



Purificación y caracterización preliminar de proteasas del látex de *Vasconcellea candicans* (A. Gray) A. DC (Mito)

Purification and preliminary characterization of latex proteases of *Vasconcellea candicans* (A. Gray) A. DC (Mito)

Ana I. F. Gutiérrez*; Oscar Nolasco; Carlos Santa Cruz

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular – Facultad de Ciencias Naturales y Matemática (FCCNM) – Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima – Perú.

Received September 10, 2016. Accepted March 05, 2017.

Resumen

Estