la pesca (Rustad, 2003). Por ejemplo en Noruega, un “subproducto” es definido como aquellos productos que no pueden ser comercializados de forma ordinaria, pero que pueden ser sometidos a algún proceso de transformación para proporcionarles un valor comercial. Otro término importante es el de “desecho” el cual incluye a los productos que no pueden ser usados para alimentación o para generación de productos con valor agregado, por lo cual son generalmente utilizados como composta o son incinerados (Rustad et al., 2011).

Es importante mencionar, que además del término “subproducto” en la literatura especializada se manejan otros términos diferentes, tales como “coproductos”, “desechos pesqueros”, “masa visceral”, “descartes pesqueros”, entre otros (Rustad, 2003; He et al., 2013). De ahí que, en este trabajo se utilizará preferente el termino subproducto.

Considerando todos los tipos de alimentos, son los de origen marino los que generan la mayor cantidad de desechos y subproductos cuando son procesados para consumo humano (Ferraro et al., 2013). Por ejemplo el porcentaje de subproductos generados por la industria pesquera representa alrededor del 50% en peso de la materia prima inicial (Bechtel, 2003). En este contexto, los mencionados subproductos también representan un problema ecológico debido a su manejo inadecuado ya que existe evidencia de que aproximadamente entre 18 y 30 millones de toneladas de subproductos de la pesca son dispuestos de manera inadecuada hacia el ambiente, ya sea arrojándolos directamente al mar o en las costas, muelles, embarcaderos, etc. (Arvanitoyannis y Kassaveti, 2008; Elvevoll, 2004). Debido a la alta carga de materia orgánica de los

subproductos de la pesca, en algunos países éstos son clasificados como “desechos certificados” por lo que su deposición implica mayores costos (He et al., 2013).

En contraste a lo antes expuesto, los subproductos y desechos de la pesca se consideran una abundante fuente de biomoléculas de interés industrial, las cuales en algunos casos poseen un mayor valor monetario que la materia prima inicial. Los ejemplos más comunes de compuestos valiosos que pueden ser extraídos de subproductos de la pesca son los ácidos grasos poli-insaturados (ω -3 y ω -6), aminoácidos libres, quitina/quitosano, colágeno/gelatina, hidroxiapatita, astaxantina, y enzimas, principalmente proteasas. En algunos casos su contenido puede ser tan alto como el 80%, dependiendo del subproducto en cuestión. El costo en el mercado de los compuestos extraídos va a depender del grado de pureza de los mismos. (Ferraro et al., 2013; Ferraro et al., 2010).

A pesar de esto, generalmente los subproductos y desechos de la pesca son utilizados para producir ensilados, fertilizantes y alimentos para animales, lo cual produce ganancias monetarias muy bajas, de aproximadamente 50 centavos de dólar (USD) por tonelada (Bechtel, 2003; Dumay et al., 2006). Un ejemplo del valor agregado que puede representar el correcto aprovechamiento de los subproductos de la pesca es el colágeno y la gelatina, las cuales siendo de las biomoléculas de origen marino y de interés industrial con menor precio en el mercado (12-19 USD/Kg) tienen un valor de aproximadamente 30 veces mayor al de la harina de pescado (He et al., 2013).

Como se mencionó anteriormente, dos ejemplos comunes de biomoléculas de interés industrial que se encuentran en gran abundancia en los subproductos de la pesca son la quitina y las enzimas proteolíticas. A continuación se abordarán aspectos generales de las principales fuentes de obtención, propiedades y aplicaciones de estos compuestos.

Quitina y su Derivado el Quitosano

La quitina es un polisacárido estructural que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, particularmente en el exoesqueleto de artrópodos

(crustáceos e insectos) y en la pared celular de algunos hongos y otros organismos (Díaz-Rojas et al., 2006).

Kurita (2006), menciona que desde el punto de vista químico la quitina es un polímero de glucosas que se encuentran unidas por enlaces β -(1-4). El principal derivado de la quitina es el quitosano, el cual estructuralmente se considera como la forma desacetilada de la quitina.

La materia prima más utilizada para la obtención industrial de quitina y quitosano son los subproductos generados por la industria pesquera (caparazones de crustáceos, principalmente). De acuerdo a Ravi-Kumar (2000) los estados de la Unión Americana: Oregon, Washington y Virginia, y Japón son los mayores productores de quitina y quitosano en el mundo, mientras que países como Noruega, México y Chile poseen una gran cantidad de recursos marinos que no son explotados en su totalidad para este propósito. Se estima que la industria de la captura, acuicultura y procesado de crustáceos y moluscos (langostinos, camarones, cangrejos, centollas, langostas y calamares) genera anualmente aproximadamente 170,000 toneladas de desechos sólidos que pueden ser aprovechados para la extracción de estos polisacáridos (Goycoolea et al., 2004).

Debido a que la quitina y el quitosano presentan propiedades fisicoquímicas y funcionales únicas, estos compuestos tienen un gran campo de aplicación, incluyendo áreas tan diversas como la industria cosmética, biomédica, ambiental, de alimentos, entre otras (Bautista-Baños et al., 2006; Honarkar y Barikani, 2009; Khor y Lim, 2003).

Proteasas Provenientes del Sistema Digestivo de Peces

De acuerdo al último reporte de mercado de enzimas industriales (2013), las proteasas constituyen al grupo de enzimas más importantes desde el punto de vista de aplicación industrial. Estos biocatalizadores abarcan aproximadamente el 50% del mercado total de enzimas industriales, y esto se debe al gran espectro de aplicaciones que poseen en la industria de los detergentes, alimentos, farmacéutica, y diversos campos de investigación básica (Gupta et al., 2002; Turk, 2006).

Las vísceras de peces constituyen aproximadamente el 20% de la biomasa marina, y son una rica fuente de proteasas digestivas. En caso de no ser utilizada, esta biomasa puede ser descartada ya sea como desecho o subproducto de la pesca (Bougatef, 2013). De ahí que la recuperación de proteasas a partir de subproductos de la pesca representa una alternativa para su aprovechamiento ayudando por un lado, a disminuir los problemas ecológicos que causa el manejo incorrecto de estos subproductos y por otro lado surge la posibilidad de producir sistemas biocatalíticos de bajo costo que pudieran ser utilizados como herramienta biotecnológica en algún proceso de interés industrial (Haard, 1992).

Aplicaciones de Proteasas Digestivas de Peces

En lo referente a todos los tipos de enzimas de origen marino, las proteasas son las que indudablemente presentan una mayor posibilidad de aplicación comercial. La pepsina, tripsina y quimotripsina son las principales enzimas proteolíticas encontradas en las vísceras de peces pelágicos. La pepsina se localiza en los estómagos, mientras que tripsina y quimotripsina se concentran en los ciegos pilóricos e intestinos de los peces (Gildberg, 1988; Martinez y Serra, 1989). La pepsina de bacalao (*Gadus morhua*) es quizá la proteasa que más se ha extraído en volumen a partir de subproductos de la pesca seguida de colagenasa, elastasa, tripsina y quimotripsina, así como también se han extraído en menor proporción enzimas no proteolíticas, tales como transglutaminasa, lipasas y enzimas quitinolíticas (Rasmussen y Morrissey, 2007).

Los ejemplos más relevantes de aplicación de las proteasas de peces son la producción de salsa, ensilados e hidrolizados de pescado, recuperación de pigmentos de caparazones de crustáceos, producción y maduración de quesos, remoción de piel de peces y organismos acuáticos invertebrados, remoción de exoesqueletos de crustáceos, reducción de viscosidad de aguas residuales, producción de detergentes, ablandamiento de carnes, extracción enzimática de aceite, entre otras (Espósito et al., 2009; Mazorra-Manzano et al., 2012; Raksakulthai et al., 2002; Shahidi y Janak Kamil, 2001; Sila et al., 2012).

No obstante a la gran diversidad de aplicaciones de las proteasas de peces actualmente la información relacionada con el mercado y aplicaciones comerciales de estas enzimas es poco confiable, pero indudablemente la recuperación de proteasas a partir de vísceras de peces puede ser un proceso redituable. Un ejemplo de lo anterior es el precio de las proteasas extraídas de bacalao, cuyo valor aproximado en el mercado es de alrededor de 20,000 USD por kilogramo (Ferraro et al., 2010; Rasmussen et al., 2007). De ahí deriva que actualmente varios trabajos de investigación estén encaminados al diseño de procesos de purificación más eficientes y estabilización estructural de las proteasas digestivas de peces para con ello aumentar el potencial de aplicación de estos biocatalizadores (Ferraro et al., 2013).

Inmovilización de Enzimas Digestivas de Peces

De forma general, es aceptado que a nivel estructural las enzimas son moléculas sensibles e inestables a ciertos agentes externos, como por ejemplo las temperaturas elevadas, medios de reacción no polares, entre otros (Singh et al., 2013). De ahí que a través del tiempo han surgido distintas estrategias para obtener “enzimas estables” y con ello aumentar la posibilidad de aplicación de estos biocatalizadores. En relación a esto, varios autores coinciden en que la inmovilización de enzimas es una metodología que influye positivamente en la estabilidad estructural de estas moléculas (Cowan y Fernandez-Lafuente, 2011; Janeček, 1993; Mateo et al., 2007). En este mismo sentido son varios los estudios que se han enfocado en la inmovilización de enzimas digestivas de peces.

Por ejemplo, Kurtovic et al., (2011) inmovilizaron una lipasa aislada de ciegos pilóricos de salmón (*Oncorhynchus tshawytscha*) en octil-sefarosa (OS), el cual es un soporte hidrofóbico. En este estudio se encontró que la temperatura óptima de reacción de la lipasa inmovilizada fue de 45°C, y la de la lipasa soluble fue de 35°C, lo que indicó que la estructura de la lipasa fue estabilizada debido al proceso de inmovilización. De la misma forma Aryee y Simpson (2012) inmovilizaron una lipasa purificada a partir de vísceras de lisa (*Mugil cephalus*) en un soporte de OS, encontrando también un incremento de 10°C de la temperatura óptima de la lipasa inmovilizada con respecto a la

enzima soluble. Adicionalmente en este mismo estudio se observó que la lipasa inmovilizada exhibió una mayor actividad hidrolítica sobre *p*-fenil-palmitato en la zona de pH alcalino (8.5-10) respecto a la lipasa soluble. También el proceso de inmovilización aumentó la estabilidad al almacenamiento y la enzima pudo ser reutilizada tres veces con cambios mínimos en su actividad.

En lo referente a enzimas proteolíticas, se ha reportado la inmovilización de proteasas alcalinas principalmente. Amaral et al., (2006) inmovilizaron tripsina de tilapia (*Oreochromis niloticus*) en partículas de tereftalato de polietileno entrecruzadas con glutaraldehído. La tripsina inmovilizada fue reusada 8 veces con cambios mínimos en la actividad proteolítica, y presentó además mayor estabilidad a la temperatura que la tripsina soluble. En otro trabajo, Li et al., (2013) inmovilizaron tripsina aislada de páncreas de perca (*Taufogolabrus adspersus*) en esferas de sílice entrecruzadas con glutaraldehído con la finalidad de aplicarla en la inactivación de la enzima pectina-metil-esterasa (PME) cuya acción hidrolítica sobre la pectina causa problemas de calidad en jugos de cítricos y tomate. Los resultados de este estudio indicaron que la tripsina de perca inmovilizada presentó una mayor eficiencia en la inactivación de la PME que una tripsina de bovino inmovilizada bajo las condiciones antes mencionadas. Por otro lado, Geethanjali y Subash (2013) inmovilizaron por atrapamiento en esferas de alginato un extracto de proteasas alcalinas provenientes de intestinos de carpa hindú (*Labeo rohita*). Aunque no se encontró un efecto del proceso de inmovilización sobre el pH óptimo de reacción se observó que las proteasas inmovilizadas presentaron mayor actividad enzimática que las proteasas solubles a pH alcalino (9), lo cual se relaciona con las características aniónicas del alginato. La temperatura óptima de reacción (40°C) fue la misma para las proteasas solubles e inmovilizadas, aunque se encontró que a 50°C las proteasas inmovilizadas presentaron un 98% de actividad enzimática, mientras que las proteasas solubles presentaron solo un 48% de actividad.

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se llevó a cabo la recuperación de compuestos de interés industrial como lo son enzimas proteolíticas y quitina y sus derivados a partir de subproductos que actualmente son subutilizados o simplemente desechados por la industria pesquera Mexicana. Los compuestos recuperados fueron

utilizados para diseñar un sistema biocatalítico compuesto de proteasas ácidas aisladas de estómagos de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) inmovilizadas en soportes a base de quitina y quitosano obtenidos a partir de cabezas de camarón (*Penaeus spp.*).

Hipótesis

La inmovilización de proteasas ácidas de estómago de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) en soportes a base de quitina y quitosano aumentará la estabilidad bioquímica y operacional de las enzimas inmovilizadas con respecto a un extracto de proteasas ácidas sin inmovilizar.

Objetivo General

Obtener y caracterizar proteasas ácidas de estómago de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) inmovilizadas en soportes a base de quitina y quitosano.

Desarrollo del Trabajo de Investigación

Se dividió en cuatro etapas principales:

1. Revisión del estado del arte de la temática en estudio.
2. Diseño de un sistema biocatalítico inmovilizado compuesto de proteasas ácidas aisladas de estómago de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) y soportes a base de quitina y quitosano obtenidos de cabezas de camarón (*Penaeus spp.*).
3. Obtención de las condiciones óptimas de inmovilización de proteasas ácidas de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) en soportes de quitina parcialmente desacetilada.
4. Caracterización bioquímica y operacional de proteasas ácidas de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) inmovilizadas en quitina parcialmente desacetilada.

A continuación se describen en capítulos los resultados obtenidos, ordenados de acuerdo a las etapas mencionadas previamente.

CAPÍTULO I. Revisión del estado del arte de la temática en estudio.

A partir de la revisión del estado del arte de la temática estudiada se logró generar un artículo de revisión titulado “Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efectos en su estabilización y aplicaciones”, el cual se encuentra actualmente aceptado para publicación en la Revista Mexicana de Ingeniería Química. La información revisada muestra como la inmovilización de proteasas en soportes a base de quitina y quitosano puede llegar a inducir cambios a nivel estructural de los sistemas catalíticos inmovilizados y por ende mejorar sus características de reacción y estabilidad operacional. Además se discuten algunas aplicaciones de las proteasas inmovilizadas en diferentes procesos de interés industrial.

CAPÍTULO II. Diseño de un sistema biocatalítico inmovilizado compuesto de proteasas ácidas aisladas de estómago de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) y soportes a base de quitina y quitosano obtenidos de cabezas de camarón (*Penaeus spp.*).

En este capítulo se muestran los resultados del primer artículo original publicado derivado del trabajo de tesis, el cual se titula “Acidic Proteases from Monterey Sardine (*Sardinops sagax caerulea*) Immobilized on Shrimp Waste Chitin and Chitosan Supports: Searching for a By-product Catalytic System”. En este estudio se llevó a cabo la inmovilización de un extracto semipurificado de proteasas ácidas obtenido de estómagos de sardina Monterey. Los soportes de inmovilización utilizados fueron esferas de quitosano, hojuelas de quitosano y hojuelas de quitina parcialmente desacetilada. Los diferentes soportes fueron activados con genipina (inmovilización covalente) y tripolifosfato de sodio (inmovilización iónica). La capacidad para adsorber proteína de los diferentes soportes estuvo en el rango del 67 al 91%. Los sistemas de inmovilización donde se utilizaron esferas de quitosano como soporte fueron los que presentaron la mayor capacidad de unir proteína (mg proteína/g soporte) pero a su vez exhibieron la menor retención de actividad proteolítica. La mayor retención de actividad enzimática fue obtenida utilizando soportes de hojuelas de quitina parcialmente desacetilada activadas ya sea con genipina y tripolifosfato de sodio. Los resultados obtenidos indican que tanto la estructura del soporte de inmovilización así como el grado

de acetilación de los materiales quitinosos utilizados tienen una influencia considerable sobre la actividad catalítica de las proteasas inmovilizadas. El sistema de inmovilización que presentó la mayor retención de actividad enzimática ($P < 0.05$) fue el constituido por hojuelas de quitina parcialmente desacetilada activadas con tripolifosfato de sodio, por lo que este sistema fue utilizado para los estudios posteriores.

CAPÍTULO III. Obtención de las condiciones óptimas de inmovilización de proteasas ácidas de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) en soportes de quitina parcialmente desacetilada.

En este capítulo se incluyen los resultados del artículo original titulado “Optimal immobilization of acidic proteases from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) on partially deacetylated chitin from shrimp head waste”, el cual fue preparado para su envío a la revista Journal of Aquatic and Food Product Technology. En este estudio se empleó la metodología de superficie de respuesta (MSR) con la finalidad de optimizar el rendimiento de inmovilización (RI, %) de proteasas ácidas de sardina Monterey en hojuelas de quitina parcialmente desacetilada. Se aplicó un diseño compuesto central rotatorio para evaluar los efectos de diferentes condiciones de inmovilización, tales como concentración de enzima a inmovilizar (X_1 , mg/mL), pH de inmovilización (X_2) y concentración de tripolifosfato (X_3 , %) sobre RI. El análisis de varianza aplicado indicó que el modelo establecido fue significativo ($P < 0.05$) y que el ajuste del modelo cuadrático con los datos experimentales fue satisfactorio. Bajo las condiciones óptimas ($X_1 = 0.05$ mg/mL, $X_2 = 3.16$ and $X_3 = 0.75\%$) se obtuvo un RI experimental de 79.1 %, el cual fue muy cercano al valor de RI predicho (81.1%).

CAPÍTULO IV. Caracterización bioquímica y operacional de proteasas ácidas de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) inmovilizadas en quitina parcialmente desacetilada.

Este capítulo está constituido por los resultados del artículo original titulado “Catalytic and operational stability of acidic proteases from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) immobilized on a partially deacetylated chitin support” el cual fue escrito para su posterior envío a la revista Food Chemistry. En esta parte de la

investigación se evaluó el efecto de diferentes condiciones de inmovilización de las proteasas ácidas de sardina Monterey sobre la retención de actividad proteolítica (RAP, %) en los soportes de quitina parcialmente desacetilada. La máxima RAP en los soportes fue de 59%, y fue obtenida utilizando una concentración de proteasas de 0.11 mg/mL, pH de inmovilización de 3 y 1% de tripolifosfato de sodio como solución activadora del soporte de inmovilización. Las proteasas ácidas inmovilizadas bajo estas condiciones presentaron su máxima actividad enzimática a 50°C, mientras que la temperatura óptima de las proteasas solubles fue de 40°C. Asimismo, después de 150 minutos de incubación a 50°C, las proteasas solubles perdieron alrededor del 70% de su actividad enzimática mientras que la actividad catalítica de las proteasas inmovilizadas disminuyó solo en un 30%. El pH óptimo de reacción de las proteasas solubles e inmovilizadas se mantuvo en 2, pero la estabilidad a este pH fue mayor para las proteasas inmovilizadas con respecto a su contraparte soluble. El sistema biocatalítico inmovilizado mantuvo el 41% de su actividad enzimática inicial después de dos ciclos de reacción. La estabilidad al almacenamiento a 6 y 25°C de las proteasas ácidas de sardina fue influida positivamente por el proceso de inmovilización, observándose que después de 60 días de almacenamiento las proteasas inmovilizadas presentan una mayor actividad enzimática residual ($P < 0.05$) respecto a las proteasas solubles. Los resultados obtenidos indican que el proceso de inmovilización aplicado confiere efectos positivos en las características bioquímicas y de estabilidad operacional de las proteasas ácidas provenientes de vísceras de sardina Monterey potenciando su aplicación como herramienta biotecnológica.

REFERENCIAS

- Amaral, I. P., Carneiro-da-Cunha, M. G., Carvalho Jr, L. B., & Bezerra, R. S. (2006). Fish trypsin immobilized on ferromagnetic Dacron. *Process Biochemistry*, 41(5), 1213-1216.
- Arvanitoyannis, I. S., & Kassaveti, A. (2008). Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(4), 726-745.
- Aryee, A. N., & Simpson, B. K. (2012). Immobilization of Lipase from Grey Mullet. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(8), 2105-2122.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A., Velázquez-del Valle, M., Hernández-López, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25(2), 108-118.
- Bechtel, P. J. (2003). Properties of different fish processing by-products from pollock, cod and salmon. *Journal of Food Processing and Preservation*, 27(2), 101-116.
- Bougatef, A. (2013). Trypsins from fish processing waste: characteristics and biotechnological applications – comprehensive review. *Journal of Cleaner Production*, 57(0), 257-265.
- Cowan, D. A., & Fernandez-Lafuente, R. (2011). Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*, 49(4), 326-346.
- Díaz-Rojas, E. I., Argüelles-Monal, W. M., Higuera-Ciapara, I., Hernández, J., Lizardi-Mendoza, J., & Goycoolea, F. M. (2006). Determination of chitin and protein

contents during the isolation of chitin from shrimp waste. *Macromolecular bioscience*, 6(5), 340-347.

Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Barnathan, G., Jaouen, P., & Berge, J.-P. (2006). Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochemistry*, 41(11), 2327-2332.

Elvevoll, E. (2004). Fish Waste and Functional Foods. In: K. Waldron, C. Faulds, & A. Smith, *Total Food Exploiting co-products - minimizing waste*: Institute of Food Research, Norwich Research Park.(p.^pp.

Espósito, T. S., Amaral, I. P. G., Buarque, D. S., Oliveira, G. B., Carvalho Jr, L. B., & Bezerra, R. S. (2009). Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. *Food Chemistry*, 112(1), 125-130.

Ferraro, V., Carvalho, A. P., Piccirillo, C., Santos, M. M., Castro, P. M., & Pintado, M. E. (2013). Extraction of high added value biological compounds from sardine, sardine-type fish and mackerel canning residues—A review. *Materials Science and Engineering: C*, 33, 3111-3120.

Ferraro, V., Cruz, I. B., Jorge, R. F., Malcata, F. X., Pintado, M. E., & Castro, P. M. L. (2010). Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: A review. *Food Research International*, 43(9), 2221-2233.

Geethanjali, S., & Subash, A. (2013). Optimization and Immobilization of Purified *Labeo rohita* Visceral Protease by Entrapment Method. *Enzyme research*, 2013.

Gildberg, A. (1988). Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 91(3), 425-435.

Global Industrial Enzymes Market Report: 2013 Edition.
<http://www.marketresearchreports.biz/analysis-details/global-industrial-enzymes-market-report-2013-edition>

Goycoolea, F., Agulló, E., & Mato, R. (2004). Fuentes y procesos de obtención. In: A. Pastor de Abram, *Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones* Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.(p. pp. 105-144.

Gupta, R., Beg, Q., & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1), 15-32.

Haard, N. F. (1992). A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1(1), 17-35.

He, S., Franco, C., & Zhang, W. (2013). Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International*, 50(289-297).

Honarkar, H., & Barikani, M. (2009). Applications of biopolymers I: chitosan. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 140(12), 1403-1420.

Janeček, S. t. (1993). Strategies for obtaining stable enzymes. *Process Biochemistry*, 28(7), 435-445.

Khor, E., & Lim, L. Y. (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 24(13), 2339-2349.

Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8(3), 203-226.

Kurtovic, I., Marshall, S. N., & Zhao, X. (2011). Hydrophobic immobilization of a bile salt activated lipase from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72(3), 168-174.

Li, D., Matos, M., & Simpson, B. K. (2013). Inactivation of pectin methylesterase by immobilized trypsins from cunner fish and bovine pancreas. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 60(2), 244-252.

Martinez, A., & Serra, J. L. (1989). Proteolytic activities in the digestive tract of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 93(1), 61-66.

Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451-1463.

Mazorra-Manzano, M. A., Pacheco-Aguilar, R., Ramírez-Suárez, J. C., Garcia-Sanchez, G., & Lugo-Sánchez, M. E. (2012). Endogenous proteases in Pacific Whiting (*Merluccius productus*) muscle as a processing aid in functional fish protein hydrolysate production. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), 130-137.

Raksakulthai, R., Rosenberg, M., & Haard, N. (2002). Accelerated Cheddar cheese ripening with an aminopeptidase fraction from squid hepatopancreas. *Journal of Food Science*, 67(3), 923-928.

Rasmussen, R. S., & Morrissey, M. T. (2007). Marine Biotechnology for Production of Food Ingredients. In: L. T. Steve, *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. 52: Academic Press.(p.^pp. 237-292.

Ravi-Kumar, M. N. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1-27.

Rustad, T. (2003). Utilisation of marine by products. *Electronic Journal of Enviromental, Agricultural and Food Chemistry*(2).

Rustad, T., Storrø, I., & Slizyte, R. (2011). Possibilities for the utilisation of marine by-products. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(10), 2001-2014.

Shahidi, F., & Janak Kamil, Y. (2001). Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 12(12), 435-464.

Sila, A., Nasri, R., Bougatef, A., & Nasri, M. (2012). Digestive alkaline proteases from the goby (*Zosterisessor ophiocephalus*): Characterization and potential application as detergent additive and in the deproteinization of shrimp wastes. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 21(2), 118-133.

Singh, R. K., Tiwari, M. K., Singh, R., & Lee, J.-K. (2013). From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), 1232-1277.

Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature reviews Drug discovery*, 5(9), 785-799.

CAPÍTULO I

Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efectos en su estabilización y aplicaciones

**Artículo de revisión aceptado para publicación en la Revista Mexicana
de Ingeniería Química**



Biotecnología



UTILIZACIÓN DE MATERIALES A BASE DE QUITINA Y QUITOSANO EN LA INMOVILIZACIÓN DE PROTEASAS: EFECTOS EN SU ESTABILIZACIÓN Y APLICACIONES

UTILIZATION OF CHITIN AND CHITOSAN BASED MATERIALS FOR PROTEASE IMMOBILIZATION: STABILIZATION EFFECTS AND APPLICATIONS

J.A. Salazar-Leyva¹, J. Lizardi-Mendoza¹, J.C. Ramírez-Suarez¹, G. García-Sánchez¹, J.M. Ezquerro-Brauer², E.M. Valenzuela-Soto¹, M.G. Carvallo-Ruiz¹, M.E. Lugo-Sánchez¹ y R. Pacheco-Aguilar^{1*}

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Carretera a la Victoria, C.P. 83304. Hermosillo, Sonora, México.

²Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora. Rosales y Niños Héroes S/N. Hermosillo, Sonora, México.

Received September 17, 2013; Accepted November 20, 2013

Resumen

Las enzimas proteolíticas poseen un amplio campo de aplicación en diversas áreas de la industria, por lo que la búsqueda de estrategias para optimizar su desempeño catalítico es de gran importancia. La inmovilización de enzimas en soportes sólidos es una tecnología que induce cambios a nivel estructural en los sistemas catalíticos inmovilizados, ocasionando que las características de reacción de estos se vea mejorada notablemente, permitiendo, además, la posibilidad de utilizar repetidamente a las enzimas inmovilizadas en un mismo proceso. La quitina y su derivado el quitosano, son compuestos que poseen propiedades funcionales que los convierten en excelentes materiales para ser utilizados como soportes en la inmovilización de enzimas. Este artículo de revisión discute los efectos que causa el proceso de inmovilización en materiales a base de quitina y quitosano sobre la estabilidad bioquímica y operacional de enzimas proteolíticas; de igual forma, se presentan algunas aplicaciones de los sistemas catalíticos inmovilizados.

Palabras clave: inmovilización, proteasas, quitina, quitosano, estabilidad.

Abstract

Proteolytic enzymes have a wide range of applications in different industrial fields therefore the development of strategies focused in the optimization of their catalytic performance is a topic of great interest. Enzyme immobilization onto solid supports induces changes at structural level in the immobilized systems, and consequently some reaction characteristics can be enhanced; furthermore, immobilized enzymes can be reused in the same process. Due to the unique physicochemical and functional properties that chitin and its derivate chitosan possess, these biopolymers are an excellent option as support for enzyme immobilization. This review discusses the effects on the biochemical and operational performance of proteases immobilized in chitin and chitosan based materials. Some aspects related with the industrial applications of the immobilization systems are also mentioned.

Keywords: immobilization, proteases, chitin, chitosan, stability.

*Autor para la correspondencia. E-mail: rpacheco@ciad.mx
Tel/Fax. 662-280-04-21Ext. 525

1 Introducción

Las enzimas se consideran un grupo de moléculas altamente especializadas, las cuales poseen un gran poder catalítico mucho mayor al de catalizadores de origen inorgánico (Nelson y col. 2008). Comparando con catalizadores químicos de naturaleza no proteica, las enzimas son específicas en su modo de acción y capaces de operar bajo condiciones suaves de temperatura, presión y pH, ayudando a crear procesos de manufactura de menor costo debido al ahorro de energía (Krajewska, 2004). Tomando en cuenta lo anterior, actualmente muchas aplicaciones industriales se ven apoyadas en gran medida por el uso de la tecnología enzimática, lo cual ha provocado que las ventas de enzimas a nivel mundial crezcan anualmente en aproximadamente un 7.5 % (Beilen y Li, 2002; Rasmussen y Morrissey, 2007; Ferraro y col. 2010; Wohlgemuth, 2010).

Las enzimas del grupo de las hidrolasas, particularmente las proteasas, representan al menos el 60% de las ventas globales de enzimas en el mundo. Lo anterior debido a que estos biocatalizadores poseen múltiples aplicaciones en procesos industriales como la producción de detergentes, alimentos, textiles y medicamentos (Gupta y col. 2002; Kirk y col. 2002; Tavano, 2013).

En la mayoría de los procesos industriales las enzimas operan en sistemas de una sola fase, es decir, se encuentran disueltas con el sustrato el cual a su vez es transformado en producto. Por lo anterior, resulta difícil separar a las enzimas del resto de los componentes de la mezcla de reacción y por ende, en un proceso continuo, la enzima soluble puede ser arrastrada junto con el producto obtenido. Este tipo de proceso no es conveniente desde el punto de vista económico ya que por lo general el precio de las enzimas es elevado (Novick y Rozzell 2005).

La inmovilización de enzimas en soportes sólidos se ha posicionado como una metodología capaz de aumentar la eficiencia de un bioproceso, ya que al compararse con el uso de enzimas libres (sin inmovilizar) esta metodología ofrece diversas ventajas. La inmovilización, en la mayoría de los casos, estabiliza la estructura de las enzimas y por consecuencia su capacidad catalítica aumenta en condiciones extremas de pH y temperatura. Además, la fácil separación de la enzima inmovilizada facilita su reutilización permitiendo la implementación de procesos continuos de catálisis en reactores (Chiu y col. 2007; Brady y Jordaan, 2009; Hanefeld y col. 2009; Mahmoud y Helmy, 2009).

Las propiedades de las enzimas inmovilizadas son

regidas por las características del sistema enzimático y del material utilizado como soporte (Bickerstaff, 1997). De la gran variedad de materiales que han sido estudiados y utilizados para inmovilizar enzimas destacan la quitina y el quitosano, debido a que la estructura química de estos compuestos posee una gran disponibilidad de grupos funcionales que pueden reaccionar con las enzimas o que son susceptibles a ser modificados químicamente para aumentar su reactividad (Kurita, 2001; Zohuriaan-Mehr, 2005; Mourya e Inamdar, 2008). Además, estos biopolímeros son abundantes, biodegradables y no presentan toxicidad (Krajewska, 2004; Macquarrie y Hardy, 2005; Kurita, 2006).

Debido al gran potencial de aplicación tecnológica que poseen las proteasas y a que la quitina y el quitosano presentan características adecuadas como soportes para inmovilizar enzimas, en esta revisión se muestra el estado del arte en lo referente a los efectos de la inmovilización de proteasas en materiales a base de quitina y quitosano sobre los siguientes aspectos: estabilidad al pH y la temperatura; parámetros cinéticos; estabilidad operacional y aplicaciones.

2 Inmovilización de enzimas

La tecnología de inmovilización de enzimas data de principios del siglo XX, siendo en los años de 1910 y 1930 cuando ciertas proteínas fueron físicamente adsorbidas en superficies como carbón, caolinita, celulosa y esferas de cristal (Nelson y Griffin, 1916; Nelson y Hitchcocks, 1921; Langmuir y Schaefer, 1938). Esta tecnología es generalmente definida como el aprisionamiento de una molécula de enzima en una fase que permite el intercambio o difusión de sustancias. El proceso de inmovilización confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, debido a que en la mayoría de los casos se lleva a cabo la interacción de la enzima con un soporte dando lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser utilizadas repetidamente (Novick y Rozzell 2005).

2.1 Métodos para la inmovilización de enzimas

De manera general, los métodos de inmovilización de enzimas se clasifican en físicos y químicos. Su diferencia radica en que en los físicos las interacciones entre la enzima y el soporte son débiles, mientras que en los químicos, la enzima y el soporte se unen a través de enlaces covalentes (Tischer y Wedekind, 1999).

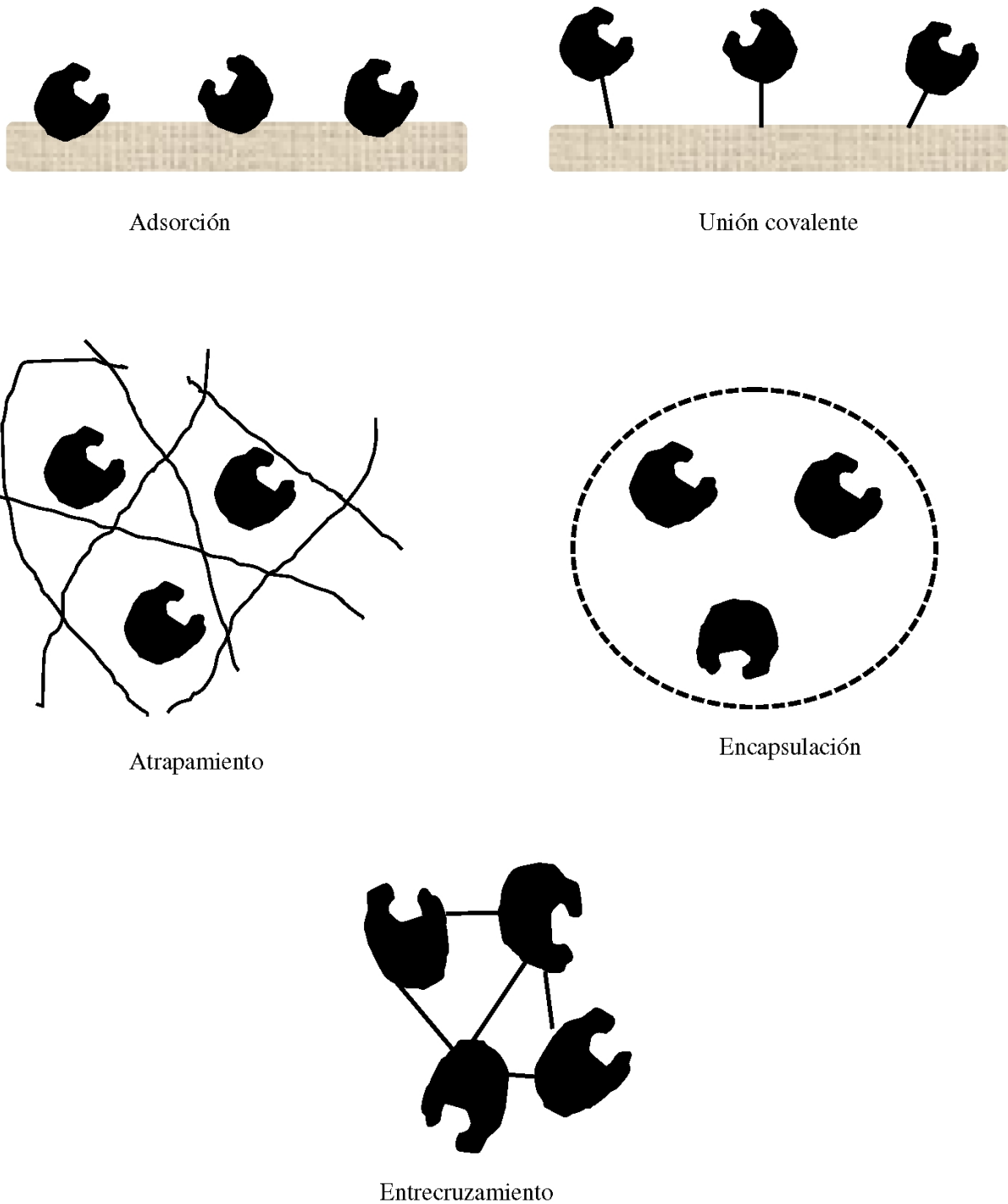


Fig. 1. Métodos de inmovilización de enzimas más utilizados en la actualidad.

A través del tiempo se han diseñado diferentes metodologías para la inmovilización de enzimas. Sin embargo, es importante mencionar que no existe un sistema universal de inmovilización, ya que para un caso dado es necesario evaluar varias metodologías

en función de la enzima que se desea inmovilizar y del proceso en el que se pretende utilizar el sistema catalítico. Inclusive, a pesar de que los diferentes procesos de inmovilización son conceptualmente distintos, se puede decir que frecuentemente se

traslapan entre ellos, utilizándose en algunos casos sistemas de inmovilización múltiples (Novick y Rozzell 2005).

De acuerdo a Bickerstaff (1997), existen cinco métodos principales de inmovilización de enzimas, a saber: adsorción, unión covalente, atrapamiento, encapsulación y entrecruzamiento (Fig. 1). A continuación se describen los principales aspectos de los métodos mencionados anteriormente.

2.1.1 Adsorción

Este método de inmovilización es relativamente simple y barato. No implica una modificación química de la enzima inmovilizada, por lo que mantiene de manera aceptable su actividad (Castro y col. 2013). Su principal desventaja es que en algunos casos puede ocurrir un desprendimiento de la enzima del soporte debido a las condiciones de proceso (Kirkkopru y col. 2006; Brady y Jordaan, 2009).

Las interacciones que se llevan a cabo entre la enzima y el material utilizado como soporte son, la mayoría de las veces, de carácter reversible. Las fuerzas de atracción que predominan en la inmovilización por adsorción son diversas, entre las que se encuentran las de van der Waals, interacciones iónicas, puentes de hidrógeno y enlaces hidrofóbicos. Estas interacciones son de carácter débil aunque lo suficientemente grandes en cantidad para asegurar una unión adecuada con el soporte (Bickerstaff, 1997). El proceso de adsorción es altamente dependiente de las interacciones moleculares que se llevan a cabo entre la superficie del material utilizado como soporte y la enzima, por lo que las propiedades de carga y polaridad del biocatalizador a inmovilizar tienen que ser tomadas en cuenta para asegurar una unión adecuada de éste con el soporte (Moehlenbrock y Minteer, 2011).

2.1.2 Unión covalente

La unión de enzimas a través de enlaces covalentes con un soporte insoluble es una de las metodologías de inmovilización más empleadas, ya que lo que se busca es evitar el desprendimiento de la enzima del soporte. La gran ventaja de la utilización de esta metodología es la estabilidad del enlace formado entre el soporte y la enzima, la cual usualmente queda unida a través de varios puntos de su estructura, confiriéndole rigidez y por lo tanto aumentando la estabilidad del sistema a la temperatura, pH, fuerza iónica, solventes orgánicos y proteólisis (Brena y Batista-Viera, 2006; Homaei y

col. 2013).

Las enzimas poseen una gran variedad de grupos funcionales capaces de unirse vía covalente a los grupos químicos presentes en la superficie del soporte, entre los que destacan el grupo amino (-NH₂), carboxilo (-COOH) y sulfhidrilo (-SH) de sus cadenas laterales. Es muy importante que los grupos funcionales del sitio activo de la enzima no participen en el enlace covalente formado con el soporte, ya que esto provocaría una disminución significativa en la actividad enzimática.

La principal desventaja de la inmovilización covalente de enzimas radica en que esta metodología es más costosa y compleja comparada con otras, ya que el soporte utilizado necesita ser activado químicamente con reactivos químicos específicos previo al procedimiento de inmovilización. No obstante lo anterior, la gran estabilidad estructural y el mínimo desprendimiento de la enzima del soporte justifican, en muchos de los casos, su utilización (Novick y Rozzell 2005).

2.1.3 Atrapamiento

La inmovilización por atrapamiento difiere de la adsorción y unión covalente en que las moléculas de enzima están libres en solución, pero restringidas en movimiento por el “enrejado” formado por un gel. Generalmente se utilizan polímeros orgánicos para formar dichos enrejados (Bickerstaff, 1997; Sheldon, 2007).

La forma más usual para llevar a cabo esta inmovilización es mezclando a la enzima de interés con una solución de algún material polimérico, el cual es posteriormente insolubilizado o entrecruzado mediante cambios de pH o el uso de polímeros multivalentes. Además de la simplicidad metodológica de esta forma de inmovilización de enzimas, otra gran ventaja es la protección de la enzima del contacto directo con el ambiente minimizando así aquellos factores que afectan la actividad enzimática como las burbujas de aire y el contacto con solventes hidrofóbicos (Alloue y col. 2008; Brady y Jordaan, 2009).

La principal limitante de la utilización de esta metodología es que el enrejado polimérico formado puede en ocasiones provocar problemas de transferencia de masa; es decir, el enrejado, siendo una barrera, puede llegar a disminuir la interacción adecuada entre la enzima y el sustrato, teniendo así una implicación directa en la cinética de reacción (Bickerstaff, 1997; Brena y Batista-Viera, 2006).

2.1.4 Encapsulación

La encapsulación de enzimas es una metodología similar a la de atrapamiento debido a que la enzima inmovilizada está confinada en una matriz polimérica. En la encapsulación, los materiales utilizados como soporte presentan poros por lo que son semipermeables (Moehlenbrock y Minteer 2011).

Un aspecto determinante para aplicar de manera exitosa la encapsulación de enzimas es la elección adecuada del tamaño de poro del soporte. Si el tamaño de poro es el adecuado, tanto el sustrato como el producto podrán entrar y salir, respectivamente, a través de la cápsula semipermeable la cual seguirá reteniendo a la enzima por tener un mayor tamaño que los poros de la cápsula (Novick y Rozzell 2005).

La principal ventaja de este método es que la enzima inmovilizada presenta una alta actividad ya que esta ocluida en la cápsula en forma soluble. Esta metodología puede presentar problemas de difusión debido a que en algunos casos los productos formados de la reacción enzimática pueden acumularse de manera rápida causando el rompimiento de la cápsula. Otra limitante de la encapsulación es que no puede ser aplicada para catalizar procesos donde el sustrato sea de alto peso molecular, ya que estos pueden presentar problemas de transferencia a través de la cápsula (Bickerstaff, 1997; Novick y Rozzell, 2005; Brady y Jordaan, 2009).

2.1.5 Entrecruzamiento

Algunos autores consideran a este método de inmovilización como libre de soporte debido a que implica la interacción de las enzimas entre ellas mismas, formando grandes complejos tridimensionales. La formación de estas estructuras se logra por métodos físicos o químicos (Novick y Rozzell, 2005; Brady y Jordaan, 2009).

El entrecruzamiento de enzimas a través de métodos químicos es el más utilizado. Para ellos se utilizan reactivos como el glutaraldehído, el cual es capaz de unir a las enzimas entre ellas mismas a través de enlaces covalentes. La capacidad de entrecruzar enzimas utilizando glutaraldehído, radica en que este compuesto se une covalentemente a los grupos amino libres localizados en la superficie de moléculas de enzima “vecinas”, provocando la formación de enlaces covalentes inter- e intra- moleculares (Sheldon, 2011).

El entrecruzamiento libre de soporte raramente se utiliza para inmovilizar enzimas ya que presenta limitantes como la falta de propiedades mecánicas

y baja estabilidad de los agregados moleculares enzimáticos formados (Bickerstaff, 1997). En años recientes se desarrolló una nueva clase de enzimas inmovilizadas libres de soporte conocidas como CLEAs por sus siglas en inglés (cross-linked enzyme aggregates). Lo que caracteriza a esta metodología es que a través de una precipitación selectiva (por ejemplo con sulfato de amonio) se puede alcanzar la purificación y la inmovilización de las enzimas en un solo paso (Cao y col., 2000; Sheldon, 2011). De acuerdo a Cui y Jia (2013) el uso de CLEAs es un método muy atractivo para la inmovilización de enzimas debido a su simplicidad y a que presenta la posibilidad de utilizar extractos enzimáticos crudos; además, permite la co-inmovilización de diferentes enzimas.

2.1.6 Inmovilización de enzimas en nanomateriales

Si bien la inmovilización de enzimas en nanomateriales no representa por sí misma una metodología para inmovilizar enzimas, resulta de gran importancia su mención debido a que en años recientes se ha demostrado que los sistemas catalíticos a nanoescala poseen gran potencial de aplicación en diversas áreas relacionadas con la biotecnología (Ansary y Husain, 2012).

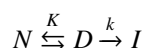
La principal ventaja de utilizar estructuras a nanoescala para inmovilizar enzimas, radica en que se reducen de manera importante las limitantes relacionadas con la difusión de sustratos y productos, además de que se maximiza la unión de la enzima con el soporte debido a que el nanomaterial posee una gran superficie de contacto (Jia y col., 2003). Por lo tanto, actualmente existe mucho interés en la utilización de materiales nanoestructurados como soportes para inmovilizar enzimas (Huang y col., 2007).

Los procedimientos desarrollados para inmovilizar enzimas en nanomateriales están basados en los conceptos y mecanismos de los métodos tradicionales de inmovilización de enzimas anteriormente mencionados. Por ejemplo, la unión de enzimas a la superficie de nanopartículas fue uno de los primeros procedimientos utilizados y sigue siendo muy aplicado en la actualidad. Otras formas de inmovilización son el atrapamiento de enzimas en materiales nanoporosos por adsorción física o por uniones químicas en dichos nanomateriales (Wang, 2006).

2.2 Inmovilización de enzimas como estrategia para aumentar la estabilidad proteica

En lo concerniente a proteínas, el término estabilidad se refiere a la resistencia que posee la estructura proteica hacia factores adversos tales como el calor y otros agentes desnaturizantes. Se considera que una proteína es estable cuando preserva su integridad molecular, y con ello su función biológica, a pesar de haber sido expuesta a un agente desnaturizante. Las enzimas, al ser en su mayoría proteínas, poseen una estabilidad limitada, por lo que experimentan reacciones de desnaturización durante su extracción, almacenamiento y aplicación en la industria (Iyer y Ananthanarayan, 2008).

De acuerdo a Fágáin (1995), existen dos definiciones muy útiles para entender la estabilidad proteica *in vitro*: la estabilidad *termodinámica* y la estabilidad *cinética*. La estabilidad termodinámica (o *conformacional*), se relaciona con la resistencia que presenta la conformación plegada de la proteína hacia la desnaturización; mientras que la estabilidad cinética (o *a largo plazo*), representa la resistencia que ofrece la estructura proteica a una inactivación irreversible (ejemplo: mantenimiento de la actividad biológica). Ambos tipos de estabilidad, pueden representarse de acuerdo al siguiente esquema:



Donde N representa a la estructura nativa de la proteína, D a la estructura desnaturizada e I a la estructura proteica inactivada de forma irreversible. La transición reversible de N hacia D corresponde a la estabilidad termodinámica, mientras que la transición irreversible de D a I representa a la estabilidad cinética.

Relacionado a lo antes expuesto, la inmovilización de enzimas se considera como una metodología que permite la obtención de “enzimas estables” (Janeček, 1993; Cowan y Fernandez-Lafuente, 2011), o expresado en términos de estabilidad proteica, el proceso de inmovilización puede llegar a favorecer la estabilidad *conformacional* y *a largo plazo* de las enzimas que se encuentran unidas a un soporte sólido. De manera más específica, Singh y col. (2013) explican que la estabilidad de las enzimas inmovilizadas depende directamente de efectos relacionados con cambios conformacionales de la estructura proteica, sobre todo a nivel de estructura terciaria. Además, el hecho de que la interacción entre el sustrato y la enzima inmovilizada se lleve a cabo en un microambiente muy diferente al de la enzima libre, puede provocar efectos estabilizantes en los sistemas catalíticos (Brena y Batista-Viera, 2006). En la Fig. 2, se muestran los principales efectos estabilizantes que causa la inmovilización de enzimas en soportes sólidos (Novick y Rozzel 2005; Mateo y col. 2007).

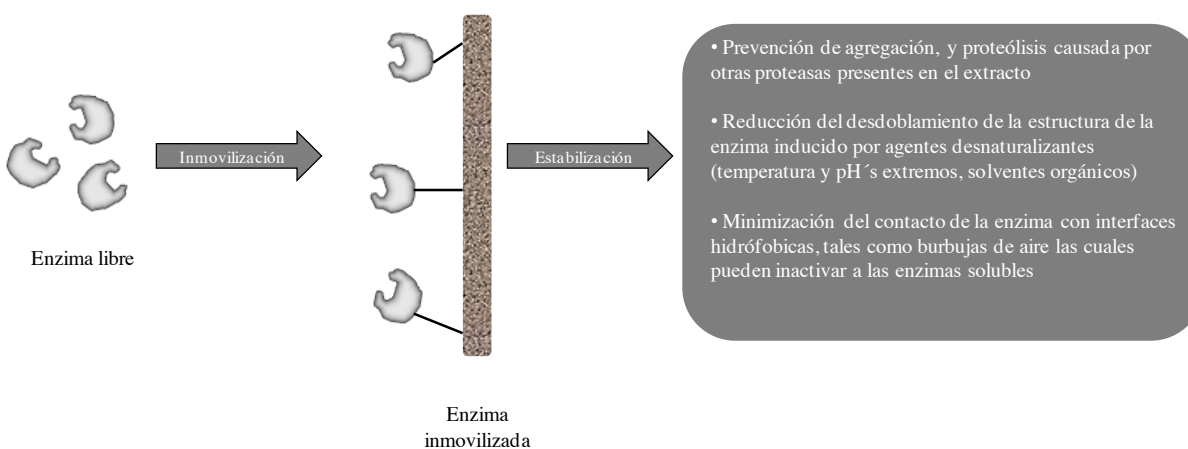


Fig. 2. Efectos estabilizantes causados por la inmovilización de enzimas en soportes sólidos.

3 Quitina y quitosano: Estructura química, fuentes de obtención y propiedades funcionales

a poseer características estructurales y propiedades fisicoquímicas muy interesantes y diferentes a las que presentan algunos polímeros sintéticos. Debido a lo anterior, estas macromoléculas de origen natural poseen un amplio rango de aplicación en diversas áreas (Kurita, 2006).

La quitina es un polisacárido estructural que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, particularmente en el exoesqueleto de artrópodos (crustáceos e insectos) y en la pared celular de algunos hongos y otros organismos (Díaz-Rojas y col., 2006).

Kurita (2006), menciona que desde el punto de vista químico la quitina es un polímero de glucosas que se encuentran unidas por enlaces β -(1-4), diferenciándola de la celulosa en que posee un grupo acetamida como sustituyente en el carbono número 2 (Fig. 3a). El principal derivado de la quitina es el quitosano, el cual estructuralmente se considera como la forma desacetilada de la quitina (Fig. 3b).

La materia prima más utilizada para la obtención industrial de quitina y quitosano son los desechos generados por la industria pesquera (caparzones de crustáceos, principalmente). De acuerdo a Ravi-Kumar (2000), Oregon, Washington, Virginia (EEUU) y Japón son los mayores productores de quitina y quitosano en el mundo, mientras que países como Noruega, México y Chile poseen una gran cantidad de recursos marinos que no son explotados en su totalidad para este propósito.

La quitina y el quitosano son materiales altamente atractivos y con un gran potencial de aplicación en campos tan diversos como la industria cosmética, biomédica, ambiental y de alimentos, entre otros. La diversidad de sus aplicaciones se debe a que se obtienen fácilmente y de manera económica a partir de desechos de la pesca, a que son biodegradables, biológicamente compatibles y no tóxicos. En la Tabla 1 se muestran las principales propiedades funcionales de la quitina y el quitosano, así como sus distintos campos de aplicación (Ravi-Kumar, 2000; Khor y Lim, 2003; Synowiecki y Al-Khateeb, 2003; Krajewska, 2004; Bautista-Baños y col., 2006; Kurita, 2006; Rinaudo, 2006; Harish-Prashanth y Tharanathan, 2007; Honarkar y Barikani, 2009; Hernández-Ochoa y col., 2011).

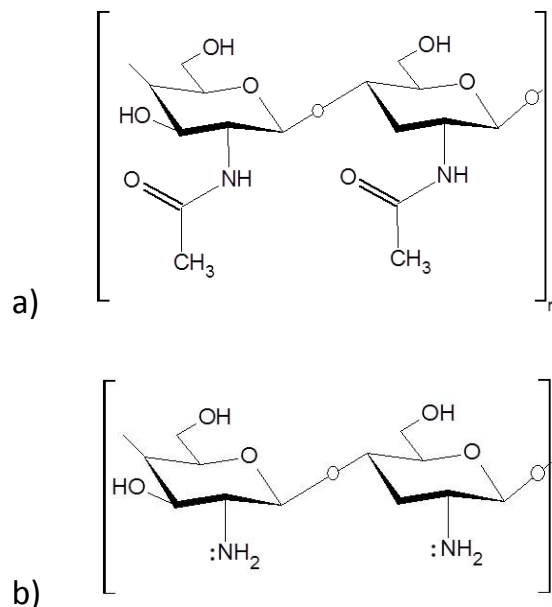


Fig. 3. Estructura química de la quitina (a) y el quitosano (b).

4 Quitina y quitosano como soportes de inmovilización de enzimas

Como se mencionó anteriormente, existe una gran variedad de metodologías disponibles para inmovilizar enzimas, así como de materiales utilizados como soportes. Generalmente, tanto la metodología de inmovilización como el soporte se eligen de manera empírica, pero siempre con el objetivo de que se retenga al máximo la actividad enzimática y su estabilidad operacional (Bickerstaff, 1997).

Entre las principales características que debe tener un material para ser utilizado como soporte en la inmovilización de enzimas destacan las siguientes: alta afinidad por las proteínas, disponibilidad de grupos funcionales reactivos para reaccionar con las enzimas o susceptibles a modificaciones químicas, fácil preparación en diferentes formas físicas, no ser tóxicos y presentar compatibilidad fisiológica si es requerido. Esto último, para aplicaciones en biomedicina o industria de alimentos principalmente. La quitina y el quitosano cumplen con la mayoría de las características mencionadas anteriormente debido al origen natural y características estructurales de estos biopolímeros (Krajewska, 2004).

Tabla 1. Principales propiedades funcionales y aplicaciones de la quitina y el quitosano

Propiedad funcional	Principales aplicaciones
<ul style="list-style-type: none"> • Bioactividad <ul style="list-style-type: none"> – Actividad anti-colesterolémica – Control de peso (efecto fibra dietaria) – Actividad anti-oxidante – Actividad anti-microbiana – Estimulante sistema inmune – Actividad anti-proliferativa – Capacidad cicatrizante – Capacidad humectante • Carácter policationico <ul style="list-style-type: none"> – Capacidad de adsorción – Quelante de metales • Capacidad de formación de geles y películas • Reactividad de grupos funcionales 	<ul style="list-style-type: none"> • Ingredientes en alimentos funcionales • Fabricación de empaques activos de alimentos • Aditivos antimicrobianos en industria textil • Control de enfermedades en hortalizas • Biomedicina <ul style="list-style-type: none"> – Materiales de curación aceleradores del proceso de cicatrización – Regeneración de tejidos • Industria cosmética • Reducción de contaminantes en aguas residuales (fenoles, metales pesados) • Recuperación de metales valiosos • Inactivación de metalo-enzimas que causan deterioro en alimentos • Clarificación de jugo • Fabricación de resinas cromatográficas • Inmovilización de enzimas • Fabricación de membranas de diálisis y fluidos dentales • Sistemas de liberación controlada de medicamentos y moléculas bio-activas

La quitina posee una gran disponibilidad de grupos hidroxilo, además de ser un sólido prácticamente inerte e insoluble en agua. Por su parte, el quitosano presenta grupos hidroxilo y aminos capaces de ser modificados químicamente. La presencia de grupos amino en su forma primaria ($-NH_2$), le proporciona al quitosano la característica de ser un polielectrolito catiónico ($pK \approx 6.5$), por lo que es soluble en medio ácido, en particular a pH's por debajo de 6.5. Esta característica de solubilidad le confiere, bajo ciertas condiciones, la capacidad de formar geles y membranas que presentan propiedades mecánicas aceptables (Agulló y col., 2003; Krajewska, 2004).

Otro aspecto interesante de la quitina y particularmente del quitosano, es que pueden servir de base para diseñar materiales compuestos creando con

ello estructuras de inmovilización con propiedades muy específicas. Algunos ejemplos de este tipo de estructuras son las microesferas de poliestireno cubiertas de quitosano (Talbert y Hotchkiss, 2012) y nanopartículas magnéticas de quitosano- Fe_3O_4 (Ju y col., 2012), entre otros.

Es importante mencionar que además de la quitina y el quitosano existen otros polisacáridos de origen natural que pueden ser utilizados como soportes en la inmovilización de enzimas, entre los que destacan el alginato, la carragenina, la celulosa, el almidón y la pectina. Sin embargo, estos polisacáridos no poseen de forma individual las propiedades funcionales de la quitina y el quitosano, por lo que en muchos estudios se propone el uso de materiales compuestos para mejorar las propiedades

de los soportes de inmovilización, creando sistemas de inmovilización del tipo alginato-pectina, quitosano-alginato y alginato-almidón, entre otros (Al-Adhami y col., 2002; Girigowda y col., 2006; Matto y Husain, 2006; Matto y Husain, 2009; Flores-Maltos y col., 2011).

Haciendo referencia a lo antes expuesto, Tanaka y col. (1984) mencionan que los geles de alginato al poseer poros muy grandes pueden presentar fugas de enzima de los soportes a base de este polisacárido. Una estrategia útil para reducir este problema es la formación de complejos poli-electrolíticos entre el alginato como polímero aniónico y el quitosano como polímero catiónico. De esta manera, el soporte de inmovilización al estar “recubierto” por el quitosano minimiza las fugas de enzima (Azarnia y col., 2010). En otro estudio, Betigeri y Neau (2002) compararon la influencia del tipo de polímero (quitosano y alginato) en las fugas y actividad enzimática de una lipasa inmovilizada por atrapamiento. Los autores encontraron que el soporte de alginato presentó mayores fugas de enzima del soporte y una reducida actividad enzimática al compararla con las esferas de quitosano.

5 Inmovilización de proteasas en materiales a base de quitina y quitosano

Las proteasas catalizan reacciones de hidrólisis proteica es decir, rompen enlaces peptídicos mediante la acción de moléculas de agua (Barberies y col., 2008). Este grupo de enzimas son ampliamente utilizadas en diversas áreas de la industria, por lo que varios grupos de investigación realizan estudios que revelan el gran potencial de aplicación que poseen las proteasas inmovilizadas en comparación con su contraparte soluble. A continuación se discutirán los efectos que imparte la inmovilización de proteasas en materiales a base de quitina y quitosano sobre la estabilidad bioquímica y operacional de los sistemas catalíticos inmovilizados.

5.1 Estabilidad a la temperatura

La temperatura es un factor de suma importancia en todos los procesos que son catalizados por enzimas, debido a que estas biomoléculas poseen una temperatura óptima en la cual su efecto catalítico es el máximo. Esta actividad se ve

afectada de manera negativa a temperaturas mayores o menores a la temperatura óptima, debido a que la estructura proteica puede pasar de un estado nativo a un estado desnaturalizado. Generalmente, la mayoría de las enzimas son desnaturalizadas a altas temperaturas (60-70°C), a causa de que el calor provoca un debilitamiento de las fuerzas intramoleculares responsables de la preservación de la estructura terciaria de la proteína (Illanes y col., 2008).

Un aspecto de sumo interés en el campo de la tecnología enzimática es el mejoramiento de la termoestabilidad de las enzimas. Las reacciones enzimáticas que se llevan a cabo a altas temperaturas poseen mayor velocidad de catálisis, favoreciendo además la transferencia de masas debido a que al aumentar la temperatura se incrementa la solubilidad del sustrato y se disminuye la viscosidad del medio de reacción (Bruins y col., 2001; Matsumoto y Ohasi, 2003).

A este respecto, la inmovilización es una de las estrategias más utilizadas para estabilizar térmicamente a las enzimas. Varios autores coinciden en que la formación de interacciones covalentes y/o no covalentes entre la enzima y el soporte de inmovilización incrementa la rigidez conformacional de la estructura proteica, y por ende, su resistencia a ser desnaturalizada por un tratamiento térmico (Hanefeld y col., 2009; Datta y col., 2013; Singh y col., 2013).

A manera de ejemplo, Altun y Cetinus (2007), inmovilizaron pepsina en esferas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído, encontrando que a 50°C la pepsina inmovilizada retuvo alrededor del 100% de su actividad, mientras que la pepsina libre retuvo solo el 60% a la misma temperatura. Adicionalmente se encontró que la temperatura óptima de la pepsina inmovilizada fue alrededor de 10°C mayor que la de la pepsina libre. En otro estudio, Singh y col. (2011) inmovilizaron una cisteína-proteasa en esferas de quitosano activadas con glutaraldehído, encontrando que la enzima inmovilizada retuvo más del 80% de su actividad a temperaturas superiores a los 70°C, mientras que la proteasa soluble mostró el mismo comportamiento pero a temperaturas no mayores a 65°C. En otra investigación realizada por Zhang y col. (2008), se inmovilizó tripsina covalentemente en esferas de quitosano observándose que no existió un cambio significativo en la temperatura óptima de reacción de la enzima libre con respecto a la inmovilizada, pero esta última presentó una mayor estabilidad térmica a 55°C que la tripsina soluble. De forma

similar, Manrich y col. (2008) observaron una marcada termoestabilidad de tripsina inmovilizada en geles de quitosano activados con glicidol.

Debido a su alta reactividad, el quitosano puede ser modificado químicamente y/o interactuar con otros compuestos para crear materiales compuestos que pueden influir positivamente en la estabilidad a la temperatura de las enzimas inmovilizadas. En relación a lo anterior, Liu y col. (2005), inmovilizaron tripsina en nanopartículas de quitosano modificado hidrofólicamente, observando que después de 100 minutos de reacción a 50°C, la tripsina inmovilizada perdió tan solo el 30% de su actividad, mientras que bajo las mismas condiciones la tripsina libre perdió el doble de su actividad enzimática.

La estabilidad térmica de las enzimas inmovilizadas en materiales a base de quitosano reportada en los trabajos de investigación antes discutidos, también puede ser explicada desde un punto de vista termodinámico. Por ejemplo, bajo condiciones normales de temperatura una molécula de enzima sin inmovilizar se encuentra en su estado nativo (N) y en equilibrio con su estado desnaturalizado (D). Conforme la temperatura aumenta por arriba de la temperatura óptima de catálisis, la enzima tiende a desdoblarse en un proceso cooperativo y con ello se da la transición al estado D, viéndose afectada negativamente su función (Iyer y Ananthanarayan, 2008). En cambio, si la enzima

se encuentra inmovilizada en un soporte sólido, la transición hacia el estado D a altas temperaturas se puede ver disminuida. En la Fig. 4 se presenta un esquema que ilustra como los enlaces covalentes formados entre el soporte de inmovilización y la enzima pueden influir positivamente en la estabilidad térmica de la estructura proteica.

De acuerdo a lo antes expuesto, es posible aseverar que los procesos de inmovilización aplicados incrementan la estabilidad térmica de las proteasas, lo que a su vez les confiere una mayor posibilidad de ser aplicadas en procesos industriales donde se requieran altas temperaturas.

5.2 Estabilidad al pH

Las propiedades de carga de los materiales utilizados como soportes de inmovilización de enzimas tienen un efecto sobre el pH óptimo y estabilidad estructural de las enzimas. Dicho efecto se encuentra relacionado con el desarrollo de un gradiente de iones OH^- y/o H^+ entre el solvente y el soporte de inmovilización. El gradiente de iones es generado por las propiedades de carga de la superficie del soporte y la concentración de iones en la solución, dando como resultado la generación de un "pH localizado" en la superficie del soporte y que difiere del valor de pH de la solución (Talbert y Goddard, 2012).

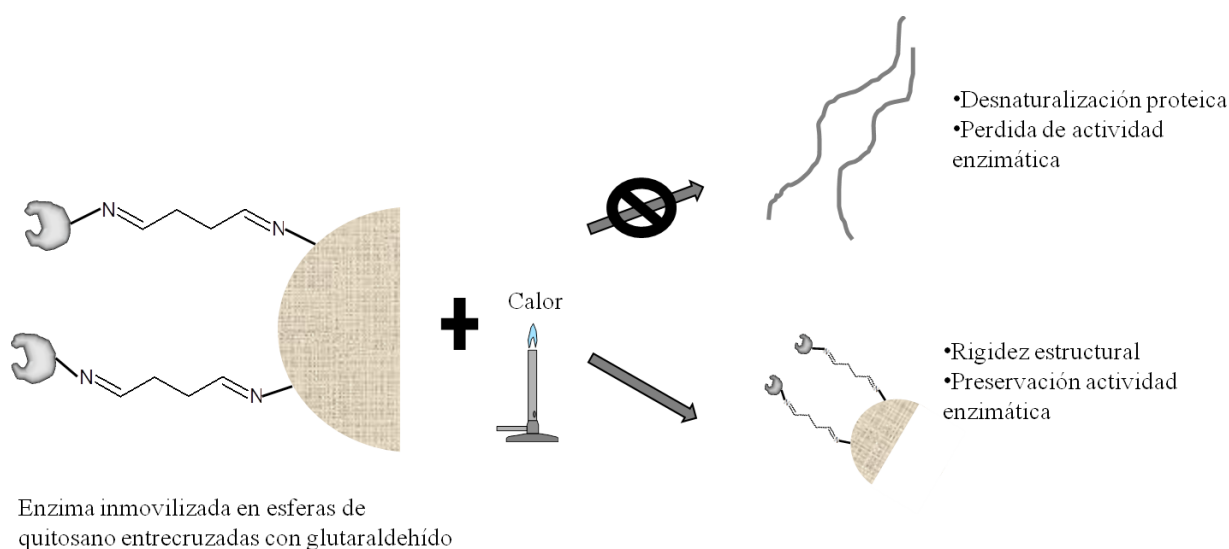


Fig. 4. Efecto de la formación de enlaces covalentes entre la enzima y el soporte sobre la estabilidad térmica de una enzima inmovilizada.

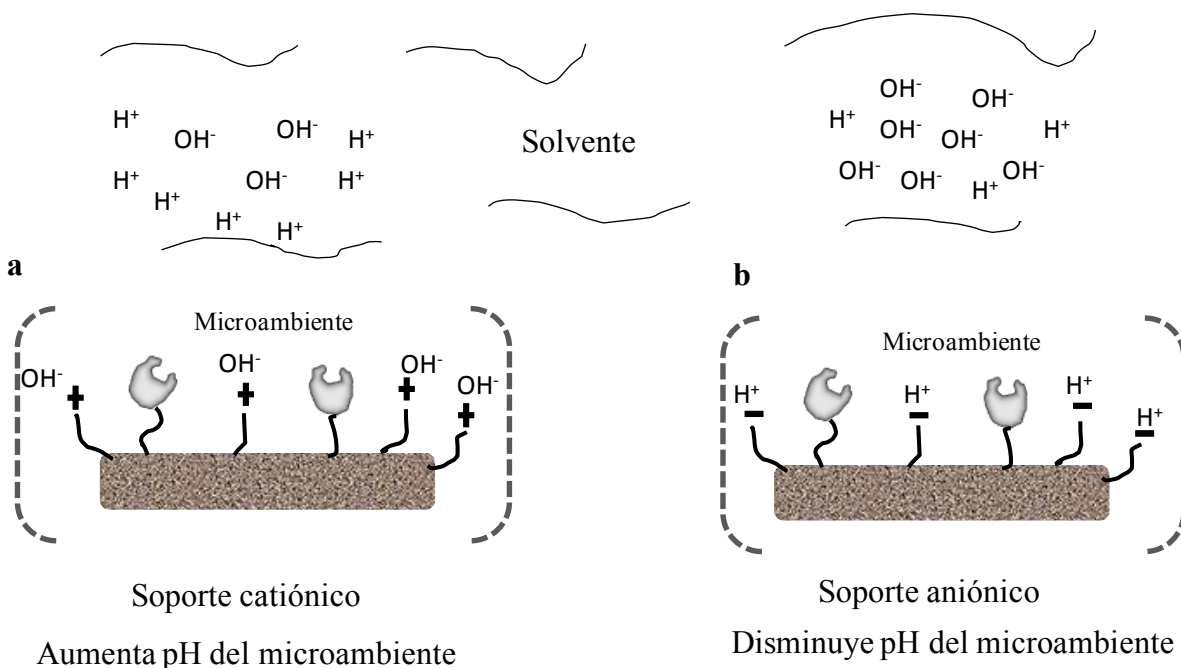


Fig. 5. Efecto de las propiedades de carga de los materiales utilizados como soporte en el pH del microambiente de las enzimas inmovilizadas (a) soporte catiónico (b) soporte aniónico.

A manera de ejemplo, si una enzima es inmovilizada en un material que posee características catiónicas, el pH del microambiente será mayor que el pH del solvente (debido a la atracción de iones OH^- de la solución), causando que el pH óptimo y estabilidad de la enzima se desplace hacia valores de bajo pH (Bissett y Sternberg, 1978; Krajewska y col., 1990). El comportamiento opuesto, sucede en soportes cuyos materiales poseen características aniónicas (Figura 5).

En relación a lo anterior, varios estudios han reportado que los grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) del quitosano le confieren a este material un carácter catiónico por lo que las enzimas inmovilizadas en materiales a base de este polisacárido presentan su máxima actividad a valores de pH más bajos con respecto a la enzima libre o soluble. Como el trabajo de Ju y col. (2012), quienes inmovilizaron α -quimotripsina en nanopartículas magnéticas de quitosano- Fe_3O_4 , observando que el máximo de actividad catalítica del sistema inmovilizado ocurre en un rango de pH entre 8 y 10 manteniendo más del 55% de su actividad a pH 4. En contraparte, la enzima libre presentó su máxima actividad a valores de pH entre 9 y 10; sin embargo, a pH 6 la actividad enzimática se perdió casi por completo. En otra investigación Tang y col. (2006), reportaron que la actividad enzimática de una proteasa neutra inmovilizada en nanopartículas

de quitosano entrecruzadas con tripolifosfato de sodio se mantiene cerca del 100% a pH 6, mientras que la enzima libre perdió cerca del 40% de su actividad al mismo pH. Resultados similares a los antes citados fueron obtenidos por Kilinc y col. (2002) y Xi y col. (2005), al inmovilizar papaína en partículas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído y tripsina en esferas de quitosano con núcleo de sílica gel, respectivamente.

Por otro lado, se ha reportado que en algunos casos al inmovilizar enzimas en matrices de quitosano activadas con agentes bifuncionales como el glutaraldehído, el cual induce reacciones de entrecruzamiento entre la enzima inmovilizada y el soporte, el efecto de desplazamiento del pH óptimo de catálisis hacia zonas ácidas no es significativo. Dicho comportamiento se atribuye a que los grupos amino del quitosano están muy poco disponibles para protonarse debido a que interactúan con los agentes entrecruzadores utilizados (Altun y Cetinus 2007; Dhananjay y Mulimani, 2008).

5.3 Parámetros cinéticos de las proteasas inmovilizadas

El proceso de inmovilización de enzimas puede llegar a provocar un efecto en parámetros cinéticos como la

constante de Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad máxima de reacción (V_{max}). De manera general se ha reportado que el proceso de inmovilización provoca que las enzimas tengan una menor afinidad por su sustrato (presentan un aumento en su K_m) y presenten una disminución en su valor de V_{max} (Cooney, 2011). Cetinus y Öztop (2003), mencionan que la pérdida de afinidad por el sustrato de las enzimas inmovilizadas puede deberse, principalmente, a que el soporte genera un impedimento estérico hacia el sitio activo de la enzima provocando una inadecuada transferencia del sustrato hacia dicho sitio. Además, el incremento en la K_m puede ser también una consecuencia de los cambios conformacionales que sufre la enzima al unirse al soporte de inmovilización. De manera similar, la disminución en el valor de V_{max} observado en las enzimas inmovilizadas puede deberse a que ciertos aminoácidos importantes en el sitio activo participen en la unión de la enzima con el soporte (Bhandari y col., 2009).

Son varios los trabajos que muestran el efecto de la inmovilización sobre las variables cinéticas antes mencionadas. Li y col. (2012) encontraron que el valor de K_m aumenta casi el doble al inmovilizar una proteasa neutra en esferas de quitosano modificadas químicamente (carboxi-metil-quitosano y N-succinil-quitosano) con respecto a la enzima libre. En otro estudio, Bacheva y col. (2008) reportaron que el valor de K_m aumentó aproximadamente 9 veces comparándolo con la K_m de la enzima soluble al inmovilizar subtilisina (serina-proteasa) en películas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído. En este mismo estudio, el valor de V_{max} de la enzima inmovilizada fue aproximadamente 100 veces menor con respecto a la enzima sin inmovilizar. Liu y col. (2005) inmovilizaron tripsina en nanopartículas de quitosano modificado hidrofólicamente con ácido linoléico y explican que dicha disminución del K_m de la enzima inmovilizada está más relacionada con la rigidez conformacional causada por el proceso de inmovilización que con la limitación en la transferencia de sustrato al sitio activo de la enzima, la cual se sabe es disminuida en sistemas de inmovilización a nanoescala. De la misma manera, otros autores han observado el efecto antes mencionado sobre las variables cinéticas K_m y V_{max} al inmovilizar proteasas en materiales a base de quitosano. Como ejemplo están los resultados obtenidos por Ahmed y col. (2007) y Sangeetha y Abraham (2008).

Aun y cuando en varios estudios se han reportado los efectos negativos que causa el proceso de

inmovilización sobre K_m y V_{max} , existen otros trabajos en los cuales dicho proceso aumenta la afinidad de la enzima por su sustrato y causa además un incremento en su V_{max} (Benkhelifa y col., 2005; Zhang y col., 2008; Veselova y col., 2009; Singh y col., 2011).

5.4 Estabilidad operacional de proteasas inmovilizadas en materiales a base de quitina y quitosano

La forma más usual para evaluar la estabilidad operacional de las enzimas inmovilizadas es determinando: a) la capacidad que poseen éstas de retener su actividad catalítica después de varios ciclos de uso, b) la capacidad de las enzimas inmovilizadas en reactores para operar de forma continua y c) su estabilidad al almacenamiento (Novick y Rozzell, 2005). A continuación se discuten los efectos de la inmovilización sobre la estabilidad operacional de los sistemas catalíticos inmovilizados.

5.4.1. Capacidad de reutilización y operación continua en reactores

Desde el punto de vista económico, la capacidad de reutilización de las enzimas inmovilizadas representa una gran ventaja con respecto al uso de enzimas en forma soluble, ya que en el caso de las últimas, éstas son desechadas después de un solo uso, agregándole un mayor costo financiero al proceso de interés debido a que la obtención de enzimas en forma pura requiere también de una alta inversión monetaria (Li y col., 2006).

De acuerdo a Dwevedi y Kayastha (2009), el uso repetido del sistema catalítico provoca que la fuerza de los enlaces establecidos entre la enzima y el soporte se debilite provocando pérdidas en actividad debido al desprendimiento de la enzima del soporte. Además, la alta frecuencia de interacción entre el sustrato y el sitio activo de la enzima causa que dicho sitio se distorsione resultando en una disminución en la eficiencia catalítica.

Por lo anterior, el tipo de enlace formado entre la enzima y el soporte de inmovilización debe de ser lo suficientemente estable para evitar desprendimientos de la enzima y con ello mantener la eficiencia catalítica del sistema durante varios ciclos de uso. A este respecto en la Tabla 2 se observa que para el caso de las proteasas inmovilizadas en materiales a base de quitina y quitosano, la actividad proteolítica puede ser mantenida en al menos un 60% con respecto a su actividad inicial después de varios ciclos de uso.

Tabla 2. Estabilidad operacional y aplicaciones de proteasas inmovilizadas en materiales a base de quitina y quitosano

Enzima	Características de inmovilización	Aplicación	Estabilidad operacional	Referencia
Pepsina y "rapidase" (proteasas ácidas)	Inmovilización covalente en esferas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído (GA)	Hidrólisis continua de gluten de trigo en bio-reactor para la generación de péptidos con propiedades espumantes	El rendimiento del proceso se mantuvo a más del 70% durante la operación continua del bio-reactor. La vida media de la actividad enzimática fue de 45 días. No se observó contaminación microbiana durante el periodo de operación	Motoi y col. (2004)
Proteasa XIX	Inmovilización covalente en esferas de quitosano entrecruzadas con (GA)	Hidrólisis continua de caseína en bio-reactor tipo Torus	La hidrólisis de caseína fue mayor para la proteasa inmovilizada y empacada en el reactor Torus (grado de hidrólisis de 25%) que para la proteasa libre en reactor de tanque agitado (grado de hidrólisis de 12%)	Benkhelifa y col. (2005)
Proteasa neutra	Inmovilización covalente en esferas de carboxi-metil-quitosano entrecruzadas con GA	Producción de quitosano de bajo peso molecular	La actividad residual de la proteasa inmovilizada fue del 79 % después de 30 días de almacenamiento a 25°C, mientras que bajo las mismas condiciones de almacenamiento la proteasa libre no presentó actividad enzimática. Retención del 78% de actividad enzimática después de 10 ciclos de uso repetido en la hidrólisis de solución de quitosano	Li y col. (2006)

Tripsina	Inmovilización por adsorción a esferas de sílica gel recubiertas de quitosano funcionalizadas con metales (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+})	Fabricación de resina cromatográfica para purificación de proteínas por afinidad a metales	Retención del 80% de actividad enzimática de la tripsina inmovilizada en esferas funcionalizadas con Zn^{2+} , Ni^{2+} después de almacenamiento a 25°C. La tripsina libre preservó alrededor del 20% de actividad bajo la misma condición de almacenamiento	Wu y col. (2006)
Pepsina porcina	Inmovilización covalente en esferas de quitosano activadas con GA	Coagulación de leche	La pepsina soluble registró pérdida de actividad después de 5 días de almacenamiento a 5°C, mientras que la enzima inmovilizada retuvo el 100% de actividad enzimática después de 30 días bajo las mismas condiciones de almacenamiento. Retención del 95% de actividad después de 3 ciclos de uso.	Altun y Cetinus, (2007)
Tiol-proteasa	Inmovilización de la enzima en esferas de quitosano entrecruzadas con GA	Catálisis en medios acuosos no convencionales; etanol y dimetil sulfoxido (DMSO)	Retención del 100% de actividad de la enzima inmovilizada a concentraciones del 15% de etanol y DMSO con respecto a la enzima libre, la cual registró pérdidas del 40% y 20% en actividad al incubarse en etanol y DMSO respectivamente	Bhandari y col. (2009)
Aminopeptidasa	Inmovilización cápsulas de alginato recubiertas con quitosano	Aceleración del proceso de maduración de queso Cheddar	No determinada	Azarnia y col. (2010)

Papaína	Inmovilización por adsorción en membranas de nylon recubiertas con quitosano y queladas con metales	Fabricación de resina cromatográfica para purificación de papaína por afinidad a metales (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , y Co^{2+})	El ciclo de elución de papaína fue realizado tres veces sobre la misma resina, observándose que la capacidad de adsorción de la enzima se mantuvo casi al 100% después de los tres ciclos de uso	He y col. (2010)
L-metioninasa	Inmovilización covalente en hojuelas de quitina activadas con GA	Producción continua de metanotiol ($\text{CH}_3\text{-SH}$)	Retención del 60% de actividad enzimática después de tres ciclos de reacción.	El-Sayed y Shindia, (2011)
Tripsina	Inmovilización covalente en microesferas de quitosano	Resina cromatográfica para purificación por afinidad de inhibidor de tripsina	La actividad de la tripsina inmovilizada disminuyó 12.5% después de 20 días de almacenamiento a 25°C, mientras que la actividad de la tripsina libre disminuyó 52.6% bajo las mismas condiciones. Capacidad para realizar seis operaciones sucesivas de separación cromatográfica, manteniendo el 90% de la actividad enzimática inicial después de los seis ciclos de operación.	Zhang y col. (2011)
α - quimotripsina	Inmovilización covalente en nanopartículas magnéticas de quitosano- Fe_3O_4	Síntesis de péptidos	La enzima inmovilizada retuvo el 60% de su actividad original después de 12 ciclos de uso.	Ju y col. (2012)
Tripsina	Inmovilización en nano-cápsulas de quitosano entrecruzadas con tripolifosfato	Suplementación de dietas para acuicultura	No determinada	Kumari y col. (2013)

Los resultados altamente aceptables de capacidad de reutilización mostrados en la Tabla 2, pueden estar relacionados con el que en la mayoría de los casos se utiliza glutaraldehído para la inmovilización de las proteasas a través de un entrecruzamiento de tipo covalente entre los grupos amino presentes en el soporte y en las enzimas (Fig. 4). El entrecruzamiento del quitosano con glutaraldehído provoca que los geles formados posean una mayor estabilidad y durabilidad (Krajewska y col., 2004; Altun y Cetinus, 2007).

Como se explicó anteriormente, una de las ventajas principales que ofrece la inmovilización de enzimas en soportes sólidos es que estas pueden ser empacadas en un reactor generando con ello procesos continuos de catálisis sin ocasionar pérdidas de la enzima al final del proceso. Existen pocos estudios relacionados con la hidrólisis continua de proteínas con la ayuda de bioreactores que contengan proteasas inmovilizadas. Motoi y col. (2004), consideran que este tipo de hidrólisis se ve limitada por la fácil degradación de la estructura proteica debido a la contaminación microbiana; y además, a que el gran tamaño molecular de los sustratos de origen proteico generalmente ocasiona problemas de impedimento estérico que reducen la capacidad de hidrólisis de las proteasas inmovilizadas.

En relación a las limitantes antes expuestas, Motoi y col. (2004) implementaron un sistema catalítico compuesto de un bioreactor empacado con pepsina inmovilizada covalentemente en esferas de quitosano para la hidrólisis de gluten. En otro estudio, Benkhelifa y col. (2005) desarrollaron un reactor tipo Torus para llevar a cabo la hidrólisis de caseína con la ayuda de una proteasa XIX de *Aspergillus sojae* inmovilizada en esferas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído. En la Tabla 2 se muestran las eficiencias en la hidrólisis y capacidad de operación continua de las proteasas inmovilizadas en los estudios antes citados.

5.4.2. Estabilidad al almacenamiento

De acuerdo a Gianfreda y Scarfi (1991), las proteasas presentan una gran inestabilidad al almacenamiento debido a que este tipo de enzimas se hidrolizan entre ellas mismas; dicho de otra manera, presentan autólisis. De lo anterior deriva que la inmovilización de enzimas sea una de las estrategias más utilizadas para estabilizar a estas macromoléculas durante un almacenamiento prolongado basándose en la premisa de que el proceso de inmovilización reduce la flexibilidad conformacional de la enzima y por ende

se reduce la velocidad del proceso autolítico. Aunado a lo anterior, Mateo y col. (2007) explican que la inmovilización de enzimas en un soporte sólido poroso ocasiona que las moléculas de enzima se dispersen por completo en el soporte y por lo tanto, la posibilidad de autólisis o de proteólisis ocasionada por enzimas proteolíticas presentes en el extracto (diferentes a la enzima de interés) es disminuida debido a que estas últimas también se encuentran unidas al soporte.

Tomando en cuenta que los materiales a base de quitina y quitosano presentan porosidad y gran afinidad por las proteínas, la estabilidad al almacenamiento de las proteasas inmovilizadas en estos polisacáridos se ve notablemente mejorada incluso a temperaturas de almacenamiento de 25°C. En la Tabla 2 se muestran porcentajes de retención de actividad enzimática con respecto al tiempo de almacenamiento de proteasas inmovilizadas en quitina y quitosano.

5.5 Aplicaciones de sistemas catalíticos constituidos de proteasas inmovilizadas en materiales a base de quitina y quitosano

En la Tabla 2 se muestran algunas aplicaciones de los sistemas catalíticos conformados por proteasas inmovilizadas en materiales a base de quitina y quitosano. Se observa que estos sistemas pueden ser utilizados como herramientas biotecnológicas en diversas áreas de la industria tales como procesos de separación cromatográfica, producción de compuestos bio-activos, procesos relacionados con la industria alimentaria y catálisis en medios no convencionales, entre otros. A continuación se discuten algunas de las aplicaciones de proteasas inmovilizadas en quitina y quitosano.

En un estudio realizado por Azarnia y col. (2010), se encapsuló una aminopeptidasa en una matriz compuesta de alginato recubierta con quitosano. El sistema catalítico fue aplicado en la maduración de queso Cheddar como una alternativa al método tradicional de maduración que consiste en la adición directa de las enzimas a la leche y que implica una pérdida de alrededor del 90% de las enzimas adicionadas durante la fabricación del queso. Los resultados de esta investigación indican que la velocidad de maduración del queso Cheddar fue aumentada significativamente con respecto al queso control. El análisis sensorial de los quesos indicó que el queso madurado con la enzima encapsulada poseía

mayor sabor y aroma que el queso madurado con la enzima libre y los panelistas no detectaron ningún efecto sensorial negativo en los quesos que contenían las cápsulas de alginato-quitosano.

En un estudio reciente, Kumari y col. (2013) encapsularon tripsina en nanocápsulas de quitosano para la suplementación de una dieta dirigida al cultivo de carpa hindú (*Labeo rohita*). De acuerdo a los autores, la suplementación de enzimas proteolíticas exógenas en la dieta es requerida en ciertas condiciones de enfermedad tanto en humanos como en animales; sin embargo, tal aplicación se ve limitada por la inestabilidad que presentan las enzimas a ciertas condiciones de pH, temperatura, susceptibilidad a inhibidores y a la posibilidad de que la inadecuada administración de estas enzimas cause daño a nivel intestinal. Los resultados de esta investigación indicaron que la dieta suplementada con el sistema nanoencapsulado de liberación prolongada de tripsina tuvo un mejor efecto que la dieta suplementada con la enzima libre en la digestibilidad y actividad proteolítica intestinal de carpa hindú.

Dentro del campo de la biotecnología un aspecto de gran relevancia es la purificación de enzimas. En este respecto el quitosano ha sido considerado como una de las matrices cromatográficas con mayor potencial por lo que su uso para estos fines ha aumentado en años recientes (Gupta y Jabrail 2006). Por ejemplo, He y col. (2010) desarrollaron un sistema cromatográfico consistente de una resina de nylon recubierta con quitosano y funcionalizada con metales (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , y Co^{2+}) con la finalidad de purificar papaína a gran escala. Los autores reportaron que utilizando la resina de afinidad a metales lograron purificar a la papaína en un solo paso cromatográfico con incrementos en pureza del orden de 26.2, 20.5, 27, y 23.2 para Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , y Co^{2+} respectivamente.

Conclusiones

Dentro de la amplia variedad de polímeros naturales utilizados como soportes para inmovilizar enzimas, la quitina y el quitosano se colocan como una de las mejores opciones debido a las propiedades funcionales de estos polisacáridos. Por otro lado, las proteasas son enzimas que poseen gran importancia desde el punto de vista de su aplicación industrial por lo que su inmovilización puede potencializar aún más la capacidad catalítica de este tipo de enzimas.

La inmovilización de proteasas en materiales a base de quitina y quitosano es una estrategia que

permite aumentar la estabilidad de la estructura proteica y por ende disminuir su desnaturalización a altas temperaturas. De igual forma, mejora su estabilidad al almacenamiento debido a que el proceso de inmovilización disminuye considerablemente la autoproteólisis. Tomando en cuenta el efecto estabilizante de la inmovilización sobre la actividad proteolítica, resulta de gran interés el realizar estudios encaminados al diseño de bioreactores que permitan la hidrólisis continua y específica de sustratos de origen proteico para la generación de hidrolizados que posean propiedades funcionales y sensoriales mejoradas (p. ej. capacidad espumante, antihipertensiva, antioxidante, reducción de sabor amargo, etc.).

La reactividad química de la quitina y el quitosano permite el diseño de una extensa gama de sistemas catalíticos en los cuales las proteasas pueden ser inmovilizadas de forma covalente, iónica, por atrapamiento o por encapsulación. Además, estos polisacáridos pueden ser combinados con una extensa variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos permitiendo tanto el diseño de estructuras de inmovilización con propiedades muy específicas como el diseño de estructuras catalíticas desde la escala macro hasta el orden nanométrico. Aunado a lo anterior, las características de compatibilidad biológica de la quitina y el quitosano pueden permitir el diseño de soportes de inmovilización de proteasas para ser utilizados en aplicaciones donde el ser humano sea el usuario final, como lo son las relacionadas con la industria alimentaria y farmacéutica.

Agradecimientos

El primer autor agradece el apoyo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad Politécnica de Sinaloa, por el apoyo brindado para la realización de estudios de doctorado en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C.).

Referencias

- Agulló, E., Rodríguez, M.S., Ramos, V. y Albertengo, L. (2003). Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromolecular Bioscience* 3, 521-530.
- Ahmed, S. A., Saleh, S. A. y Abdel-Fattah, A. F. (2007). Stabilization of *Bacillus*

- licheniformis ATCC 21415 alkaline protease by immobilization and modification. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 1, 313-322.
- Al-Adhami, A. J., Bryjak, J., Greb-Markiewicz, B. y Peczyńska-Czoch, W. (2002). Immobilization of wood-rotting fungi laccases on modified cellulose and acrylic carriers. *Process Biochemistry* 37, 1387-1394.
- Alloue, W. A. M., Destain, J., El Medjoub, T., Ghalfi, H., Kabran, P. y Thonart, P. (2008). Comparison of *Yarrowia lipolytica* lipase immobilization yield of entrapment, adsorption, and covalent bond techniques. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 150, 51-63.
- Altun, G.D. y Cetinus, S.A. (2007). Immobilization of pepsin on chitosan beads. *Food Chemistry* 100, 964-971.
- Ansari, S. A. y Husain, Q. (2012). Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review. *Biotechnology Advances* 30, 512-523.
- Azarnia, S., Lee, B. H., St-Gelais, D., Champagne, C. P. y Kilcawley, K. N. (2010). Effect of free or encapsulated recombinant aminopeptidase of *Lactobacillus rhamnosus* S93 on acceleration of cheddar cheese ripening. *Food Biotechnology* 24, 135-149.
- Bacheva, A., Isakov, M., Lysogorskaya, E., Macquarrie, D. y Philippova, I. Y. (2008). Biocomposite of subtilisin Carlsberg with chitosan as an effective biocatalyst for hydrolysis and synthesis of peptides. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 343, 334-338.
- Barberies, S., Guzmán, F. e Illanes, A. (2008). Proteases as Catalysts for Peptide Synthesis. En: *Enzyme biocatalysis: Principles and Applications*. (A. Illanes, ed.), Pp. 257. Springer Verlag, Berlin.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A., Velázquez-del Valle, M., Hernández-López, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E. y Wilson, C. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* 25, 108-118.
- Beilen, J. B. v. y Li, Z. (2002). Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 338-344.
- Benkhelifa, H., Bengoa, C., Larre, C., Guibal, E., Popineau, Y. y Legrand, J. (2005). Casein hydrolysis by immobilized enzymes in a torus reactor. *Process Biochemistry* 401, 461-467.
- Betigeri, S. S. y Neau, S. H. (2002). Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. *Biomaterials* 23, 3627-3636.
- Bhandari, S., Gupta, V.K. y Singh, H. (2008). Enhanced stabilization of mungbean thiol protease immobilized on glutaraldehyde-activated chitosan beads. *Biocatalysis and Biotransformation* 27, 71-77.
- Bickerstaff, G.F. (1997). Immobilization of enzymes and cells. Some practical considerations. En: *Immobilization of Enzymes and Cells* (G.F. Bickerstaff, ed.) Pp. 1-11. Humana Press, Totowa.
- Bissett, F. y Sternberg, D. (1978). Immobilization of *Aspergillus beta-glucosidase* on chitosan. *Applied and Environmental Microbiology* 35, 750-755.
- Brady, D. y Jordaan, J. (2009). Advances in enzyme immobilization. *Biotechnology Letters* 31, 1639-1650.
- Brena, B.M. y Batista-Viera, F. (2006). Immobilization of Enzymes. A literature survey. En: *Immobilization of enzymes and cells*. (J.M. Guisan ed.) pp. 15-30. Humana Press, Towota.
- Bruins, M. E., Janssen, A. E. y Boom, R. M. (2001). Thermozyms and their applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 90, 155-186.
- Cao, L., van Rantwijk, F. y Sheldon, R. A. (2000). Cross-linked enzyme aggregates: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Organic Letters* 2, 1361-1364.
- Castro, A., González, I., Tzompantzi, F. y Viniegra-González, G. (2013). Influence of the type of support and immobilization on the activity and stability of laccase enzyme (*Trametes versicolor*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12, 241-255.

- Çetinus, Ş.A. y Öztop, N.H. (2003). Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. *Enzyme and Microbial Technology* 32, 889-894.
- Chiou, S. H., Hung, T. C., Giridhar, R. y Wu, W. T. (2007). Immobilization of lipase to chitosan beads using a natural cross-linker. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 37, 265-275.
- Cooney, M.J. (2011). Kinetic measurements for enzyme immobilization. En: *Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and protocols. Methods in Molecular Biology*. (S.D. Minter, ed.), Pp. 207-225). Springer Science, New Jersey.
- Cowan, D. A. y Fernandez-Lafuente, R. (2011). Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. *Enzyme and Microbial Technology* 494, 326-346.
- Cui, J. D. y Jia, S. R. (2013). Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: current development and future challenges. *Critical Reviews in Biotechnology* doi:10.3109/07388551.2013.795516
- Datta, S., Christena, L. R. y Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech* 31, 1-9.
- Dhananjay, S. y Mulimani, V. (2008). Optimization of immobilization process on crab shell chitosan and its application in food processing. *Journal of Food Biochemistry* 32, 521-535.
- Díaz-Rojas, E.I., Argüelles-Monal, W.M., Higuera-Ciapara, I., Hernández, J., Lizardi-Mendoza, J. y Goycoolea, F.M. (2006). Determination of chitin and protein contents during the isolation of chitin from shrimp waste. *Macromolecular Bioscience* 6, 340-347.
- Dwevedi, A. y Kayastha, A. M. (2009). Stabilization of β -galactosidase (from peas) by immobilization onto Amberlite MB-150 beads and its application in lactose hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 682-688.
- El-Sayed, A. y Shindia, A. (2011). Characterization and immobilization of purified *Aspergillus flavipes*-methioninase: continuous production of methanethiol. *Journal of Applied Microbiology* 111, 54-69.
- Fágáin, C. Ó. (1995). Understanding and increasing protein stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1252, 1-14.
- Ferraro, V., Cruz, I. B., Jorge, R. F., Malcata, F. X., Pintado, M. E. y Castro, P. M. L. (2010). Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: A review. *Food Research International* 439, 2221-2233.
- Flores-Maltos, A., Rodríguez-Durán, L. V., Renovato, J., Contreras, J. C., Rodríguez, R. y Aguilar, C. N. (2011). Catalytic properties of free and immobilized *Aspergillus niger* tannase. *Enzyme research* doi:10.4061/2011/768183
- Gianfreda, L. y Scarfi, M. R. (1991). Enzyme stabilization: state of the art. *Molecular and Cellular Biochemistry* 100, 97-128.
- Girigowda, K. y Mulimani, V. (2006). Hydrolysis of galacto-oligosaccharides in soymilk by κ -carrageenan-entrapped α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22, 437-442.
- Gupta, R., Beg, Q. y Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 591, 15-32.
- Gupta, K. y Jabrail, F. H. (2006). Glutaraldehyde and glyoxal cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of centchroman. *Carbohydrate Research* 341, 744-756.
- Hanefeld, U., Gardossi, L. y Magner, E. (2009). Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews* 38, 453-468.
- Harish Prashanth, K. y Tharanathan, R. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends in Food Science and Technology* 18, 117-131.
- He, Z.Y., Christopher, B.W., Zhou, Y.T., Nie, H.L. y Zhu, L.M. (2010). Papain adsorption on chitosan-coated nylon-based immobilized metal ion (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}) affinity

- membranes. *Separation Science and Technology* 45, 525-534.
- Hernández-Ochoa, L., Gonzales-Gonzales, A., Gutiérrez-Mendez, N., Muñoz-Castellanos, L. y Quintero-Ramos, A. (2011). Estudio de la actividad antibacteriana de películas elaboradas con quitosano a diferentes pesos moleculares incorporando aceites esenciales y extractos de especias como agentes antimicrobianos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10, 455-463.
- Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F. y Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: an update. *Journal of Chemical Biology*. DOI 10.1007/s12154-013-0102-9
- Honarkar, H. y Barikani, M. (2009). Applications of biopolymers I: chitosan. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly* 140, 1403-1420.
- Huang, X.J., Ge, D. y Xu, Z.K. (2007). Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. *European Polymer Journal* 43, 3710-3718.
- Illanes, A., Altamirano, C. y Wilson, L. (2008). Homogeneous enzyme kinetics. En: *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. (A. Illanes, ed.), Pp. 140-148. Springer Verlag, Berlin.
- Iyer, P. V. y Ananthanarayan, L. (2008). Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry* 43, 1019-1032.
- Janeček, S. (1993). Strategies for obtaining stable enzymes. *Process Biochemistry* 28, 435-445.
- Jia, H., Zhu, G. y Wang, P. (2003). Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: the effect of particle mobility. *Biotechnology and Bioengineering* 84, 406-414.
- Ju, H.Y., Kuo, C.H., Too, J.R., Huang, H.Y., Twu, Y.K., Chang, C.M. J., Liu, Y. C. y Shieh, C.J. (2012). Optimal covalent immobilization of α -chymotrypsin on Fe₃O₄-chitosan nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 78, 9-15.
- Khor, E. y Lim, L. Y. (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 24, 2339-2349.
- Kilinc, A., Onal, S. y Telefoncu, A. (2002). Stabilization of papain by modification with chitosan. *Turkish Journal of Chemistry* 26, 311-316.
- Kirk, O., Borchert, T. V. y Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 345-351.
- Kirkkopru, I., Alpaslan, C., Omay, D. y Güvenilir, Y. (2006). Use of different adsorbents for sorption and *Bacillus polymyxa* protease immobilization. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 132, 1034-1040.
- Krajewska, B. (2004). Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 126-139.
- Krajewska, B., Leszko, M. y Zaborska, W. (1990). Urease immobilized on chitosan membrane: preparation and properties. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 48, 337-350.
- Kumari, R., Gupta, S., Singh, A. R., Ferosekhan, S., Kothari, D. C., Pal, A. K. y Jadhao, S. B. (2013). Chitosan nanoencapsulated exogenous trypsin biomimics zymogen-like enzyme in fish gastrointestinal tract. *PLoS one* 8, 1-12.
- Kurita, K. (2001). Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science* 26, 1921-1971.
- Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology* 8, 203-226.
- Langmuir, I. y Schaefer, V.J. (1938). Activities of urease and pepsin monolayers. *Journal of the American Chemical Society* 60, 1351-1360.
- Li, J., Cai, J., Zhong, L. y Du, Y. (2012). Immobilization of a protease on modified chitosan beads for the depolymerization of chitosan. *Carbohydrate Polymers* 87, 2697-2705.
- Li, J., Du, Y., Sun, L., Liang, H., Feng, T., Wei, Y. y Yao, P. (2006). Chitosaneous hydrogel beads for immobilizing neutral protease for application in the preparation of low molecular weight chitosan and chito-oligomers. *Journal of Applied Polymer Science* 101, 3743-3750.

- Liu, C.G., Desai, K.G. H., Chen, X.G. y Park, H.J. (2005). Preparation and characterization of nanoparticles containing trypsin based on hydrophobically modified chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 535, 1728-1733.
- Macquarrie, D. J. y Hardy, J. J. (2005). Applications of functionalized chitosan in catalysis. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 44, 8499-8520.
- Mahmoud, D. A. y Helmy, W. A. (2009). Potential application of immobilization technology in enzyme and biomass production (Review Article). *Journal of Applied Sciences Research* 5, 2466-2476.
- Manrich, A., Galvão, C., Jesus, C. D., Giordano, R. C. y Giordano, R. L. (2008). Immobilization of trypsin on chitosan gels: Use of different activation protocols and comparison with other supports. *International Journal of Biological Macromolecules* 43, 54-61.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. y Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1451-1463.
- Matsumoto, M. y Ohashi, K. (2003). Effect of immobilization on thermostability of lipase from *Candida rugosa*. *Biochemical Engineering Journal* 14, 75-77.
- Matto, M. y Husain, Q. (2006). Entrapment of porous and stable concanavalin A-peroxidase complex into hybrid calcium alginate-pectin gel. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81, 1316-1323.
- Matto, M. y Husain, Q. (2009). Calcium alginate-starch hybrid support for both surface immobilization and entrapment of bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57, 164-170.
- Moehlenbrock, M.J. y Minteer, S.D. (2011). Introduction to the field of enzyme immobilization and stabilization. En: *Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and Protocols*. (S.D. Minteer, ed.) Pp. 1-7 Springer Science: Clifton.
- Motoi, H., Fukudome, S. y Urabe, I. (2004). Continuous production of wheat gluten peptide with foaming properties using immobilized enzymes. *European Food Research and Technology* 219, 522-528.
- Mourya, V. e Inamdar, N. N. (2008). Chitosan-modifications and applications: opportunities galore. *Reactive and Functional Polymers* 68, 1013-1051.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. y Lehninger, A.L. (2008). *Principles of Biochemistry*. Quinta edición. Freeman and Company, New York.
- Nelson, J. y Griffin, E.G. (1916). Adsorption of invertase. *Journal of the American Chemical Society* 38, 1109-1115.
- Nelson, J. y Hitchcock, D.I. (1921). The activity of adsorbed invertase. *Journal of the American Chemical Society* 43, 1956-1961.
- Novick, S.J. y Rozzell, J.D. (2005). Immobilization of enzymes by covalent attachment. En: *Microbial Enzymes and Biotransformations*, (J.L. Barredo ed.) Pp. 247-271. Humana Press, Totowa.
- Rasmussen, R. S. y Morrissey, M. T. (2007). Marine biotechnology for production of food ingredients. *Advances in Food and Nutrition Research* 52, 237-292.
- Ravi Kumar, M.V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers* 46, 1-27.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31, 603-632.
- Sangeetha, K. y Emilia Abraham, T. (2008). Investigation on the development of sturdy bioactive hydrogel beads. *Journal of Applied Polymer Science* 107, 2899-2908.
- Sheldon, R. A. (2011). Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Applied Microbiology and Biotechnology* 92, 467-477.
- Sheldon, R.A. (2007). Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis and Catalysis* 349, 1289-1307.

- Singh, A.N., Suthar, N., Singh, S. y Dubey, V.K. (2011). Glutaraldehyde activated chitosan matrix for immobilization of a novel cysteine protease, procerain B. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 6256-6262.
- Singh, R. K., Tiwari, M. K., Singh, R. y Lee, J.K. (2013). From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 1232-1277.
- Synowiecki, J. y Al-Khateeb, N. A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43, 145-171.
- Talbert, J. N. y Goddard, J. M. (2012). Enzymes on material surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 93, 8-19.
- Talbert, J. N. y Hotchkiss, J. H. (2012). Chitosan-tethered microspheres for lactase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 78, 78-84.
- Tanaka, H., Matsumura, M. y Veliky, I. (1984). Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering* 26, 53-58.
- Tang, Z.X., Qian, J.Q. y Shi, L.-E. (2006). Characterizations of immobilized neutral proteinase on chitosan nano-particles. *Process Biochemistry* 415, 1193-1197.
- Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases. An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 90, 1-11.
- Tischer, W. y Wedekind, F. (1999). Immobilized enzymes: methods and applications. En: *Biocatalysis-from Discovery to Application* (W.D. Fessner, A. Archelas, D. C. Demirjian, R. Furstoss, H. Griengl, K. E. Jaeger, E. Morís-Varas, R. Öhrlein, M. T. Reetz, J.-L. Reymond, M. Schmidt, S. Servi, P. C. Shah, W. Tischer y F. Wedekind, eds.), Pp. 95-126. Springer, Berlin.
- Veselova, I., Kireiko, A. y Shekhovtsova, T. (2009). Catalytic activity and the stability of horseradish peroxidase increase as a result of its incorporation into a polyelectrolyte complex with chitosan. *Applied Biochemistry and Microbiology* 45, 125-129.
- Wang, P. (2006). Nanoscale biocatalyst systems. *Current Opinion in Biotechnology* 17, 574-579.
- Wohlgemuth, R. (2010). Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry. *Current Opinion in Biotechnology* 21, 713-724.
- Wu, J., Luan, M. y Zhao, J. (2006). Trypsin immobilization by direct adsorption on metal ion chelated macroporous chitosan-silica gel beads. *International Journal of Biological Macromolecules* 39, 185-191.
- Xi, F., Wu, J., Jia, Z. y Lin, X. (2005). Preparation and characterization of trypsin immobilized on silica gel supported macroporous chitosan bead. *Process Biochemistry* 408, 2833-2840.
- Zhang, B., Zhang, L., Wang, D.F. y Sun, J.P. (2011). Improvement of purification of trypsin inhibitor from wild soybean (*Glycine Soja* Sieb. & Zucc.) using chitosan resin-immobilized trypsin. *Journal of Food Biochemistry* 356, 1660-1670.
- Zhang, J., Zhang, S. y Wang, Y.S. (2008). Stability of β -galactosidase immobilized on composite microspheres of artemisia seed gum and chitosan. *Polymer Composites* 29, 9-14.
- Zhang, L., Zhang, B., Lin, H., Liu, P. P., Yu, L. N. y Wang, D. F. (2008). Preparation of trypsin-immobilised chitosan beads and their application to the purification of soybean trypsin inhibitor. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 2332-2339.
- Zohuriaan-Mehr, M. J. (2005). Advances in chitin and chitosan modification through graft copolymerization: a comprehensive review. *Iranian Polymer Journal* 14, 235-265.

CAPÍTULO II

**Acidic proteases from Monterey sardine
(*Sardinops sagax caerulea*) immobilized on
shrimp waste chitin and chitosan supports:
Searching for a by-product catalytic system**

**Artículo publicado en la revista Applied Biochemistry and
Biotechnology**

Acidic Proteases from Monterey Sardine (*Sardinops sagax caerulea*) Immobilized on Shrimp Waste Chitin and Chitosan Supports: Searching for a By-product Catalytic System

Jesus Aaron Salazar-Leyva · Jaime Lizardi-Mendoza · Juan Carlos Ramirez-Suarez ·
Elisa Miriam Valenzuela-Soto · Josafat Marina Ezquerria-Brauer ·
Francisco Javier Castillo-Yañez · Ramon Pacheco-Aguilar

Received: 2 May 2013 / Accepted: 17 July 2013 /
Published online: 30 July 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Solid wastes generated from the seafood industry represent an important environmental pollutant; therefore, utilization of those wastes for the development of processing biochemical tools could be an attractive and clean solution for the seafood industry. This study reports the immobilization of semi-purified acidic proteases from Monterey sardine stomachs onto chitin and chitosan materials extracted from shrimp head waste. Several supports (chitosan beads, chitosan flakes, and partially deacetylated flakes) were activated either with genipin or Na-tripolyphosphate and evaluated as a mean to immobilize acidic proteases. The protein load varied within the 67–91 % range on different supports. The immobilization systems based on chitosan beads achieved the highest protein loads but showed the lowest retained catalytic activities. The best catalytic behavior was obtained using partially deacetylated chitin flakes activated either with genipin or Na-tripolyphosphate. According to results, the immobilization matrix structure, as well as acetylation degree of chitin–chitosan used, has considerable influence on the catalytic behavior of immobilized proteases. Partially deacetylated chitin flakes represent a suitable option as support for enzyme immobilization because its preparation requires fewer steps than other supports. Two abundant seafood by-products were used to obtain a catalytic system with enough proteolytic activity to be considered for biotechnological applications in diverse fields.

Keywords Chitin · Chitosan · Acidic proteases · Fisheries by-products · Enzyme immobilization

J. A. Salazar-Leyva · J. Lizardi-Mendoza · J. C. Ramirez-Suarez · E. M. Valenzuela-Soto ·
R. Pacheco-Aguilar (✉)
Centro de Investigacion en Alimentacion y Desarrollo, A.C. Carretera a la Victoria,
83304 Hermosillo, Sonora, Mexico
e-mail: rpacheco@ciad.mx

J. M. Ezquerria-Brauer · F. J. Castillo-Yañez
Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora,
Rosales y Niños Héroe S/N, Hermosillo, Sonora, Mexico

Introduction

The efficiency of biocatalytic processes can be improved by the immobilization of enzymes on solid supports [1]. Under this condition, immobilized enzymes show major advantages than their free forms because immobilization offers the possibility of having a continuous process, rapid termination of reactions, controlled product formation, repeated use of the biocatalyst, and adaptability to various engineering designs [2].

Proteases constitute one of the most important groups of industrial enzymes and account for at least 60 % of all global enzyme sales. Although microbial proteases dominate the enzyme market worldwide, alternative sources have been investigated and evaluated. Accordingly, acidic and alkaline proteases have been extracted from viscera of different fish species, an important fishery by-product that is usually discharged [3, 4]. Acidic proteases isolated from Monterey sardine viscera showed high activity at low pH and temperatures, characteristics that suggest that could be an adequate biotechnological tool for several industrial applications [5].

On the other hand, chitin and its deacetylated derivative, chitosan, are natural aminated polysaccharides. Waste derived from shrimp, prawn, crab, lobster, and crayfish processing is generally used as raw material for commercial production of these biopolymers [6]. Multiple hydroxyl and amine moieties in chitin and chitosan provide the required binding sites to anchor proteins allowing their use as support matrix for enzyme immobilization [7]. Thus, chitin- and chitosan-based materials in form of powders, flakes, or gels of different geometrical configurations have been used as enzyme immobilization supports [8].

One common approach for enzyme immobilization on chitin- and chitosan-based materials is the covalent cross-linking of amine groups present in both support and enzymes. A commonly used cross-linker is glutaraldehyde (GA); however, GA is a noxious substance that could damage the active site of enzymes and possesses several safety concerns for its use in food, cosmetic, biomedical, and environmental applications. Hence, alternative nontoxic support-activating reagents are currently applied. In this respect, the natural compound genipin has been used to covalently immobilize microbial lipases onto different supports such as chitosan beads and mesoporous resins [9, 10]. Also, sodium tripolyphosphate (STPP), a substance with “generally recognized as safe” status, has been used as chitosan cross-linker through ionic interactions between its negatively charged phosphate groups with the $-NH^+$ present in chitosan under acidic conditions [11].

Seafood processing wastes constitutes a serious environmental problem and imposes a cost to dispose them in absence of value-added solutions [12]. Although a large volume of solid waste is currently processed into fish meal, fish protein hydrolysates, and fertilizers, only a small percentage is processed into higher value-added items such as seafood flavorants, colorants, chitosan, and enzymes [13]. Therefore, an important waste reduction strategy for the seafood industry could be the recovery of marketable by-products from all forms of fish discards [14].

Consequently, the aim of the present study was to design a by-product catalytic system based on the recovery of valuable biochemical/chemical components (chitin, chitosan, and acidic proteases) from currently waste materials of the Mexican fishery industry. The extracted proteases were immobilized in different chitin–chitosan-based supports (chitosan beads, chitosan flakes, and partially deacetylated chitin flakes). Subsequently, the effect of genipin and STPP, two safe linkers and activation reagents, was evaluated over protein loading capacities and retained catalytic activity on the supports.

Materials and Methods

Reagents

Hemoglobin, pepstatin A, soybean trypsin inhibitor (SBTI), EDTA, glycine, trichloroacetic acid, sodium tripolyphosphate, genipin, ammonium sulfate, sodium hydroxide, and sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) markers for molecular weights 14.4–97.4 kDa were purchased to Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA). SDS, acrylamide, ammonium persulfate, tetramethylethylenediamine, and Coomassie Blue are from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Dialysis tubing was from Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, CA, USA).

Raw Materials

Monterey sardine samples were kindly provided by Productos Pesqueros de Guaymas S.A., a fishing company located in Guaymas, Sonora, Mexico. Sardines were transported in ice to the laboratory within 18 h of capture and immediately eviscerated. The collected viscera were frozen at -80°C until use. Shrimp heads (*Penaeus* spp.) were obtained from Empromar, S.A., a shrimp processing plant located in Kino Bay, Sonora. Heads were stored at -20°C until use to prevent spoilage.

Isolation and Partial Characterization of Acidic Proteases

Protease Extraction

Semi-purified acidic proteases extract (SAPE) from sardine stomachs was prepared in four steps, consisting of homogenization, ammonium sulfate fractionation (at 20 and 70 %), and dialysis [5].

Acidic Proteolytic Activity

Acidic protease activity was evaluated using 0.5 % hemoglobin substrate dissolved in 0.1 M glycine–HCl buffer, pH 3. The reaction mixture was incubated for 20 min at 25°C and the reaction stopped by adding 20 % trichloroacetic acid solution. Mixture was chilled (4°C for 20 min) and then centrifuged at $20,000\times g$ for 30 min for further reading of absorbance of soluble peptides at 280 nm. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme catalyzing the formation of 1 μg of tyrosine from hemoglobin per minute under assay conditions. The number of units of activity per milligram of protein was taken as the specific activity of the acidic proteases [15].

Optimum pH

The effect of pH on SAPE activity was evaluated using a universal buffer (from pH 1.5 to 7.0 at 25°C for 20 min) using hemoglobin (0.5 %) as substrate [16].

Effect of Inhibitors

In order to elucidate the type of protease activity presented on the SAPE, it was incubated with different specific protease inhibitors such as the aspartic protease inhibitor (pepstatin A), serine–protease inhibitor (SBTI), and metalloprotease deactivator (EDTA) at concentrations of 1.5 mM,

5 μM , and 1 mM, respectively. A mixture of 10 μL inhibitor solution and 10 μL enzyme extract was incubated for 60 min at 25 $^{\circ}\text{C}$, and then 1,000 μL of 0.5 % hemoglobin was added and residual activity was measured. Appropriate blanks and inhibitor solvents were used as controls. Percentage activity in inhibition assays was reported, using the activity in the absence of the inhibitor as 100 % [17].

Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

To study the presence of acidic enzymes on SAPE, 12 % polyacrylamide gels electrophoresis, under denaturing and non-reducing conditions, were used [18]. Electrophoresis assays were carried out at pH 8.3 and a constant voltage of 120 V. Proteins bands were stained with 0.1 % Coomassie Brilliant Blue R250 and destained with 10 % acetic acid. The separated protein bands were identified by comparison with those from low-range standard molecular weight marker.

Extraction and Characterization of Chitin- and Chitosan-Based Materials

Chitin was extracted from minced shrimp head waste by chemical procedures, using 1 M hydrochloric acid and 3.75 M sodium hydroxide solutions, for demineralization and protein removal, respectively. Chitin was converted to chitosan by an alkaline deacetylation process, mixing chitin samples with 12.5 M sodium hydroxide solution. This reaction was carried out at 100 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h. Then, remaining solid (chitosan) was removed, cooled, and washed with water until its pH was neutral [19]. Partially deacetylated chitin was obtained by the same procedure for chitosan production, but the deacetylation reaction was conducted at 70 $^{\circ}\text{C}$. The degree of acetylation (DA) of chitin, partially deacetylated chitin, and chitosan were estimated from their Fourier transformed infrared spectra [20].

Immobilization Supports Preparation

Chitosan Beads

Spherical chitosan beads (CHSB) were formed extruding a 2 % chitosan solution (in 3 % acetic acid) through a needle over a stirred bath for coagulating purposes, containing 1 N NaOH with 26 % (v/v) ethanol. The obtained beads, with a diameter of nearly 3.0 mm and uniform shape, were removed from the bath after 3 h, rinsed thoroughly with distilled water to neutrality, and stored in water at 4 $^{\circ}\text{C}$ until use [6].

Chitosan and Partially Deacetylated Chitin Flakes

Uniform size particles were obtained sieving the chitosan and partially deacetylated chitin flakes (CHSF and PDCHNF, respectively) through a 2-mm mesh. Before the immobilization procedure, an appropriate amount of support (CHSF or PDCHNF) was equilibrated in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) for 20 min at 25 $^{\circ}\text{C}$ [7].

Immobilization of Acidic Proteases

The different supports (CHSB, CHSF, and PDCHNF) were activated with the corresponding solution (0.2 % genipin or 1 % STPP) by stirring at 150 rpm and 30 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h. Then, active supports were washed thoroughly with water and put in contact with a convenient amount of

SAPE (enzyme load of 0.05 mg/mL) at 4 °C for 2 h while stirring at 100 rpm. Finally, after washing thoroughly with distilled water (washing solution), the immobilized proteases were stored in distilled water at 4 °C for later analysis [11].

Protein Adsorption and Protein Loading Measurements

The supernatant (solution left after immobilization procedure) and washing solutions were collected to determine the amount of protein by the Bradford assay [21]. The amount of adsorbed protease was calculated from the difference in the initial amount of protein in SAPE and the total amount of protein in the washing and supernatant solutions after immobilization. Protein adsorption (PA) was determined by the following equation:

$$PA(\%) = \frac{P_i - P_u}{P_i} \times 100 \quad (1)$$

where P_i denotes the initial amount of protein in protease solution before immobilization (in milligram), and P_u is the total amount of protein in the supernatant and washing solutions (in milligram), denoted as unbound protease [10].

To determine the amount of protein loading (PL) on the supports, the following equation was applied [22]:

$$PL(\%) = \frac{P_i - P_u}{D_w} \quad (2)$$

where D_w denotes the dry weight (in gram) of the immobilization support. P_i and P_u were defined in Eq. (1).

Acidic Proteolytic Activity of Immobilized Enzymes

A similar procedure as the described on section “Acidic Proteolytic Activity” was used to determine the protease activity on immobilization supports, following the appropriate recommendations for determining proteolytic activity in immobilized enzymes [23]. Briefly, 0.5 % hemoglobin solution was added to 0.01 g of support containing the immobilized proteases. The mixture was incubated under stirring (75 rpm) at same conditions used for free protease analysis. The immobilized enzyme activity (IEA) that represents the enzyme units per gram of support was calculated by Eq. (3):

$$IEA = \frac{SA_i}{PL} \quad (3)$$

where SA_i is the specific activity of immobilized enzymes (in units per milligram) and PL was defined in Eq. (2). The retained activity (RA) of immobilized enzymes was then calculated and compared to the specific activity of free proteases (SA_f) according to the following relation:

$$RA(\%) = \frac{SA_i}{SA_f} \times 100 \quad (4)$$

Experimental Design and Statistical Analyses

A factorial categorical design was applied to study the influence of two factors (immobilization support and activating solution) over the evaluated responses: PA, PL, IEA, and RA. Statistical analyses were carried out using NCSS 2007 software (Kaysville, Utah, USA).

Significant differences of means were established at $P < 0.05$ using the Tukey–Kramer multiple comparison test.

Results and Discussions

Isolation and Partial Characterization of Sardine Acidic Proteases

Isolation of acidic proteases is summarized in Table 1. After dialysis step, the extract was purified 33.1-fold, thus exhibiting acidic proteases enrichment. The SDS-PAGE analysis of SAPE showed several protein bands in the extract obtained from Monterey sardine stomachs (Fig. 1). The band with an approximate MW of 30 kDa could be related to the presence of pepsin II, as previously reported for this fish species [5].

Enzyme activity of SAPE showed its highest activity at pH 2 (Fig. 2). However, it still retained more than 80 % of activity at higher (pH 3) and lower (pH 1.5) pH levels. Enzyme activity declined strongly towards neutral pH levels, indicating the acidic nature of the extracted proteases. The optimum pH for fish acidic proteases generally falls in the range from 2 to 4, with pepsin I having optimal pH between 3 and 4, and pepsin II between 2 and 3 [24].

According to Fig. 3, the inhibition of acidic proteolytic activity in the SAPE by pepstatin A confirms the presence of acidic proteases on it. On the contrary, SBTI and EDTA did not inhibit sardine acidic enzymes, since activity inhibition lower than 10 % is considered negligible [25].

Degree of Acetylation of Chitin- and Chitosan-based Materials

The DA of the extracted chitin and chitosan samples were 81.6 and 11.6 %, respectively. In addition, using a mild temperature deacetylation reaction, a material with an average DA (48.1 %) called partially deacetylated chitin was obtained.

Effects of Immobilization Procedures on Sardine Protease Extract

Table 2 shows the performed immobilization procedures as well as the experimental results of PA, PL, IEA, and RA. According to ANOVA, immobilization support and activating solution factors had a significant effect ($P < 0.05$) on all the responses. Moreover, a significant ($P < 0.05$) interaction effect between these two factors was observed for all the evaluated responses, indicating an interdependent complementary effect of the immobilization support (shape and DA) with the chemical nature of the activating solution.

Table 1 Isolation of acidic proteases from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) stomachs

Isolation step	Total protein (mg)	Total activity (U) ^a	Specific activity (U/mg)	Increase in purity
Crude extract	1,341.9	1,128.8	0.8	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ 20 %	1,235.8	1,215.4	0.9	1.2
(NH ₄) ₂ SO ₄ 70 %	965.8	1,541.1	1.5	1.9
Dialyzed extract	49.7	1,385.7	27.8	33.1

^a U=1 μg of tyrosine equivalent released from hemoglobin per min

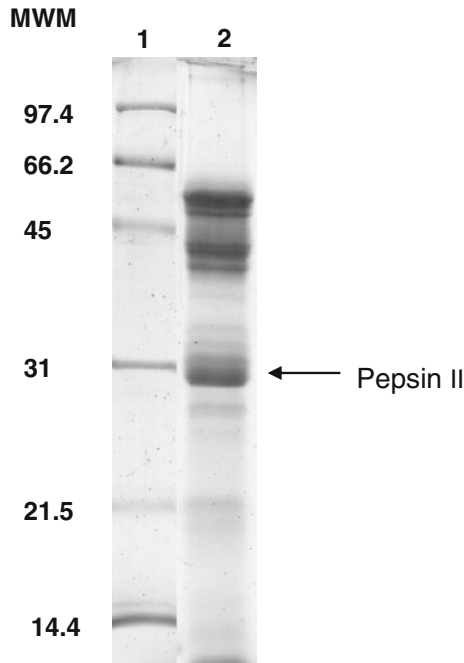


Fig. 1 Enzyme extract SDS-PAGE. *Line 1*, molecular weight markers (MWM). *Line 2*, semi-purified acidic proteases extract from sardine Monterey stomachs

Protein Adsorption on Supports

Regarding PA, all trials showed values greater than 65 %. A maximum of 90.81 % for CHSF and 89.20 % for PDCHNF immobilization supports activated with 0.2 % genipin (covalent immobilization) were observed ($P \geq 0.05$) (Table 2).

According to literature, the capabilities to adsorb protein by the different supports used in the present study were acceptable. A previous study reported that chitosan beads cross-linked with GA adsorbed 72 % of accessible protease [26]. Meanwhile, when papain was coupled to chitosan hydrogels activated with GA, only 15.3 % of enzyme adsorption was obtained [27]. Other studies reported lower values of protein adsorption (35 %) when a lipase from *Candida rugosa* was immobilized on chitosan beads activated with 0.3 % (p/v)

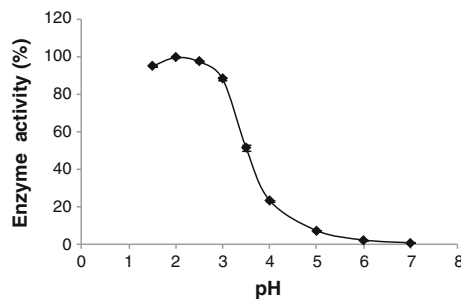


Fig. 2 Effect of pH on enzyme activity of the semi-purified acidic proteases extract from Monterey sardine (*S. sagax caerulea*)

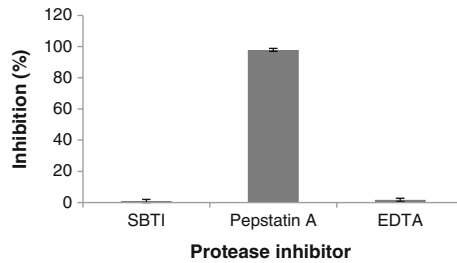


Fig. 3 Effects of specific inhibitors on the activity of proteases from sardine Monterey stomachs extract

genipin [9]. Our results suggest the importance of the shape of support (beads or flakes) on the immobilization of proteases when genipin is used as a cross-linker.

Protein Loading Capacity of Supports

Concerning PL capacity of the different supports, CHSB showed the highest ($P<0.05$) capacity (Table 2). The differences in PL capabilities might be due to the different contact area showed by the supports, with beads showing a higher area than flakes (7.1 vs. 4 mm², respectively). Thus, beads polymeric matrix offers higher binding sites for the covalent and ionic immobilization of sardine proteases. On the other hand, partial deacetylation of chitin flakes did not have an effect ($P\geq 0.05$) on PL capacity (Table 2). Both the maximum PA and PL capabilities were obtained when the supports were activated with 0.2 % genipin (Table 2), showing its effectiveness as a protein cross-linker.

Catalytic Activity of Immobilized Proteases

IEA and RA on CHSB supports were significantly ($P<0.05$) lower than the rest of supports (Table 2), despite the acceptable protein adsorption values obtained in these immobilization procedures. This behavior could be related to the chitosan beads hydrogel high capacity for loading sardine proteases crowding the inside of its porous matrix, thus blocking or inhibiting

Table 2 Different immobilization procedures and their effect on the evaluated responses: protein adsorption (PA), protein loading (PL), immobilized enzyme activity (IEA), and retained activity on the support (RA)

Immobilization support	Activating solution	PA (%) ^a	PL (mg/g) ^a	IEA (U/g) ^a	RA (%) ^a
CHSB	Genipin 0.2 %	72.05±0.3ab	159.2±2.5d	0.3±0.03a	6.5±0.18a
CHSB	STPP 1 %	67.6±1.2a	142.1±2.6c	0.2±0.1a	3.9±0.08a
CHSF	Genipin 0.2 %	90.8±1.4c	88.5±0.8b	3.04±0.18b	35.2±1.8c
CHSF	STPP 1 %	74.7±1.5ab	36.1±2.1a	5.6±0.26c	20.2±0.19b
PDCHNF	Genipin 0.2 %	89.2±1.5c	89.6±1.1b	3.4±0.03b	43.1±0.18d
PDCHNF	STPP 1 %	78.2±0.7b	35.5±0.7a	14.2±0.8d	56.0±4.1f

Significant differences ($P<0.05$) are represented by different letters for each column

CHSB chitosan beads, CHSF chitosan flakes, PDCHNF partially deacetylated chitin flakes, STPP sodium tripolyphosphate

^a Values are means±standard deviation of three replicates

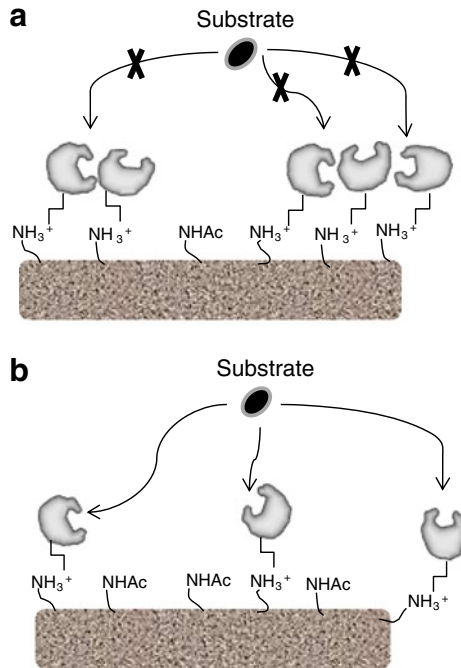


Fig. 4 Suggested effect of the degree of acetylation (DA) of biopolymers used as support material on sardine protease immobilization. **a** Chitosan support, DA=11.66 %. **b** Partially deacetylated chitin support, DA = 48.18 % represent the molecule from the corresponding support-activating solution (genipin or STPP)

the substrate access. Besides some studies where chitosan was used as a support material, it is suggested that a high amount of immobilized enzyme can contribute to its saturation, affecting its catalytic behavior by the limitation of substrate diffusion [28, 29].

Although CHSB and CHSF are composed of the same biopolymer (chitosan), higher values of IEA and RA ($P < 0.05$) were obtained with CHSF support (Table 2), suggesting the importance of the matrix shape over the catalytic behavior of immobilized enzymes. An explanation of this behavior can be as follows: due to the fact that chitosan beads are obtained by solubilization of the biopolymer in an acidic aqueous solution with a subsequent precipitation in a sodium hydroxide coagulant bath, the hydrogel formed undergoes a macromolecular network swollen by the solutions. In these beads, although having great capacity to immobilize enzymes, their activity is reduced possibly due to this swollen effect that do not allow the substrate to reach the enzyme catalytic site. On the other hand, CHSF, having a discrete capacity to immobilized enzymes, are obtained by a direct and simple procedure of equilibration with phosphate buffer, preserving its xerogel structure (with a limited swelling capacity), leaving the enzymes exposed for reaction with their substrate. This low enzyme binding capacity shown by CHSF led to better substrate diffusion, hence to a higher IEA and RA values than the observed for CHSB support (Table 2).

The immobilization of SAPE on PDCHNF, regardless of the activating solution (genipin or STPP), showed higher ($P < 0.05$) RA values (Table 2) than other supports, being 1 % STPP the highest ($P < 0.05$) of all. Remarkably, it was observed that the highest IEA value ($P < 0.05$) obtained by PDCHNF + STPP shows its great potential as an enzyme immobilization system. For instance, with 1 g of PDCHNF support activated with STPP, it is possible to

obtain approximately 71.2- and 2.5-folds in IEA values as compared with that of CHSB and CHSF supports activated with the same reagent, respectively.

Table 2 shows that RA was most affected by the degree of acetylation, as CHSF being less acetylated (11.66 % acetylation) showed lower ($P<0.05$) values than PDCHNF (48.18 % acetylation). According to the results, the behavior of the different immobilization systems could be explained as follows: In one end, the chitosan supports displays many more free amino groups (due to its higher deacetylation degree) that could react with the cross-linking agent and therefore hold more enzyme molecules. However, this may cause that the CHSF surface becomes overcrowded by the enzyme creating a steric hindrance effect that prevents the active sites of the acidic proteases from becoming available for the substrate. Furthermore, the higher protein load could also hinder the substrate diffusion resulting in lower retained activity in this support (Fig. 4a). The opposite happens with PDCHNF due to the less reactive groups available for the cross-linking agents (Fig. 4b).

Although chitin and chitosan DA is one of the most important parameters that influence the properties and effectiveness of this kind of biopolymers in various applications [30], studies related with the effect of DA of chitin and chitosan materials on the catalytic behavior of immobilized enzymes are surprisingly limited in literature.

Conclusions

Semi-purified acidic proteases from Monterey sardine stomachs were immobilized on diverse materials made of chitin or chitosan extracted from shrimp head waste. The catalytic activity of the enzymes was highly influenced by the polymeric matrix used for their immobilization. Under the experimental conditions, chitosan beads appear to be the less suitable support for sardine acidic protease immobilization, while enzymes immobilized onto partially deacetylated chitin flakes retained considerable catalytic activity, using both covalent (genipin) and ionic (STPP) immobilization. In this regard, partially deacetylated chitin represents a more appropriate option as support for enzyme immobilization because its preparation requires fewer steps. Its lack of solubility in aqueous solvents, including acidic pH, and the use of harmless support-activating solutions such as those with STPP make it suitable for various biotechnological applications, mainly for the food industry.

Further research is under way to optimize the immobilization conditions of acidic sardine proteases and evaluate if this “by-product catalytic system” may contribute to the development of a sustainable biotechnological aid.

Acknowledgments The authors wish to thank Karla Martinez Robinson for her technical assistance. Jesus Aaron Salazar-Leyva was on a graduate leave supported by both the Universidad Politecnica de Sinaloa and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia of Mexico.

References

1. Brady, D., & Jordaan, J. (2009). *Biotechnology Letters*, 31, 1639–1650.
2. Altun, G. D., & Cetinus, S. A. (2007). *Food Chemistry*, 100, 964–971.
3. Phanturat, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Roytrakul, S. (2010). *LWT- Food Science and Technology*, 43, 86–97.
4. Khaled, H. B., Ghorbel-Bellaaj, O., Hmidet, N., Jellouli, K., Ali, N. E. H., Ghorbel, S., et al. (2011). *Food Chemistry*, 128, 847–853.

5. Castillo-Yañez, F. J., Pacheco-Aguilar, R., Garcia-Carreño, F. L., & Del-Toro, M. A. (2004). *Food Chemistry*, 85, 343–350.
6. Singh, A. N., Suthar, N., SINGH, S., & Dubey, V. K. (2011). *Journal Agriculture Food and Chemistry*, 59, 6256–6262.
7. Kılınc, D. A., Teke, M., Önal, S., & Telefoncu, A. (2006). *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 36, 153–163.
8. Krajewska, B. (2004). *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 126–139.
9. Chiou, S. H., Hung, T. C., Giridhar, R., & Wu, W. T. (2007). *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 37, 265–275.
10. Wang, W., Jiang, Y., Zhou, L., & Gao, J. (2011). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164, 561–572.
11. Sangeetha, K., & Emilia, A. T. (2008). *Journal of Applied Polymer Science*, 107, 2899–2908.
12. He, S., Franco, C., & Zhang, W. (2013). *Food Research International*, 50, 289–297.
13. Morrissey, M. (2001) Book of abstracts, 2001 IFT Annual Meeting. New Orleans, USA
14. Arvanitoyannis, I. S., & Kassaveti, A. (2007). *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 726–745.
15. Diaz-Lopez, M., Moyano-Lopez, F. J., Alarcon-Lopez, F. J., Garcia-Carreño, F. L., & NavarretedelToro, M. (1998). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 121, 369–377.
16. Stauffer, C. (1989). *Enzyme assays for food scientists*. New York: Van Nostrand Reinhold.
17. García Carreño, F. L., & Haard, N. F. (1993). *Journal of Food Biochemistry*, 17, 97–113.
18. Laemmli, U. K. (1970). *Nature*, 227, 680–685.
19. Beaney, P., Lizardi Mendoza, J., & Healy, M. (2005). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 145–150.
20. Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F., Argüelles-Monal, W., Desbrieres, J., & Rinaudo, M. (2001). *Polymer*, 42, 3569–3580.
21. Bradford, M. (1976). *Analytical Biochemistry*, 72, 248–25.
22. Novick, S. J., & Rozzell, J. D. (2005). Immobilization of enzymes by covalent attachment. In J. L. Barredo (Ed.), *Microbial enzymes and biotransformations* (pp. 247–272). Totowa: Humana.
23. Magnin, D., Dumitriu, S., & Chornet, E. (2003). *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 18, 355–373.
24. Gildberg, A. (1988). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 91, 425–435.
25. Villalba-Villalba, A. G., Pacheco-Aguilar, R., Ramirez-Suarez, J. C., Valenzuela-Soto, E. M., Castillo-Yañez, F. J., & Márquez-Ríos, E. (2011). *Fisheries Science*, 77, 1–9.
26. Benkhelifa, H., Bengoa, C., Larre, C., Guibal, E., Popineau, Y., & Legrand, J. (2005). *Process Biochemistry*, 40, 461–467.
27. Kılinc, A., Onal, S., & Telefoncu, A. (2002). *Turkish Journal of Chemistry*, 26, 311–316.
28. Jiang, D. S., Long, S. Y., Huang, J., Xiao, H. Y., & Zhou, J. Y. (2005). *Biochemical Engineering Journal*, 25, 15–23.
29. Dhananjay, S., & Mulimani, V. (2008). *Journal of Food Biochemistry*, 32, 521–535.
30. Kasaai, M. R. (2010). *Carbohydrate Polymers*, 79, 801–810.

CAPÍTULO III

Optimal immobilization of acidic proteases from Monterey sardine (*Sardinops sagax caeurelea*) on partially deacetylated chitin from shrimp head waste

Manuscrito preparado para su envío a la revista Journal of Aquatic and Food Product Technology

Optimal immobilization of acidic proteases from Monterey sardine (*Sardinops sagax caeurelea*) on partially deacetylated chitin from shrimp head waste

Running head: Optimization immobilization yield sardine proteases

Jesus Aaron Salazar-Leyva^a, Jaime Lizardi-Mendoza^a, Juan Carlos Ramirez-Suarez^a,
Elisa Miriam Valenzuela-Soto^a, Josafat Marina Ezquerro-Brauer^b, Francisco Javier
Castillo-Yañez^b, and Ramon Pacheco-Aguilar^{a*}

^a Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Carretera a la Victoria,
C.P. 83304. Hermosillo, Sonora, México.

^b Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora.
Rosales y Niños Héroe S/N. Hermosillo, Sonora, México.

*Corresponding author: Ramon Pacheco-Aguilar

Tel./Fax: +52-662-280-04-21.

E-mail address: rpacheco@ciad.mx

Abstract

Response surface methodology was employed to optimize the immobilization yield of acidic proteases from Monterey sardine (*Sardinops sagax caeurelea*) using partially deacetylated chitin as immobilization support. A rotatable central composite design was applied to evaluate the effects of immobilization conditions such as enzyme loading (X_1), immobilization pH (X_2) and tripolyphosphate concentration (X_3) on the immobilization yield. The analysis of variance revealed that the established model was significant ($P < 0.05$) and the adjustment of the quadratic model with the experimental data was satisfactory. Under optimal conditions ($X_1 = 0.05$ mg/mL, $X_2 = 3.16$ and $X_3 = 0.75\%$) an immobilization yield of 79.1% was achieved, value that was in agreement with the predicted one.

Keywords: Response surface methodology, acidic proteases, immobilization, chitin

Introduction

Considering all kind of food, fish is the major source of by-products and waste when it is processed for human consumption (Ferraro et al., 2013). As an example, solid wastes generated by the seafood processing industry can account for a very large fraction of the total waste for some species with solids comprising in the range of 30 to 60% of the total waste from filleting plants and about 60% from crustacean processing (Mazik and Burdon, 2005). Besides, there is a general concern related with the ecological problem that seafood wastes represent due to their improper management (Safari et al., 2011). In this regard, every year about 18 to 30 million tons of these wastes are dumped around the world, constituting a serious environmental pollutant (Elvevoll, 2004; Arvanitoyannis and Kassaveti, 2008).

In spite of the above exposed, by-products and wastes generated from the seafood industry are considered as a source of highly valuable compounds, in some cases even higher in value than the starting material (Dumay et al., 2006). Two common examples of these valuable biomolecules are proteolytic enzymes recovered from fish viscera and polysaccharides like chitin, extracted mainly from crab and shrimp shells. In this regard, many researchers have demonstrated that acidic and alkaline fish digestive proteases can be applied as biotechnological aids in various emerging processes (Sila et al., 2012). Also chitin and its derivative chitosan, due to their unique physicochemical and functional properties, have been used in diverse fields, like biomedicine, pharmaceutical food, agriculture, environmental and cosmetics, among others (Tharanathan and Kittur, 2003; Bautista-Baños et al., 2006; Jayakumar et al., 2011). In addition one interesting application of chitin and chitosan based materials, is their utilization as support for

enzyme immobilization (Krajewska, 2004). In this regard the efficiency of biocatalytic processes can be improved by the immobilization of enzymes on solid supports (Brady and Jordaan, 2009) Under this condition, immobilized enzymes show major advantages than their free forms because immobilization offers the possibility of having a continuous process, rapid termination of reactions, controlled product formation, repeated use of the biocatalyst, and adaptability to various engineering designs (Altun and Cetinus, 2007). Therefore, recently an important number of research studies are currently focused on the improvement of the stability of fish enzymes via immobilization procedures, with the aim to create more competitive processes, and enhance the possibility of application of these valuable biocatalysts. For instance lipase from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and grey mullet (*Mugil cephalus*) viscera were immobilized on octyl sepharose, a hydrophobic support (Kurtovic et al., 2011; Aryee and Simpson, 2012). Concerning proteases, trypsin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and cunner fish (*Taufogolabrus adspersus*) viscera have been immobilized on ferromagnetic Dacron® and controlled pore glass respectively (Amaral et al., 2006; Li et al., 2013).

Earlier results in our laboratory, indicates that partially deacetylated chitin represent a suitable option as support for enzyme immobilization, because this biopolymer influence the catalytic properties of the immobilized enzymes in a positive way, an also the preparation of this support requires fewer steps than others immobilization matrixes (Salazar-Leyva et al., 2013).

Hence the aim of the present study was to exploit seafood waste materials as a means to prepare a by-product catalytic system based on the immobilization of Monterey

sardine acidic proteases onto partially deacetylated chitin extracted from shrimp head waste. Subsequently, the immobilization conditions of these proteases were optimized by response surface methodology (RSM).

Materials and Methods

Reagents

Hemoglobin, glycine, trichloroacetic acid (TCA), sodium tripolyphosphate (STPP), ammonium sulphate, sodium hydroxide and hydrochloric acid were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA). Dialysis tubing was from Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, CA, USA). Bradford reagent was purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA).

Raw materials

Monterey sardine samples (*Sardinops sagax caerulea*) were kindly provided by Productos Pesqueros de Guaymas S.A., a fishing company located in Guaymas, Sonora, Mexico. Sardines were transported in ice to the laboratory within 18 h of capture and immediately eviscerated. The collected viscera were frozen at -80°C until use. Shrimp heads (*Penaeus spp*) were obtained from Empromar, S.A., a shrimp processing plant located in Kino Bay, Sonora. Heads were stored at -20°C until use to prevent spoilage.

Isolation of acidic proteases from Monterey sardine stomachs

Semi-purified acidic proteases extract from sardine stomachs was prepared in four steps with slight modifications of the method proposed by Castillo-Yañez et al., (2004). Sardine stomachs were homogenized with ice-cold distilled water. The homogenate was

centrifuged at $26,000 \times g$ for 20 min at 4°C and the supernatant was fractionated, using 20-70% ammonium sulfate, followed by centrifugation at $20,000 \times g$ 30 min at 4°C . The enzyme preparations so obtained were dialyzed against 0.01 M glycine-HCl buffer pH 3. After dialysis for 24 h and four changes of the same buffer, the sample was adjusted to pH 3.0 by addition of 0.1 M HCl, and centrifuged at $20,000 \times g$ for 20 min at 4°C . The supernatant was considered the semi-purified extract of acidic proteases.

Extraction of partially deacetylated chitin from shrimp head waste

Chitin was extracted from minced shrimp head waste by chemical procedures, using 1 M hydrochloric acid and 3.75 M sodium hydroxide solutions, for demineralization and protein removal, respectively. Chitin was converted to partially deacetylated chitin by an alkaline deacetylation process, mixing chitin samples with 12.5 M sodium hydroxide solution. This reaction was carried out at 70°C for 2 h. Then, remaining solid (partially deacetylated chitin) was removed, cooled and washed with water until its pH was neutral (Beaney et al., 2005). The proximal composition of shrimp head waste and the extracted chitin, was determined according to the Official analytical methods of AOAC (Helrich, 1990). From proximal composition, the chitin and protein content of the mentioned samples was calculated using the equations proposed by Díaz-Rojas et al., (2006). The degree of acetylation (DA) of the obtained biopolymers was estimated from their Fourier transformed infrared (FTIR) spectra (Brugnerotto et al., 2001).

Support preparation and protease immobilization process

Uniform size particles of partially deacetylated chitin flakes (PDCHNF) were obtained sieving the flakes through a 2mm mesh. Before the immobilization procedure,

an appropriate amount of support was equilibrated in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) for 20 min at 25°C (Kılınç et al., 2006). Later, PDCHNF were activated with the corresponding concentration of STPP by stirring at 150 rpm and 30 °C for 1h. Then, active supports were washed thoroughly with water and put in contact with the corresponding amount of sardine acidic proteases at 4°C for 2 h while stirring at 100 rpm (Sangeetha and Abraham, 2008).

Acidic proteolytic activity

Acidic protease activity was evaluated using 0.5% hemoglobin substrate dissolved in 0.1 M glycine-HCl buffer, pH 3. The reaction mixture was incubated for 20 min at 25°C and the reaction stopped by adding 20% trichloroacetic acid solution. Mixture was chilled (4°C for 20 min) and then centrifuged at 20,000 × g for 30 min for further reading of absorbance of soluble peptides at 280 nm. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme catalyzing the formation of 1 µg of tyrosine from hemoglobin per minute under assay conditions. (Díaz-López et al., 1998).

Immobilization yield

The immobilization yield (IY) was calculated using the following equation:

$$IY (\%) = \frac{U_i}{U_s} \times 100 \quad (1)$$

where U_i represent the total activity of immobilized proteases and was determined by subtracting total activity of unbound protease (measured in the supernatant) from total activity of soluble enzyme (U_s) (Singh et al., 2011).

Experimental design and statistical analysis

Experimental design and statistical analyses reported in this study were generated using STATGRAPHICS Centurion XV (StatPointInc., USA). Prior to the optimization study, a preliminary screening was conducted to determine the effect of enzyme loading, immobilization pH and STPP concentration over the variable response immobilization yield (IY). Based on the results of the preliminary screening, a rotatable central composite design (CCD) was applied. The evaluated factors and their coded and uncoded levels are showed in Table 1. Response Surface Methodology (RSM) was used to investigate the optimum levels of the factors and their relationships. A total of 17 experimental runs consisting of 8 factorial points, 3 central points and 6 axial points were performed in a totally random order, and the experimental data was analyzed by means of a second order model:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

where Y is the variable response (immobilization yield), β_0 , β_i , β_{ij} , are regression coefficients for intercept, linear, quadratic and interaction coefficients respectively and X_i and X_j represents the uncoded independent variables.

Results and Discussion

Isolation of sardine Monterey acidic proteases

A semi-purified acidic protease extract was obtained by mean of a simple procedure consisting of four steps. The specific activity of the dialyzed extract was 33.1 higher than the crude extract indicating an enrichment of acidic proteases due to the applied isolation process (Table 2). Previous results of partial characterization of this semi-

purified enzyme extract (inhibition studies, pH optima and SDS-PAGE analysis) suggest that the higher acidic activities found, could be related with the presence of pepsin II, as previously reported for this fish species (Castillo-Yañez et al., 2004; Salazar-Leyva et al.; 2013).

Chemical composition and partial deacetylation of chitin

Table 3 shows that ash and protein content in shrimp head waste decreased drastically due to the acid demineralization and the alkaline removal of proteins respectively. Besides, a decrease in lipids was also observed in the obtained chitin. Díaz-Rojas et al., (2006) reported similar results of lipid content decrease on chitin when it was extracted from shrimp head waste. According to these authors such lipid reduction is related with their removal during the demineralization process.

The acetyl groups of the obtained chitin (DA = 81.6%) were removed by means of a mild temperature deacetylation process, resulting in a material (called partially deacetylated chitin) with a DA of 48.1%.

Preliminary screening of immobilization conditions

The effects of various conditions (enzyme loading, immobilization pH and STPP concentration) over immobilization yield (IY) were investigated. From Figure 1a is possible to observe that at low values of enzyme loading (0.03 and 0.06 mg/mL), high IY values were achieved. Otherwise, above 0.06 mg/mL of enzyme loading IY, decreased in great proportion. This behavior has been reported by several researches that immobilized enzymes covalently onto chitosan beads (Tripathi et al., 2007; Kumar et al., 2009; Kumari and Kayastha, 2011; Singh et al., 2011). These authors suggest that high enzyme loading onto chitosan beads (cross-linked with glutaraldehyde) saturates

the system and enzyme molecules overlap in the space, thus affecting the active site of the enzyme and therefore its activity.

Regarding immobilization pH, it is observed a strong influence of this factor over IY. According to Figure 1b, the highest IY value was achieved at value of pH 3. This result could be related with the optimal electrostatic interactions experimented between the surface of the PDCHNF support activated with STPP and the immobilized proteases. At this pH value (3) at least two PO^{-4} groups of STPP would be negatively charged, whereas the amine groups of both, the support and polar aminoacids of protein surface would carry positive charge. Also, it is observed (Figure 1b) that when acidic proteases were immobilized at pH 2, the IY diminished dramatically. This behavior is surprisingly due to the acidic nature of sardine acidic proteases, but may be related with the higher enzyme activity detected in the supernatants at this pH of immobilization. In this sense this result indicates that almost all the loaded enzyme was not bounded to the support.

On the other hand, at pH values higher than 3 the IY drop drastically (Figure 1b), which might be related with the low stability of sardine acidic proteases in the pH region of 4 to 6. Also when acidic proteases were immobilized at this pH values, the detected enzyme activity in supernatants were high; therefore such behavior indicates an inefficient bound of proteases to the support.

With regard to the concentration of STPP used to cross-link the PDCHNF support, it is observed a slight decrease of IY while the concentration of STPP was increased (Figure 1c). Many researchers have reported that immobilization yield is diminished when the concentration of cross-linker (i.e. glutaraldehyde) is incremented (Dwevedi and Kayastha, 2009a; Kumar et al., 2009; Romdhane et al., 2011). This effect could be

related with a saturation effect of the support with immobilized enzymes due to the high concentration of cross-linker agent. For instance, in our study whereas STPP concentration is increased, all the accessible binding sites for ionic immobilization in PDCHNF support are being occupied, thus not all of the loaded protein is coupling to the support, giving minor values of IY.

Optimization of immobilization conditions by Response Surface Methodology (RSM)

RSM is a collection of statistical and mathematical techniques useful for developing, improving, and optimizing processes in which a response of interest is influenced by several variables; thus its objective is to optimize this response (Baş and Boyacı, 2007). In this study three independent factors (enzyme loading, X_1 ; immobilization pH, X_2 ; and STPP concentration, X_3) were chosen to optimize the immobilization of sardine acidic proteases on a partially deacetylated chitin support. A set of 17 experimental runs were carried out. The complete design matrix of the central composite design (CCD) with the experimental values of the variable response is presented in Table 4. Among all the combinations tested, experiments 3 and 11 resulted in the minimum and the maximum immobilization yield with 1.2 % and 89.7% respectively. The obtained experimental data by CCD were fitted to a second degree polynomial equation as given by:

$$Y = -864.478 + 957.183 X_1 + 591.177 X_2 + 2.69073 X_3 - 3321.67 X_1^2 - 435.575 X_1 X_2 + 478.287 X_1 X_3 - 90.213 X_2^2 - 21.835 X_3^2$$

(3)

where Y is immobilization yield (variable response) and X_1 , X_2 and X_3 are the coded independent factors.

Table 5 shows a summary of the analysis of variance (ANOVA) applied to the second order model. The P value of the model was less than 0.05, indicating that it is a significant model. Moreover, the lack of fit was non-significant ($P > 0.05$) implying that the model accurately represents the data in the experimental region. Besides the lack of fit test, the coefficient of determination R^2 is a widely accepted parameter for verification of the model adequacy (Baş and Boyacı, 2007). In this regard, the R^2 was calculated as 0.8547 (Table 5) indicating that the statistical model explains 85.47% of the variability in the immobilization yield. When the statistical model has several terms it is very recommendable to calculate the adjusted R^2 (R^2_{adj}), because this adjusted value corrects the R^2 value for the sample size and the numbers of terms of the model (Box et al., 1978). According to Potumarthi et al., (2008) if there are many terms in the model and the sample size is not very large, the calculated R^2_{adj} value may be noticeably smaller than the R^2 . In this context, the obtained R^2_{adj} value from the regression analysis applied to our model was 0.71 (Table 5), a value considered adequate to advocate the significance and prediction capability of the model (Gutiérrez Pulido and de la Vara Salazar, 2004).

Also, from the ANOVA it is possible to establish the significance level of each coefficient of the model and also the interaction between the evaluated factors. In this study the P value of the linear term X_1 (enzyme loading) and the quadratic term X_2^2 (immobilization pH) were significant ($P < 0.05$) (Table 5). The high significance of the X_2 second order model indicates that even small variations in the immobilization pH can

cause significantly alterations on the evaluated response. In agreement with our results Dwevedi & Kayastha (2009b) reported that the “enzyme loading” factor had a significant influence over immobilization yield of β -galactosidase bounded covalently to chitosan beads.

The relationships between the response (immobilization yield) and the independent variables can be better understood by examining the response surface plots generated from the prediction model (Eq. 3). Figure 2a shows the effects of enzyme loading and immobilization pH (and their interaction) on the variable response at STPP concentration of 1%. Immobilization yield (IY) decreased at high enzyme loading, whereas the strong effect of immobilization pH over IY is very clear. Figure 2b shows the influence of enzyme loading and STPP concentration at a fixed pH value of 3. Again, it is evident the significant influence ($P < 0.05$) of enzyme loading on the immobilization yield of acidic proteases since, the partially deacetylated chitin support becomes saturated at high enzyme loading causing the drop of IY. From the economical point of view, this behavior is favorable, because it is possible to achieve the highest value of IY with a minimal amount of protease extract. With regard to STPP concentration, a slight increment on the response was observed with the increment of crosslinker concentration (Figure 2b).

The relationship between immobilization pH and STPP concentration with a fixed value of enzyme loading (0.08 mg/mL) is depicted in Figure 2c. Again, is observed that STPP concentration has no significant influence over IY. On the other hand, it is possible to observe that small variations on immobilization pH cause significantly changes on IY (Figure 2c). This behavior is related with the second order interaction

($X_2 \times X_2$) resulting from the ANOVA. A maximum on IY was observed at immobilization pH value of around 3.

The optimum conditions of the different independent variables (enzyme loading = 0.05 mg/mL, immobilization pH = 3.16 and STPP concentration = 0.75%) were obtained by solving the model equation (Eq. 3), and the maximum predicted IY value was $81.1\% \pm 19.1$. The model was validated with additional experiments under the predicted conditions and the experimental value of IY was $79.2\% \pm 0.5$ (average of duplicate), which was in agreement with the prediction of the model.

Conclusions

The immobilization conditions of sardine Monterey acidic proteases on partially deacetylated chitin were optimized by response surface methodology. The independent factor that has an influence ($P < 0.05$) over the immobilization yield was the enzyme loading (X_1). Interestingly, it is possible to obtain the highest values of immobilization yield with a minimal concentration of protease extract. An immobilization yield of 79.2% was attained when optimum conditions of enzyme loading, immobilization pH and sodium tripolyphosphate concentration were 0.05 mg/mL, 3.16 and 0.75% respectively. These results would contribute with the design of future applications of this immobilized catalytic system.

Our work demonstrate how two abundant seafood by-products (fish viscera and shrimp head waste) can be utilized as a starting material to design an immobilized

catalytic system, representing an opportunity to generate add value commodities from the fish industry.

References

- Altun, G. D. and Cetinus, S. A. 2007. Immobilization of pepsin on chitosan beads. *Food Chem.* 100: 964-971.
- Amaral, I. P. Carneiro-da-Cunha, M. G. Carvalho Jr. L. B. and Bezerra, R. S. 2006. Fish trypsin immobilized on ferromagnetic Dacron. *Process Biochem.* 41: 1213-1216.
- Arvanitoyannis, I. S. and Kassaveti, A. 2008. Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *Int. J. Food Sci. Tech.* 43: 726-745.
- Aryee, A. N. and Simpson, B. K. 2012. Immobilization of Lipase from Grey Mullet. *Appl. Biochem. Biotech.* 168: 2105-2122
- Baş, D. and Boyacı, İ. H. 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J. Food Eng.* 78: 836-845.
- Bautista-Baños, S. Hernández-Lauzardo, A. Velázquez-del Valle, M. Hernández-López, M. Ait Barka, E. Bosquez-Molina, E. and Wilson, C. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Prot.* 25: 108-118.
- Beaney, P. Lizardi-Mendoza, J. and Healy, M. 2005. Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *J. Chem. Technol. Biot.* 80: 145-150.
- Box, G. Hunter, W. and Hunter, J. 1978. *Statistics for experimenters An introduction to design, data analysis and model building* John Wiley and Sons. New York.
- Brady, D. and Jordaan, J. 2009. Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol. Lett.* 31: 1639-1650.
- Brugnerotto, J. Lizardi, J. Goycoolea, F. Argüelles-Monal, W. Desbrieres, J. and Rinaudo, M. 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer.* 42: 3569-3580.
- Castillo-Yañez, F. J., Pacheco-Aguilar, R., Garcia-Carreño, F. L., & Navarrete del Toro, M. A. (2004). Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. *Food Chem.* 85: 343-350.
- Díaz-López, M. Moyano-López, F. J. Alarcón-López, F. J. García-Carreño, F. L. and Navarrete del Toro, M. 1998. Characterization of fish acid proteases by substrate-gel electrophoresis. *Comp. Biochem. Phys. B.* 121: 369-377.

- Díaz-Rojas, E. I. Argüelles-Monal, W. M. Higuera-Ciapara, I. Hernández, J. Lizardi-Mendoza, J. and Goycoolea, F. M. 2006. Determination of chitin and protein contents during the isolation of chitin from shrimp waste. *Macromol. Biosci.* 6: 340-347.
- Dumay, J. Donnay-Moreno, C. Barnathan, G. Jaouen, P. and Berge, J.-P. 2006. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochem.* 41: 2327-2332.
- Dwevedi, A. and Kayastha, A. M. 2009a. Stabilization of β -galactosidase (from peas) by immobilization onto Amberlite MB-150 beads and its application in lactose hydrolysis. *J. Agr. Food Chem.* 57: 682-688.
- Dwevedi, A. and Kayastha, A. M. 2009b. Optimal immobilization of β -galactosidase from Pea (*PsBGAL*) onto Sephadex and chitosan beads using response surface methodology and its applications. *Bioresource Technol.* 100: 2667-2675.
- Elvevoll, E. 2004. Fish Waste and Functional Foods. In: Total Food Exploiting co-products minimizing waste: Waldron, K., Fauldsand, C., Smith, A. (Eds.) Institute of Food Research, Norwich. pp. 49-57.
- Ferraro, V. Carvalho, A. P. Piccirillo, C. Santos, M. M. Castro, P. M. and Pintado, M. E. 2013. Extraction of high added value biological compounds from sardine, sardine-type fish and mackerel canning residues—A review. *Mat. Sci. Eng. C.* 33: 3111-3120.
- Gutiérrez Pulido, H. and de la Vara Salazar, R. 2004. Análisis y diseño de experimentos. McGraw-Hill. Mexico DF
- Helrich, K. 1990. Official methods of Analysis of the AOAC. Volume 2. Association of Official Analytical Chemists Inc. Arlington.
- Jayakumar, R. Prabakaran, M. Sudheesh Kumar, P. Nair, S. and Tamura, H. 2011. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol. Adv.* 29: 322-337.
- Kılınc, D. A. Teke, M. Önal, S. and Telefoncu, A. 2006. Immobilization of pancreatic lipase on chitin and chitosan. *Prep. Biochem. Biotech.* 36: 153-163.
- Krajewska, B. 2004. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb. Tech.* 35: 126-139.
- Kumar, S. Dwevedi, A. and Kayastha, A. M. 2009. Immobilization of soybean (*Glycine max*) urease on alginate and chitosan beads showing improved stability: Analytical applications. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 58: 138-145.

- Kumari, A. and Kayastha, A. M. 2011. Immobilization of soybean (*Glycine max*) α -amylase onto Chitosan and Amberlite MB-150 beads: Optimization and characterization. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 69: 8-14.
- Kurtovic, I. Marshall, S. N. and Zhao, X. 2011. Hydrophobic immobilization of a bile salt activated lipase from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 72: 168-174.
- Li, D. Matos, M. and Simpson, B. K. 2013. Inactivation of pectin methylesterase by immobilized trypsins from cunner fish and bovine pancreas. *Biotechnol. Appl. Bioc.* 60: 244-252.
- Mazik, K. and Burdon, D. 2005. Seafood-waste disposal at sea – a scientific review. Report YBB088. Institute of Estuarine & Coastal Studies (IECS). The University of Hull. pp. 18-32
- Potumarthi, R. Subhakar, C. Pavani, A. and Jetty, A. 2008. Evaluation of various parameters of calcium-alginate immobilization method for enhanced alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* NCIM-2042 using statistical methods. *Bioresource Technol.* 99: 1776-1786.
- Romdhane, I. B.-B. Romdhane, Z. B. Gargouri, A. and Belghith, H. 2011. Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 68: 230-239.
- Safari, R. Nasrollahzadeh Saravi, H. Pourgholam, R. Motalebi, A. A. and Ghoroghi, A. 2011. Use of Hydrolysates from Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) Head as Peptone for *Vibrio anguillarum* and Optimization Using Response Surface Method (RSM). *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 20: 247-257.
- Salazar-Leyva, J. A. Lizardi-Mendoza, J. Ramirez-Suarez, J. C. Valenzuela-Soto, E. M. Ezquerra-Brauer, J. M. Castillo-Yañez, F. J. and Pacheco-Aguilar, R. 2013. Acidic Proteases from Monterey Sardine (*Sardinops sagax caerulea*) Immobilized on Shrimp Waste Chitin and Chitosan Supports: Searching for a By-product Catalytic System. *Appl. Biochem. Biotech.* 171: 795-805.
- Sangeetha, K. and Abraham, T. 2008. Investigation on the development of sturdy bioactive hydrogel beads. *J. Appl. Polym. Sci.* 107: 2899-2908.
- Sila, A. Nasri, R. Bougatef, A. and Nasri, M. 2012. Digestive alkaline proteases from the goby (*Zosterisessor ophiocephalus*): Characterization and potential application as detergent additive and in the deproteinization of shrimp wastes. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 21: 118-133.
- Singh, A. N. Suthar, N. Singh, S. and Dubey, V. K. 2011. Glutaraldehyde activated chitosan matrix for immobilization of a novel cysteine protease, procerain B. *J. Agr. Food Chem.* 59: 6256–6262.

- Tharanathan, R. and Kittur, F. 2002. Chitin--the undisputed biomolecule of great potential. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43: 61-87.
- Tripathi, P. Kumari, A. Rath, P. and Kayastha, A. M. 2007. Immobilization of α -amylase from mung beans (*Vigna radiata*) on Amberlite MB 150 and chitosan beads: A comparative study. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 49: 69-74.

Table 1

Evaluated factors and their coded and actual values used in the central composite design

Factor	High axial (+α)	High factorial (+1)	Center (0)	Low factorial (-1)	Low axial (-α)
Enzyme loading, mg/mL (X_1)	0.012	0.04	0.08	0.12	0.14
Immobilization pH (X_2)	2.15	2.5	3	3.5	3.84
STPP, % (X_3)	0.16	0.5	1	1.5	1.84

Table 2

Isolation of acidic proteases from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) stomachs

Isolation step	Total protein (mg)	Total activity (U) ^a	Specific activity (U/mg)	Increase in purity
Crude extract	1341.9	1128.8	0.8	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ 20%	1235.8	1215.4	0.9	1.2
(NH ₄) ₂ SO ₄ 70%	965.8	1541.1	1.5	1.9
Dialyzed extract	49.7	1385.7	27.8	33.1

^aU = 1μg of tyrosine equivalent released from hemoglobin per min

Table 3

Chemical composition (dry weight basis) of shrimp head waste and the extracted chitin

Sample	Lipids	Total nitrogen	Ash	Protein	Chitin
Shrimp head waste	4.3 ± 0.5	9.1 ± 0.6	24.5 ± 1.4	45.6 ± 0.03	24.3 ± 0.1
Chitin	0.56 ± 0.2	5.9 ± 0.08	1.2 ± 0.01	0	92.3 ± 0.2

Table 4
Design matrix and experimental values of the evaluated response

Run	Factors			Response
	Enzyme loading, mg/mL (X ₁)	Immobilization pH (X ₂)	STPP,% (X ₃)	Immobilization yield (%)
1	0.14	3	1	24.09
2	0.08	3	0.16	41.9
3	0.08	2.15	1	1.20
4	0.12	3.5	0.5	15.37
5	0.12	3.5	1.5	23.30
6	0.12	2.5	0.5	14.86
7	0.08	3	1	49.20
8	0.04	3.5	0.5	82.62
9	0.08	3	1	61.18
10	0.04	2.5	0.5	44.48
11	0.08	3	1	89.79
12	0.04	3.5	1.5	49.51
13	0.08	3	1.84	66.59
14	0.012	3	1	85.21
15	0.08	3.84	1	10.58
16	0.04	2.5	1.5	9.29
17	0.12	2.5	1.5	15.15

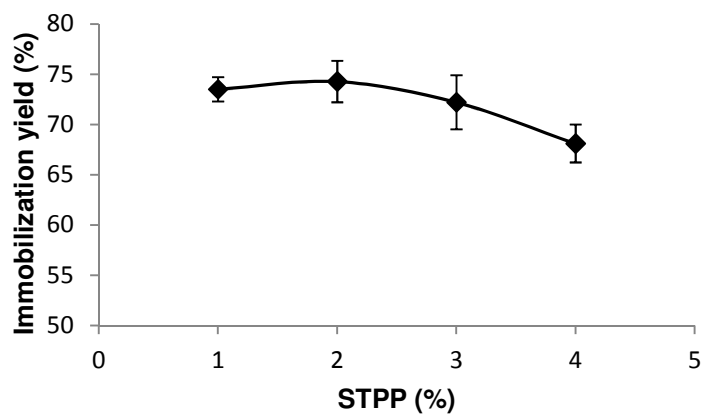
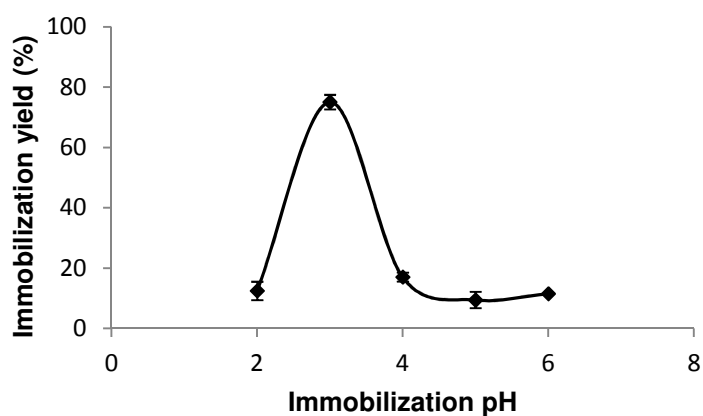
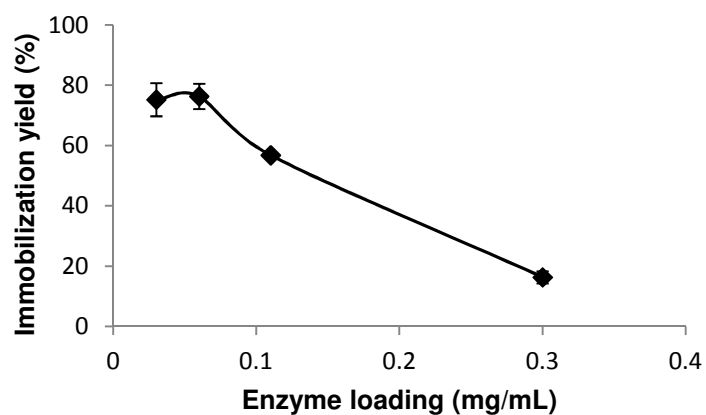
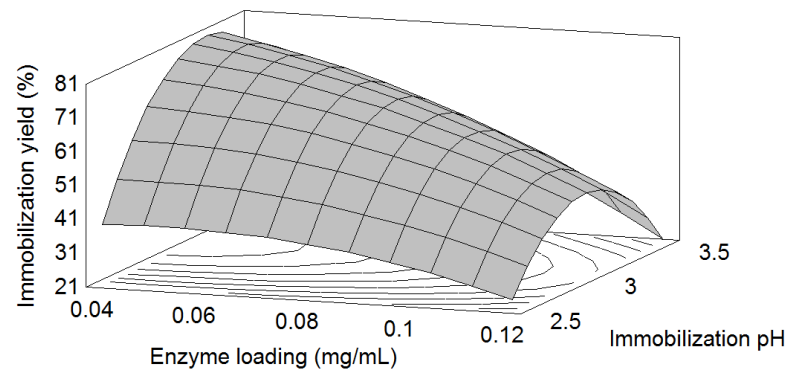


Figure 1. Effect of various parameters over immobilization yield of sardine proteases (a) Enzyme loading (b) Immobilization pH and (c) Sodium tripolyphosphate (STPP) concentration

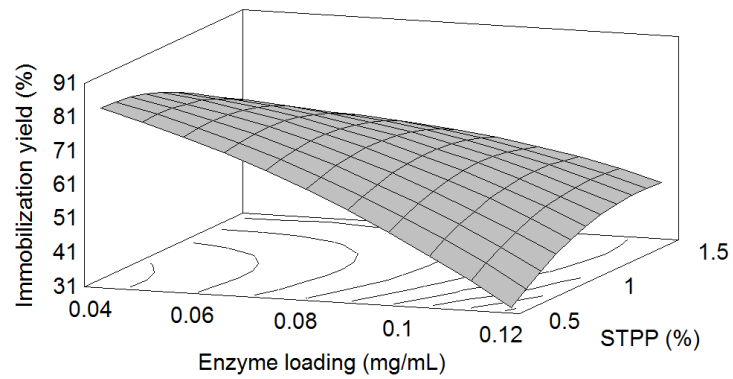
Table 5
 Analysis of variance (ANOVA) for the fitted quadratic model for optimization of immobilization yield

Source	Degree of freedom	<i>F</i> -value	<i>P</i> -value (Prob > <i>F</i>)
Model	8	5.54	0.0129*
Enzyme loading, mg/mL (X_1)	1	14.57	0.0051*
Immobilization pH (X_2)	1	3.18	0.112
STPP, % (X_3)	1	0.10	0.755
$X_1 * X_2$	1	2.5	0.152
$X_1 * X_3$	1	3.01	0.1209
$X_1 * X_1$	1	1.31	0.285
$X_2 * X_2$	1	23.5	0.0013*
$X_3 * X_3$	1	1.38	0.27
Lack of fit	6	0.41	0.83
R^2	0.854		
R^2_{adj}	0.71		

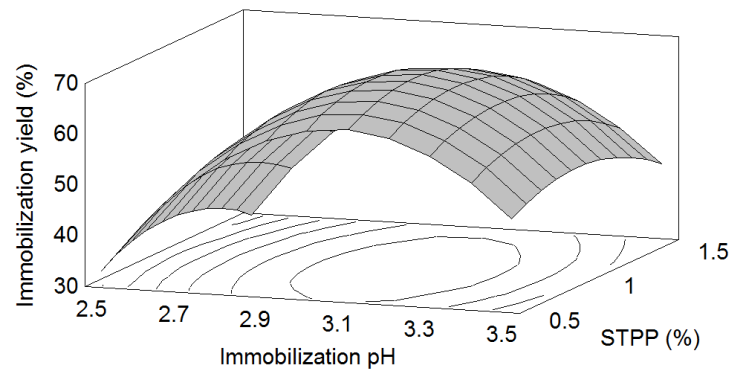
*Significant at *P* value less than 0.05



a



b



c

Figure2. Response surface plots for the mutual effects of immobilization conditions on immobilization yield. (a) enzyme loading and immobilization pH, (b) enzyme loading and tripolyphosphate concentration, (c) immobilization pH and tripolyphosphate concentration

CAPÍTULO IV

Catalytic and operational stability of acidic proteases from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) immobilized on a partially deacetylated chitin support.

Manuscrito preparado para su envío a la revista Food Chemistry

Catalytic and operational stability of acidic proteases from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) immobilized on a partially deacetylated chitin support.

Jesus Aaron Salazar-Leyva^a, Jaime Lizardi-Mendoza^a, Juan Carlos Ramirez-Suarez^a,
Elisa Miriam Valenzuela-Soto^a, Josafat Marina Ezquerro-Brauer^b, Francisco Javier
Castillo-Yañez^b, and Ramon Pacheco-Aguilar^{a*}

^a Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Carretera a la Victoria,
C.P. 83304. Hermosillo, Sonora, México.

^b Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora.
Rosales y Niños Héroe S/N. Hermosillo, Sonora, México.

*Corresponding author: Ramon Pacheco-Aguilar

Tel./Fax: +52-662-280-04-21.

E-mail address: rpacheco@ciad.mx

ABSTRACT

Recovery of valuable compounds from byproducts generated from seafood processing industry represents an opportunity to produce value-added products. Thus, the immobilization and characterization of sardine Monterey acidic proteases immobilized on partially deacetylated chitin extracted from shrimp head waste was researched. Maximal enzyme activity of free and immobilized proteases was detected at pH 2, pH value where the immobilized form presented higher stability than free enzymes. Optimum temperature for free and immobilized proteases was 40 and 50°C, respectively, while thermal stability of immobilized proteases was greater than that of free proteases. Reusability studies showed that after a second catalytic cycle, the immobilized system maintained around 40% of enzyme activity. The immobilization process enhanced the long term storage stability (at 6 and 25°C) of sardine acidic proteases with respect to free enzymes. The results suggest that the immobilized catalytic system can potentially be used as a biotechnological aid for food processing when low pH and temperature around 50°C are needed.

Keywords: Acidic proteases, chitin, immobilization, catalytic, stability

1. Introduction

According to the Food and Agriculture Organization (FAO), processed fish for human consumption increased from 46.7 million tons in 1998 to 68.1 million tons in 2010 (FAO, 2012). Consequently, this growing tendency has caused the widespread of fish processing industry, as well as the generation of seafood by-products. In this regard, every year about 18-30 million tons of these by-products are dumped around the world, constituting a serious environmental problem (Elvevoll, 2004; Arvanitoyannis & Kassaveti, 2008). Considering that by-products generated from the fish processing industry are considered, in most instances, a source of highly valuable compounds, their utilization to produce value-added products has been highlighted as one of the high priority areas for development within the global seafood industry (He, Franco & Zhang, 2013).

Waste derived from shrimp, prawn, crab, lobster, and crayfish processing is generally used as raw material for commercial production of chitin and its deacetylated derivative, chitosan. These biopolymers have a myriad of applications in different fields, like biomedicine, pharmaceutical food, agriculture, environmental and cosmetics, among others (Singh, Suthar, Singh & Dubey, 2011). One interesting application of chitin and chitosan based materials is their utilization as a matrix for enzyme immobilization, which is related with the structural and functional properties that these polysaccharides can offer (Krajewska, 2004).

On the other hand, fish viscera, an important by-product that is usually discharged or underutilized, represents an interesting source of enzymes, mostly acidic and alkaline

proteases (Phanturat, Benjakul, Visessanguan & Roytrakul, 2010; Khaled, Ghorbel-Bellaaj, Hmidet, Jellouli, Ali, Ghorbel & Nasri, 2011). Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) is the main fishery product in northwestern Mexico. Its major digestive enzymes has been isolated and characterized at our laboratory, showing that sardine viscera is a potential source for biological reagent production (Castillo-Yañez, Pacheco-Aguilar, Garcia-Carreño & Navarrete del Toro, 2004; 2005).

Even though no reliable market data are presently available, recovery of marine enzymes is potentially profitable (Ferraro, Cruz, Jorge, Malcata, Pintado & Castro, 2010). In this context, with the aim to enhance the possibility of application of enzymes isolated from fish viscera, several research groups are focusing their efforts on the improvement of their structural stability via immobilization procedures in different types of supports. For example, lipase from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and grey mullet (*Mugil cephalus*) viscera were immobilized on octyl sepharose, a hydrophobic support (Kurtovic, Marshall & Zhao, 2011; Aryee & Simpson, 2012). Concerning the immobilization of proteases from marine organisms, Han & Shahidi (1995) performed the immobilization of gastric proteases isolated from harp seal on chitin activated with glutaraldehyde. More recently alkaline proteases from fish viscera like trypsin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), cunner fish (*Taufogolabrus adpersus*) and carp (*Labeo rohita*) have been immobilized on ferromagnetic Dacron®, controlled pore glass and alginate respectively (Amaral, Carneiro-da-Cunha, Carvalho Jr & Bezerra, 2006; Li, Matos & Simpson, 2013; Geethanjali & Subash, 2013).

Recent work at our laboratory has shown the success immobilization of sardine acidic proteases on partially deacetylated chitin flakes extracted from shrimp waste. The

retained proteolytic activity of the immobilized proteases suggests that the obtained catalytic system could be applied as a biotechnological aid in different fields (Salazar-Leyva et al., 2013). Hence the aim of the present study was to improve the immobilization conditions of sardine acidic proteases on partially deacetylated chitin crosslinked with sodium tripolyphosphate, characterizing the catalytic and operational behavior of the immobilized system.

2. Materials and Methods

2.1 Reagents

Hemoglobin, glycine, trichloroacetic acid (TCA), sodium tripolyphosphate (STPP), ammonium sulphate, sodium hydroxide and hydrochloric acid were purchased to Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA). Dialysis tubing was from Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, CA, USA). Bradford reagent was purchased to Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA).

2.2 Raw materials

Monterey sardine samples (*Sardinops sagax caerulea*) were kindly provided by Productos Pesqueros de Guaymas S.A., a fishing company located in Guaymas, Sonora, Mexico. Sardines were transported in ice to the laboratory within 18 h of capture and immediately eviscerated. The collected viscera were frozen at -80°C until use. Shrimp heads (*Penaeus spp*) were obtained from Empromar, S.A., a shrimp processing plant located in Kino Bay, Sonora. Heads were stored at -20°C until use to prevent spoilage.

2.3 Isolation of acidic proteases from Monterey sardine stomachs

Semi-purified acidic proteases extract from sardine stomachs was prepared in four steps with slight modifications of the method proposed by Castillo-Yañez et al., (2004). Sardine stomachs were homogenized with ice-cold distilled water. The homogenate was centrifuged at $26,000 \times g$ for 20 min at 4°C and the supernatant was fractionated, using 20-70% ammonium sulfate, followed by centrifugation at $20,000 \times g$ 30 min at 4°C . The enzyme preparations so obtained were dialyzed against 0.01 M glycine-HCl buffer pH 3. After dialysis for 24 h and four changes of the same buffer, the sample was adjusted to pH 3.0 by addition of 0.1 M HCl, and centrifuged at $20,000 \times g$ for 20 min at 4°C . The supernatant was considered the semi-purified extract of acidic proteases.

2.4 Extraction of chitin based materials from shrimp head waste

Chitin was extracted from minced shrimp head waste by chemical procedures, using 1 M hydrochloric acid and 3.75 M sodium hydroxide solutions, for demineralization and protein removal, respectively. Chitin was converted to partially deacetylated chitin by an alkaline deacetylation process, mixing chitin samples with 12.5 M sodium hydroxide solution. This reaction was carried out at 70°C for 2 h. Then, remaining solid (partially deacetylated chitin) was removed, cooled and washed with water until its pH was neutral (Beaney, Lizardi-Mendoza & Healy, 2005) The degree of acetylation (DA) of the obtained material was estimated from their Fourier transformed infrared (FTIR) spectra (Brugnerotto, Lizardi, Goycoolea, Argüelles-Monal, Desbrieres & Rinaudo, 2001).

2.5 Support preparation and protease immobilization process

Uniform size particles of partially deacetylated chitin flakes (PDCHNF) were obtained sieving the flakes through a 2mm mesh. Before the immobilization procedure, an appropriate amount of support was equilibrated in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) for 20 min at 25°C (Kılınç, Teke, Önal & Telefoncu, 2006). Later, PDCHNF were activated with the corresponding concentration of STPP by stirring at 150 rpm and 30 °C for 1h. Then, active supports were washed thoroughly with water and put in contact with the corresponding amount of sardine acidic proteases at 4°C for 2 h while stirring at 100 rpm (Sangeetha & Abraham, 2008). After the immobilization, the supernatant (solution left after immobilization procedure) and washing solutions were collected to determine its acidic proteolytic activity and the amount of protein by the Bradford assay (Bradford, 1976).

2.6 Acidic proteolytic activity of free and immobilized proteases

Acidic protease activity of free enzyme was evaluated using 0.5% hemoglobin substrate dissolved in 0.1 M glycine-HCl buffer, pH 3. The reaction mixture was incubated for 20 min at 25°C and the reaction stopped by adding 20% trichloroacetic acid solution. Mixture was chilled (4°C for 20 min) and then centrifuged at 20,000 × g for 30 min for further reading of absorbance of soluble peptides at 280 nm. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme catalyzing the formation of 1 µg of tyrosine from hemoglobin per minute under assay conditions. The number of units of activity per milligram of protein was taken as the specific activity of the acidic proteases (Díaz-López, Moyano-López, Alarcón-López, García-Carreño & Navarrete del Toro, 1998). A similar procedure was used to determine the protease activity on immobilization supports, following the appropriate recommendations for determining

proteolytic activity in immobilized enzymes (Magnin, Dumitriu & Chornet, 2003) . Briefly, 0.5% hemoglobin solution was added to one single flake of partially deacetylated chitin containing the immobilized proteases. The mixture was incubated under stirring (75 rpm) at same conditions used for free protease analysis.

2.7 Selection of immobilization conditions

With the aim of improve the immobilization of sardine proteases on PDCHNF, different concentrations of activating solution (0.1, 1, 2, 3, and 4 % STPP) were utilized. Also, enzyme loading in the supports was varied using different concentration of protease extract (0.03, 0.06, 0.11 and 0.3 mg/mL). Moreover, the immobilization process was done at different pH values (2, 3, 4, 5 and 6). After the diverse immobilization experiments, the acidic proteolytic activity was determined and the retained activity (RA) on the supports was calculated according to the following relation:

$$RA (\%) = \frac{SA_i}{SA_f} \times 100 \quad (1)$$

Where SA_i and SA_f represent the specific activity (U/mg) of immobilized and free proteases, respectively.

2.8 Catalytic properties of free and immobilized proteases

All the enzyme assays for this part of the study, were conducted according to the acidic proteolytic activity protocol described in section 2.6.

2.8.1 pH and temperature optima

The effect of pH on the activities of free and immobilized acidic proteases was evaluated at pH values of 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 and 5. The substrate solution (hemoglobin 0.5%) was dissolved in the appropriate buffer, mixed with protease samples and their acidic proteolytic activities were determined. The effect of temperature on the activity of free and immobilized proteases was also studied. Prior to the acidic proteolytic assays, the substrate solution was equilibrated at the corresponding temperature (10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70°C); later the enzyme activity was determined at desired temperature.

The results of optima pH and temperature of free and immobilized proteases were presented in a normalized form, with the highest value of each set being assigned the value of 100% activity.

2.8.2. pH and temperature stabilities

The ability of free and immobilized proteases to retain its activity under various conditions of pH and temperatures was studied. The pH stability was ascertained by measuring the residual activity of enzyme exposed at various pH's (2-6) in buffer solution (glycine-HCl and citrate-NaOH 0.1 M for pH of 2 to 3.5 and pH of 4 to 6, respectively) for 6 h at room temperature. Thermal stability was determined incubating enzyme samples in buffer solution (glycine-HCl, 0.1 M, pH 3) at 50°C, for different periods of time. After the different incubation conditions, the residual proteolytic activity was measured. The 100% of enzyme activity corresponded to the activity of free and immobilized enzyme without incubation.

2.9 Reusability of immobilized sardine acidic proteases

The proteolytic activity of the immobilized proteases against 0.125% hemoglobin was determined as described in section 2.6 following their repetitive use. Subsequent to each reaction run, immobilized proteases were removed and washed with buffer glycine-HCl 0.1 M, pH 3. Then, the immobilized proteases were reintroduced into fresh substrate solution to start a new reaction cycle. The enzyme activity obtained after each reaction cycle was compared with that of the first cycle, which was considered to have the 100% of enzyme activity.

2.10 Storage stability of free and immobilized proteases

The storage stability of free and immobilized acidic proteases was determined calculating the residual enzyme activity after a storage period. An aliquot of acidic proteases solution (662 U/mL) and an appropriate amount of wet support containing the immobilized proteases were stored in 0.1 M glycine-HCl buffer, pH 2 at two different storage temperatures, 6 and 25°C. Enzyme activity was measured at regular intervals.

2.11 Statistical analysis

To determine the effect of the immobilization process over the catalytic and storage stability of sardine acidic proteases, one-way analysis of variance was carried out using NCSS 2007 software (Kaysville, Utah). Significant differences of means were established at $P < 0.05$ using the Tukey–Kramer multiple comparison test.

3. Results and discussion

3.1 Immobilization of sardine acidic proteases on partially deacetylated chitin activated with STPP

Sodium tripolyphosphate (STPP) is a multivalent anion that can form crosslinking by ionic interaction between positively charged amino ($-\text{NH}_3^+$) groups of chitosan and multivalent negatively charged STPP molecules in acid medium (Fernandes, de Oliveira, Fatibello-Filho, Spinelli & Vieira, 2008). In the present study, as a result of previously research conducted, the catalytic system under investigation was conformed of partially deacetylated chitin activated with STPP. Figure 1 shows a proposition for the immobilization of sardine acidic proteases on PDCHNF. In this respect, the partially deacetylated chitin support, due to their “intermediate” degree of acetylation (GA = 48.1%) could present free amino groups capable to perform ionic interactions with STPP molecules and, at the same time, STPP might interact with residues of positively charged aminoacids located at the surface of acidic proteases, which for sardine Monterey have been reported to be similar to pepsin II (Castillo et al., 2004). In addition, previous studies have shown that that a higher proportion of basic aminoacids, such as histidine, lysine and arginine, are found in pepsin II from Atlantic cod (*Gadus morhua*) than in mammalian pepsins (Karlsen, Hough & Olsen, 1998); therefore, this structural feature of fish pepsins could enhance the possibilities of ionic interactions between sardine acidic proteases and STPP.

3.2 Selection of immobilization conditions

3.2.1 Concentration of STPP

The effect of STPP concentration on retained activity was studied at fixed pH of immobilization (pH 3) and enzyme loading (0.06 mg/mL). According to results, when the immobilization supports were activated with 1 % STPP, the higher value of RA was achieved. Nevertheless, as the concentration of STPP was more than 1%, the activity of

the immobilized proteases decrease (Table 1). The drop in retention activity at higher concentrations of STPP could be related with conformational changes of immobilized proteases caused by the extensive interaction of enzymes with phosphate groups present on the PDCHNF surface. In this regard, various studies of enzyme immobilization performed on chitosan based materials have reported that the activity of immobilized enzymes tends to decrease when the concentration of activating solution (i.e. glutaraldehyde) of the supports is increased, phenomena attributed to the fore exposed reason, but in this case the increase of glutaraldehyde concentration would cause an increment in aldehyde groups on the surface of supports and consequently the structural distortion of the immobilized enzymes (Jiang, Long, Huang, Xiao & Zhou, 2005; Zhang, Zhang, Wang & Gao, 2008).

3.2.2. Enzyme loading on the supports

The amount of enzyme loaded to immobilization supports is one important factor in the process, since it has been documented that not all of the protein that is added during the immobilization process is bound to the matrix (Dhananjay & Mulimani, 2008). For this reason, different amounts of protease were immobilized on PDCHNF (at pH 3) activated with 1% STPP. The effect of enzyme loading over retained activity is shown in Table 1. Lower RA values were observed at the minor enzyme loading (0.03 mg/mL), behavior that could be related with the fact that the low amount of enzyme offered, and subsequently attached to the support, is insufficient to transform the substrate completely into products.

On the other hand, the activity of immobilized proteases increased until reaching the highest RA at 0.11 mg/mL; thereafter, the proteolytic activity slightly decreased with

increasing the amount of loaded enzyme (Table 1). The drop in RA at higher enzyme loadings has been reported for several authors. In this regard, Silva et al., (2011) mentioned that an immobilization system containing high loads of enzyme may be subject to diffusion limitations and steric hindrance resulting in a low retained activity on the supports. For instance, Gomes et al., (2004) explained that high lipase loading onto a chitin support could cause a multilayer adsorption in the support, effect that could block the access of substrate to the enzyme active site. Similar results were obtained by Jiang et al., (2005) and Singh et al., (2011) for a laccase immobilized on magnetic chitosan microspheres and for a cysteine protease attached to chitosan beads, respectively. In addition, Table 1 shows that the increment in enzyme loading causes also an increment in acidic proteolytic activity on the supernatants, a clear indication that the saturation of the immobilization support with the loaded proteases occurred.

3.2.3. pH of immobilization

The effect of pH on the immobilization of sardine acidic proteases was studied in the range of pH 2-6, whereas the concentration of STPP and enzyme loading were fixed at 1% and 0.06 mg/mL, respectively. According to Table 1, it is observed a strong dependence of immobilization pH over the retained enzyme activity on PDCHNF supports, being the value of pH 3 where the highest value of RA was observed. The strong relationship observed between pH of immobilization and RA shows that the ionization state of the different functional groups present on the surface of the immobilization support, the activating agent (STPP) and acidic proteases, largely depends on the pH of the immobilizing solution.

Related to the above exposed, it is possible that at pH 3, the acidic proteases showed optimal electrostatic interactions on the surface of PDCHNF support activated with STPP. At this pH value (3) at least two PO^{-4} groups of STPP would be negatively charged, whereas the amine groups of both, the support and polar amino acids of protein surface would carry positive charge. In addition, the higher RA, found at immobilization pH of 3 could be related with the low acidic proteolytic activity detected in the supernatants (Table 1); thus, at this pH of immobilization the majority of the loaded proteases were immobilized and presented an optimal structural conformation.

Also from Table 1, it is observed that when acidic proteases were immobilized at pH 2, the retained activity on the supports diminished dramatically. This behavior is surprisingly due to the acidic nature of sardine acidic proteases, but may be related with the higher enzyme activity detected in the supernatants at this pH of immobilization, indicating that most of the loaded enzyme was not bounded to the support.

On the other hand, the retained activity on supports dropped drastically at pH values higher than 3 (Table 1), which might be related to the low stability of sardine acidic proteases in the pH region of 4 to 6. Also when acidic proteases were immobilized at this pH values, the detected enzyme activity in supernatants were high.

Thus, results indicate that the higher RA on supports (59%) was achieved at the following conditions: 1% STPP , enzyme loading of 0.11 mg/mL and immobilization pH of 3. Therefore, these immobilization conditions were used for further studies.

3.3 Effect of immobilization on pH optima and stability

It is known that charge properties of immobilization supports have an effect over the optimal pH of immobilized enzymes. Anionic supports tend to displace the pH optimum toward the alkaline side, whereas cationic supports tend to shift the pH optimum towards the acidic side. Presumably, the shift towards acidic pH is caused by the non-substituted positively charged amino groups on chitosan based supports (Krajewska, Leszko & Zaborska, 1990).

In this study both, free and immobilized proteases, showed maximal activities at pH 2 (Figure 2a). The null effect of the immobilization process over the optimum pH can be explained by taking into account the degree of acetylation of the material used as the immobilization support (degree of acetylation = 48.1%). Thus, partially deacetylated chitin has a relatively lower presence of free amino groups capable of being protonated at acidic pH's, consequently the microenvironment of immobilized proteases was unaffected. In agreement with our results, Maciunska et al., (2000) observed a moderate shift in pH optima of an immobilized β -galactosidase on chitin flakes. These authors suggested that this phenomenon is associated with the relatively low concentration of free amino groups in chitin.

Another explanation for the unaffected pH optima of immobilized sardine proteases could be related with the limited number of available amino groups due to the cross-linking process of the PDCHNF support with STPP. In this respect, Altun & Cetinus, (2007) found that the pH profile of free and immobilized pepsin on chitosan beads cross-linked with glutaraldehyde was the same, attributing this behavior to the unavailable amino groups on the beads surface due to the cross-linking process. Previous studies reporting no changes on the pH optimum of enzymes after the immobilization process

onto chitosan based supports are the conducted by Jiang et al., (2005), Chiou et al., (2007), and Dhananjay & Mulimani, (2008). On the other hand, free and immobilized proteases displayed minimal enzyme activity above pH 4 (Figure 2a), behavior related with the well known instability of sardine Monterey acidic proteases at these pH values (Castillo et al., 2004).

Regarding pH stability, the immobilized proteases displayed a higher residual activity ($P < 0.05$) at pH 2 than free proteases (Figure 2b). This remarkable stability at acidic pH's could be due to the absence of autolysis of the immobilized enzymes during the incubation time (6 h). In this context, Mateo et al., (2007) explained that immobilization process stabilize the enzyme against interactions with molecules from the enzymatic extract, preventing aggregation, autolysis or proteolysis by proteases from the extract (that will be also immobilized). Moreover, both, free and immobilized proteases lost their activities when the pH was above 4, attributing this behavior to the acidic nature of the enzymes. Altun and Cetinus (2007) found the same tendency, when pepsin was immobilized onto chitosan beads.

3.4 Effect of immobilization on optimum temperature and stability

Various studies have demonstrated that covalent and also non-covalent immobilization of enzymes onto chitosan based supports have a positive effect over the optimum temperature and thermal stability of the immobilized biocatalysts (Gomes et al., 2004; Kılınc et al., 2006; Alloue et al., 2008; Dhananjay & Mulimani, 2008; Zhang et al., 2008; Kumar et al., 2009). In this context, the optimum temperature of immobilized proteases shifted to a higher value than that of free proteases. The

maximum activity of the immobilized enzymes was obtained at 50°C compared with 40°C for the free proteases. Besides at 60°C, the immobilized proteases maintained about 60% of enzyme activity, while the activity of free proteases was lost at the same temperature (Figure 3a).

The thermostability of acidic proteases was influenced by the immobilization process ($P < 0.05$). Figure 3b shows that after 150 min of incubation at 50°C, the immobilized proteases showed around 70% of residual enzyme activity, whereas free proteases showed only about 27% of the activity under the same incubation condition. Interactions formed between enzyme and support tend to increase the enzyme rigidity, which is commonly reflected by an increase in stability towards temperature denaturation (Altun & Cetinus, 2007). Besides, Kumar et al., (2009), supposed that the improved thermal stability of an immobilized urease could be aided by the support, which absorbs a considerable amount of heat and protects the enzyme against denaturation.

3.5 Reusability of immobilized proteases

The capability to reuse the immobilized sardine acidic proteases was evaluated in a repeated batch process (Figure 4). Enzyme activity decreased after each reuse. However, after employing the immobilized catalytic system for the second time, around 40% of enzyme activity remained. Then, subsequent uses reduced the activity to less than 10%. This result might be related with the possible weakening of the strength of the ionic binding between the solid support and the enzyme due to the buffer washings after each use, leading to enzyme leakage from PDCHNF support. Similar results were observed

when a lipase was immobilized by entrapment in chitosan beads (Alloue et al., 2009). These authors observed a loss of around 64% of enzyme activity after the second use of the immobilized lipase, attributing this behavior to the enzyme leakage from the beads during repeated use.

3.6 Storage stability of free and immobilized proteases

Storage stability is one of the most important features of enzymes. Concerning proteases, it is known that they exhibit storage problems because of inactivation by autolysis (Gianfreda & Scarfi, 1991). In the present study, free and immobilized sardine acidic proteases showed a slight decrease on their enzymatic activities after 10 days of storage at 6°C; however, after this time lapse, higher residual enzyme activity ($P < 0.05$) was detected in the immobilized proteases than in the free form (Figure 5a).

On the other hand, when free and immobilized forms of acidic proteases were stored at 25°C, the immobilization process influenced ($P < 0.05$) the residual enzyme activities of both forms of proteases during the storage. For instance, after 40 days of storage at 25°C the immobilized proteases displayed around 54% of residual enzyme activity, whereas free enzymes exhibited only 28.5%. Besides, after 60 days of storage both, free and immobilized proteases lost their activities in great proportion, although it is possible to observe that residual enzyme activity of immobilized enzymes remained higher ($P < 0.05$) than the activity displayed by free proteases (Figure 5b). These results indicate that the autolysis of sardine acidic proteases at 25°C can be diminished considerably by the immobilization process. Previous results in enzyme activity loss of free and immobilized enzymes with increase in the time of storage are supported by

various researches that immobilized proteases in chitin-chitosan supports (Xi, Wu, Jia & Lin, 2005; Li, Du, Sun, Liang, Feng, Wei & Yao, 2006; Wu, Luan & Zhao, 2006; Zhang, Zhang, Wang & Sun, 2011).

Comparing the residual enzyme activities at both temperatures (6 and 25°C) is possible to observe that the stability of free and immobilized proteases is protected by low temperatures (Figure 5a and 5b). This behavior could be related with the low temperature stability of sardine acidic proteases that was previously reported (Castillo-Yañez et al., 2004).

4. Conclusions

Immobilization of sardine acidic proteases on partially deacetylated chitin flakes has been carried out, resulting in a retention activity on the supports of 59%. The immobilization process caused changes in the optimum temperature of proteases but not in their optimal pH. It was found that thermal and acidic pH stabilities of immobilized proteases were greater than that of free proteases. Also, the autolysis of sardine acidic proteases during long term storage at refrigeration and room temperature was significantly diminished by the immobilization process. Due to shown results and to the harmless and biocompatibility characteristics of chitinous materials, the immobilized catalytic system could be applied as a biotechnological aid in several processes such as the enzymatic clarification of beverages and as a milk clotting enzyme.

Acknowledgments

Jesus Aaron Salazar-Leyva was on a graduate leave supported by both the Universidad Politecnica de Sinaloa and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia of Mexico.

References

- Altun, G. D., & Cetinus, S. A. (2007). Immobilization of pepsin on chitosan beads. *Food Chemistry*, *100* (3), 964-971.
- Amaral, I. P., Carneiro-da-Cunha, M. G., Carvalho Jr, L. B., & Bezerra, R. S. (2006). Fish trypsin immobilized on ferromagnetic Dacron. *Process Biochemistry*, *41* (5), 1213-1216.
- Arvanitoyannis, I. S., & Kassaveti, A. (2008). Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science & Technology*, *43* (4), 726-745.
- Aryee, A. N., & Simpson, B. K. (2012). Immobilization of Lipase from Grey Mullet. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *168* (8), 2105-2122.
- Beaney, P., Lizardi-Mendoza, J., & Healy, M. (2005). Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *80* (2), 145-150.
- Bradford, 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.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F., Argüelles-Monal, W., Desbrieres, J., & Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, *42* (8), 3569-3580.
- Castillo-Yáñez, F. J., Pacheco-Aguilar, R., García-Carreño, F. L., & Navarrete-del Toro, M. A. (2005). Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey

sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 140 (1), 91-98.

Castillo-Yañez, F. J., Pacheco-Aguilar, R., Garcia-Carreño, F. L., & Navarrete del Toro, M. A. (2004). Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. *Food Chemistry*, 85 (3), 343-350.

Chiou, S. H., Hung, T. C., Giridhar, R., & Wu, W. T. (2007). Immobilization of Lipase to Chitosan Beads using a Natural Cross-Linker. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 37 (3), 265-275.

Dhananjay, S., & Mulimani, V. (2008). Optimization of immobilization process on crab shell chitosan and its application in food processing. *Journal of Food Biochemistry*, 32 (4), 521-535.

Díaz-López, M., Moyano-López, F. J., Alarcón-López, F. J., García-Carreño, F. L., & Navarrete del Toro, M. (1998). Characterization of fish acid proteases by substrate-gel electrophoresis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 121 (4), 369-377.

Elvevoll, E. (2004). Total food: exploiting co-products—minimizing waste. In: *Total Food Proceedings*: Institute of Food Research, Norwich Research Park.

FAO (2012). The State of the World Fisheries and Aquaculture 2012. In: F. a. A. O. o. t. U. N. a. W. H. Organization. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Fernandes, S. C., de Oliveira, I. R. W., Fatibello-Filho, O., Spinelli, A., & Vieira, I. C. (2008). Biosensor based on laccase immobilized on microspheres of chitosan

crosslinked with tripolyphosphate. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 133 (1), 202-207.

Ferraro, V., Cruz, I. B., Jorge, R. F., Malcata, F. X., Pintado, M. E., & Castro, P. M. (2010). Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: A review. *Food Research International*, 43 (9), 2221-2233.

Geethanjali, S., & Subash, A. (2013). Optimization and Immobilization of Purified *Labeo rohita* Visceral Protease by Entrapment Method. *Enzyme research*, 2013.

Gianfreda, L., & Scarfi, M. R. (1991). Enzyme stabilization: state of the art. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 100 (2), 97-128.

Gomes, F. M., Pereira, E. B., & de Castro, H. F. (2004). Immobilization of lipase on chitin and its use in nonconventional biocatalysis. *Biomacromolecules*, 5 (1), 17-23.

Han, X. Q., & Shahidi, F. (1995). Extraction of harp seal gastric proteases and their immobilization on chitin. *Food Chemistry*, 52 (1), 71-76.

He, S., Franco, C., & Zhang, W. (2013). Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International*, 50, 289-297.

Jiang, D. S., Long, S. Y., Huang, J., Xiao, H. Y., & Zhou, J. Y. (2005). Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres. *Biochemical Engineering Journal*, 25 (1), 15-23.

Karlsen, S., Hough, E., & Olsen, R. L. (1998). Structure and proposed amino-acid sequence of a pepsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 54 (1), 32-46.

Khaled, H. B., Ghorbel-Bellaaj, O., Hmidet, N., Jellouli, K., Ali, N. E. H., Ghorbel, S., & Nasri, M. (2011). A novel aspartic protease from the viscera of Sardinelle (*Sardinella aurita*): Purification and characterisation. *Food Chemistry*, 128 (4), 847-853.

Kılınc, D. A., Teke, M., Önal, S., & Telefoncu, A. (2006). Immobilization of pancreatic lipase on chitin and chitosan. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 36 (2), 153-163.

Krajewska, B. (2004). Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35 (2), 126-139.

Krajewska, B., Leszko, M., & Zaborska, W. (1990). Urease immobilized on chitosan membrane: preparation and properties. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 48 (3), 337-350.

Kurtovic, I., Marshall, S. N., & Zhao, X. (2011). Hydrophobic immobilization of a bile salt activated lipase from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72 (3), 168-174.

Li, D., Matos, M., & Simpson, B. K. (2013). Inactivation of pectin methylesterase by immobilized trypsin from cunner fish and bovine pancreas. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 60 (2), 244-252.

Li, J., Du, Y., Sun, L., Liang, H., Feng, T., Wei, Y. a., & Yao, P. (2006). Chitosaneous hydrogel beads for immobilizing neutral protease for application in the preparation of low molecular weight chitosan and chito-oligomers. *Journal of Applied Polymer Science*, 101 (6), 3743-3750.

Maciunska, J., Ścibisz, M., & Synowiecki, J. (2000). Stability and properties of a thermostable β -galactosidase immobilized on chitin. *Journal of Food Biochemistry*, 24 (4), 299-310.

Magnin, D., Dumitriu, S., & Chornet, E. (2003). Immobilization of enzymes into a polyionic hydrogel: Chitoxan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 18 (5), 355-373.

Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (6), 1451-1463.

Phanturat, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Roytrakul, S. (2010). Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *LWT-Food Science and Technology*, 43 (1), 86-97.

Sangeetha, K., & Abraham, T. (2008). Investigation on the development of sturdy bioactive hydrogel beads. *Journal of Applied Polymer Science*, 107 (5), 2899-2908.

Silva, J., Macedo, G., Rodrigues, D., Giordano, R., & Gonçalves, L. (2011). Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochemical Engineering Journal*, 60, 16-24.

Singh, A. N., Suthar, N., Singh, S., & Dubey, V. K. (2011). Glutaraldehyde activated chitosan matrix for immobilization of a novel cysteine protease, procerain B. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Wu, J., Luan, M., & Zhao, J. (2006). Trypsin immobilization by direct adsorption on metal ion chelated macroporous chitosan-silica gel beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 39 (4), 185-191.

Xi, F., Wu, J., Jia, Z., & Lin, X. (2005). Preparation and characterization of trypsin immobilized on silica gel supported macroporous chitosan bead. *Process Biochemistry*, 40 (8), 2833-2840.

Zhang, B., Zhang, L., Wang, D.-F., & Sun, J.-P. (2011). Improvement of purification of trypsin inhibitor from wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) using chitosan resin-immobilized trypsin. *Journal of Food Biochemistry*, 35 (6), 1660-1670.

Zhang, J., Zhang, S., Wang, Y., & Gao, S. (2008). Stability of β -galactosidase immobilized on composite microspheres of artemisia seed gum and chitosan. *Polymer Composites*, 29 (1), 9-14.

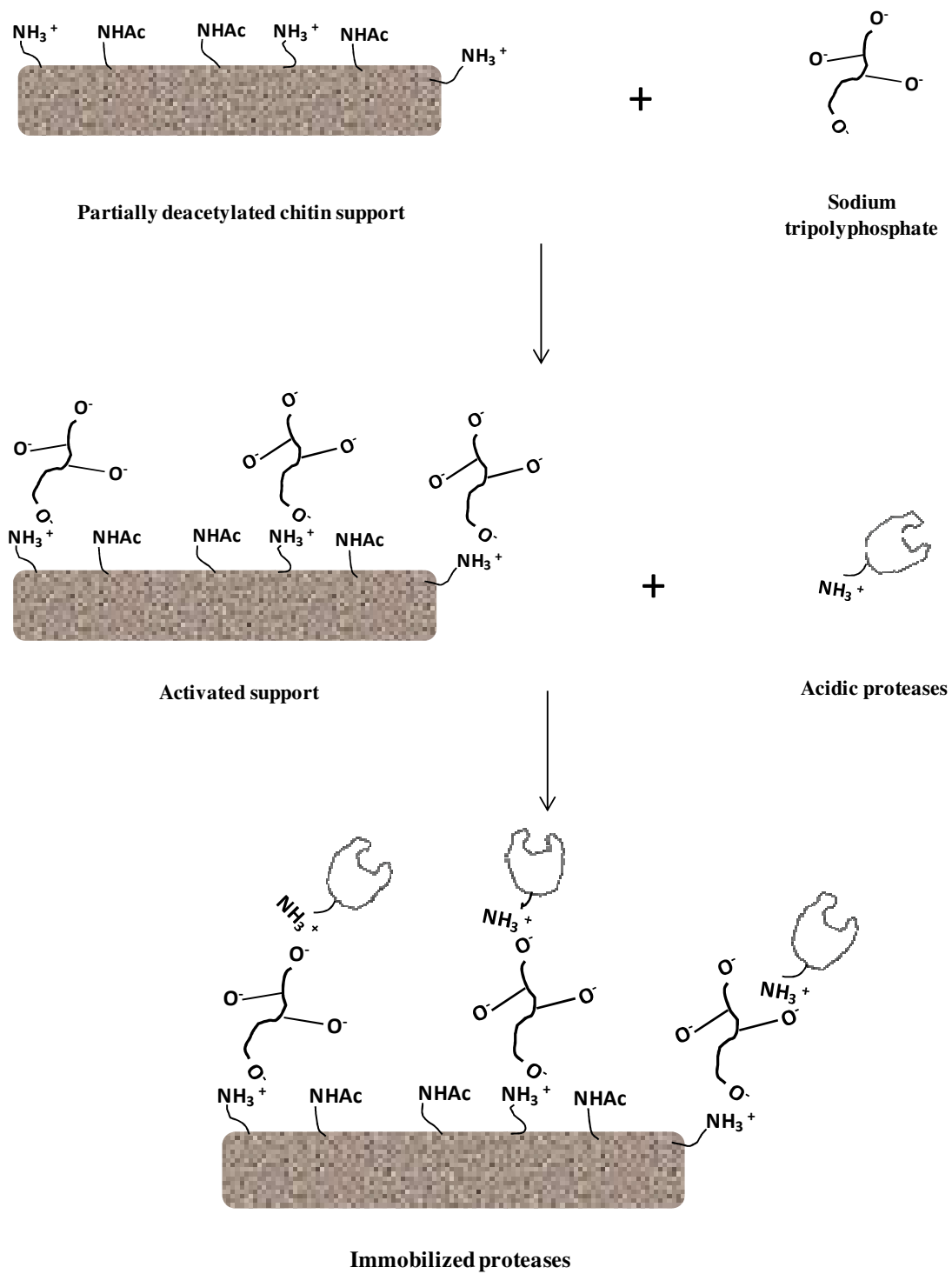


Figure 1. Schematic illustration of sardine acidic proteases immobilization on partially deacetylated chitin crosslinked with sodium tripolyphosphate.

Table 1. Selecting the immobilization conditions of sardine proteases on partially deacetylated chitin flakes.

STPP concentration (%)	Enzyme loading (mg/mL)	Immobilization pH	Activity supernatant (U)^a	Retained activity (%)^a
Variation of STPP concentration				
0.1	0.06	3	183 ± 8.1	33.8 ± 4.2
1	0.06	3	108 ± 7.9	52.4 ± 6
2	0.06	3	106 ± 7.3	36.4 ± 2.9
3	0.06	3	109 ± 9.6	33.2 ± 0.79
4	0.06	3	126 ± 1.6	21.7 ± 1.75
Variation of enzyme loading				
1	0.03	3	45 ± 5.4	26.1 ± 0.57
1	0.06	3	94 ± 8.3	50.5 ± 3.9
1	0.11	3	284 ± 3.9	59 ± 4.3
1	0.3	3	762 ± 2	57.2 ± 3.5
Variation of immobilization pH				
1	0.06	2	508 ± 3.4	0.95 ± 0.1
1	0.06	3	104 ± 8.1	51.4 ± 6
1	0.06	4	478 ± 3.3	14.1 ± 0.5
1	0.06	5	475 ± 3.6	11.5 ± 0.2
1	0.06	6	464 ± 3.9	8.7 ± 0.7

^a Values are means ± standard deviation of three replicates

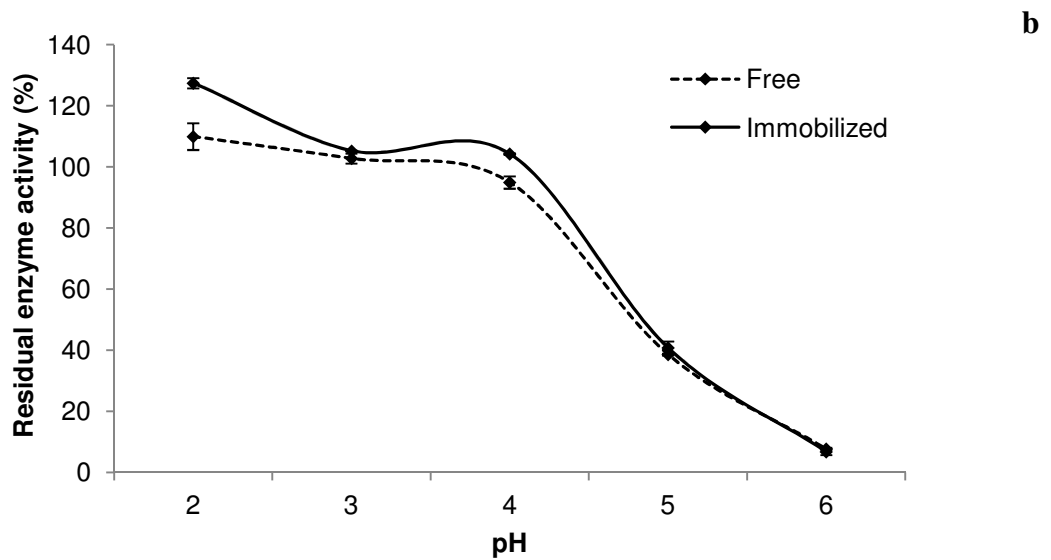
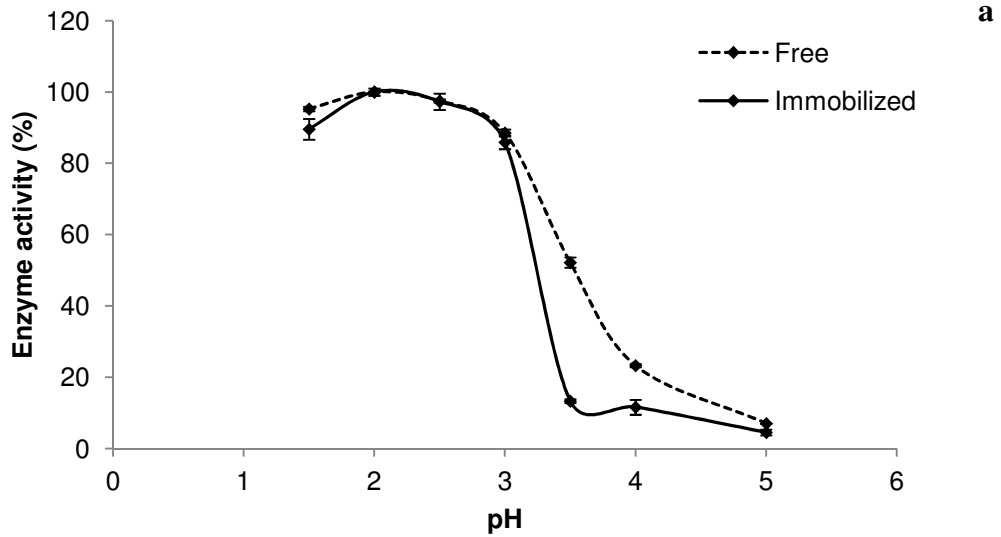


Figure 2. Effect of immobilization on pH optima (a) and stability (b) of acidic sardine proteases

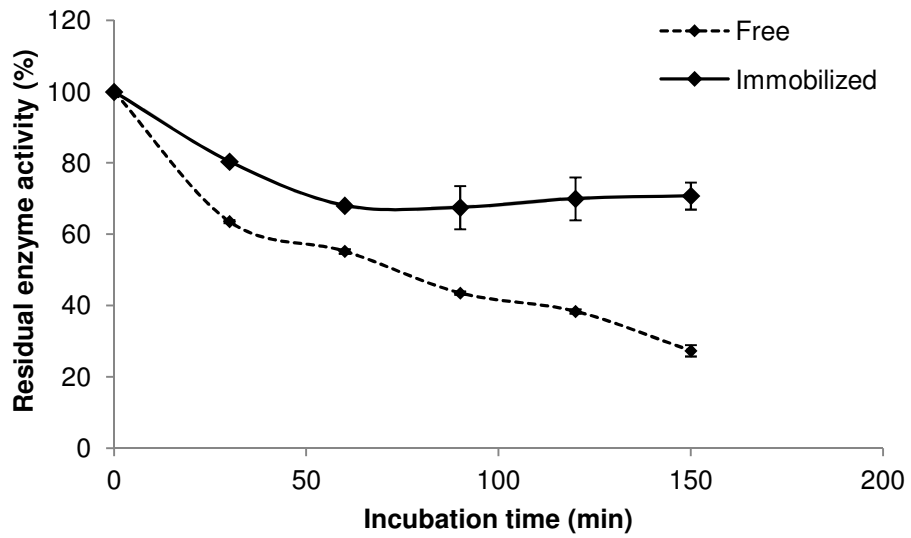
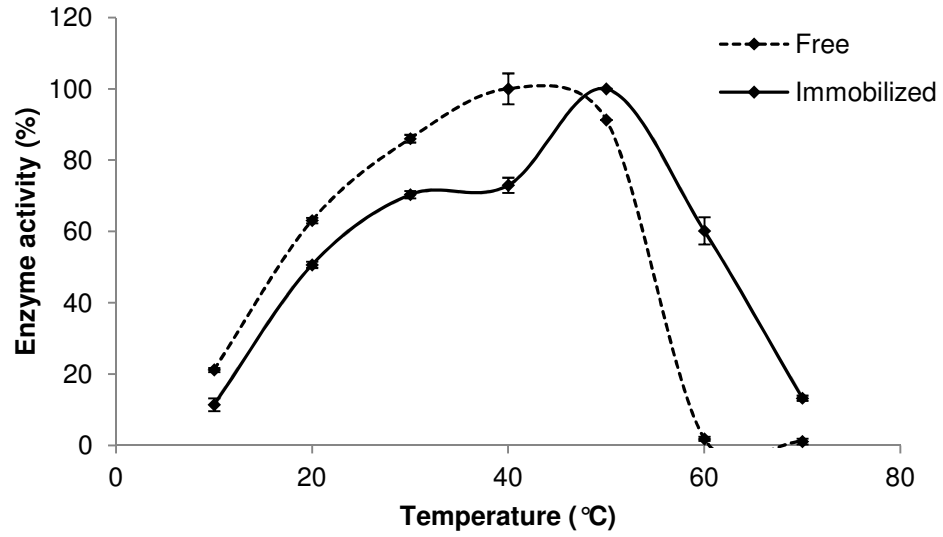


Figure 3. Effect of immobilization on optimum temperature (a) and stability at 50°C (b) of acidic sardine proteases

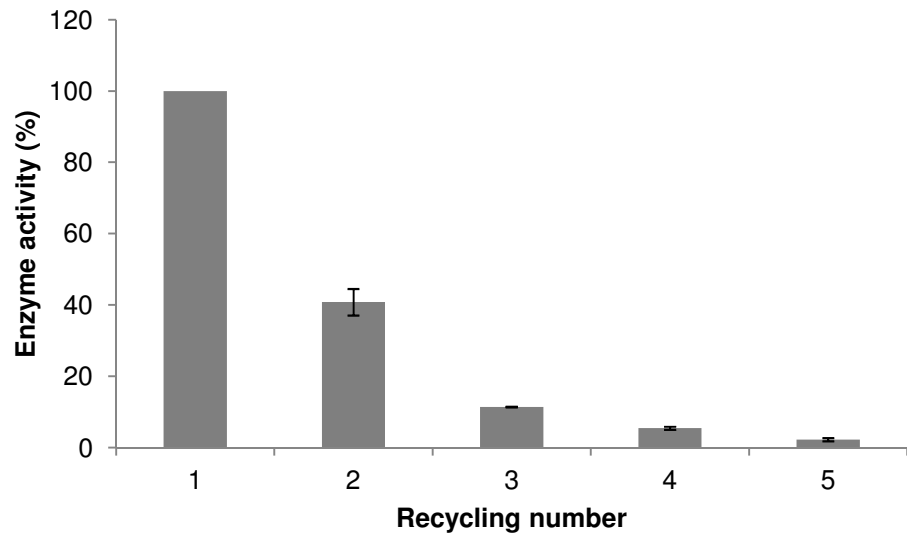
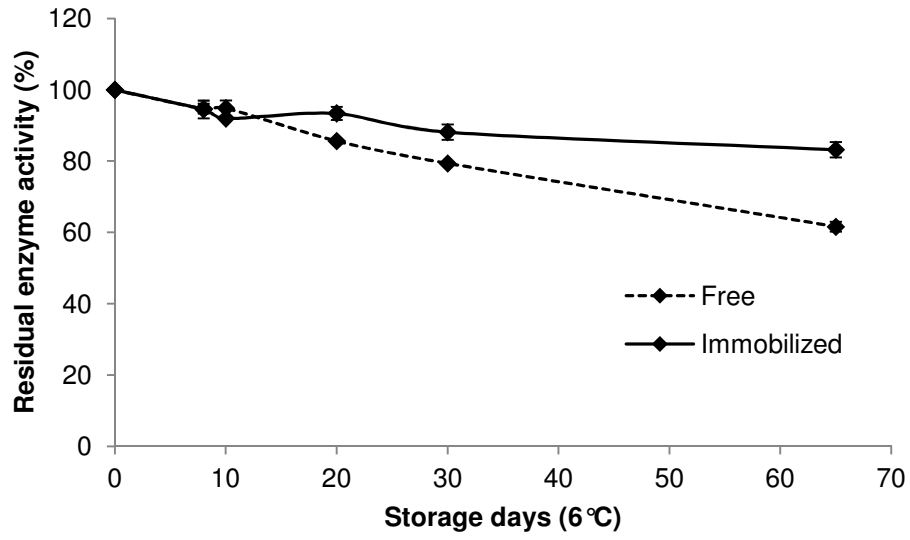


Figure 4. Reusability of acidic sardine proteases immobilized on partially deacetylated chitin flakes

a



b

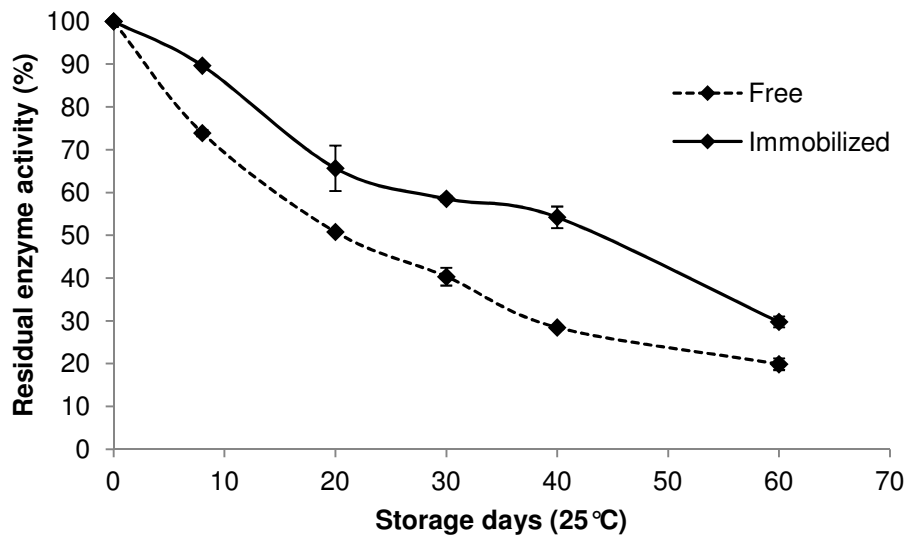


Figure 5. Storage stability of free and immobilized sardine acidic proteases at 6°C (a) and 25°C (b).

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

Integrando los resultados de las diferentes etapas experimentales de esta investigación se puede concluir que a partir de dos subproductos de la pesca tales como las vísceras de sardina Monterey y cabezas de camarón, es posible obtener un sistema biocatalítico inmovilizado. Asimismo, se demostró que la inmovilización de proteasas ácidas aisladas de sardina Monterey es una estrategia útil para aumentar la estabilidad bioquímica y operacional de estas enzimas. Las proteasas inmovilizadas en quitina parcialmente desacetilada activada con tripolifosfato de sodio presentaron una mayor estabilidad térmica y a pH ácido que su contraparte soluble, por lo que se potencializa su posibilidad de aplicación en procesos industriales donde se requieren este tipo de condiciones. Con lo anterior, se demostró la validez de la hipótesis que sustentó al presente estudio, cumpliéndose además con los objetivos planteados en esta investigación.

Resulta necesario llevar a cabo estudios relacionados con la aplicación del sistema biocatalítico inmovilizado utilizando como modelo algún proceso de la industria alimentaria, como puede ser la clarificación enzimática de bebidas o la coagulación enzimática de la leche.

Se recomienda realizar estudios relacionados con el mejoramiento de la inmovilización de proteasas ácidas de sardina siguiendo estrategias como la utilización de soluciones activadoras del soporte que permitan la inmovilización covalente de las proteasas, lo cual podría eventualmente mejorar la estabilidad operacional del sistema catalítico.

Es importante efectuar investigaciones encaminadas hacia el uso de soportes de quitina y quitosano en escala “micro” o “nano” ya que debido a la gran área superficial de estos materiales es posible maximizar la unión de las enzimas a este tipo de soportes y además mejorar la difusión de sustratos y productos.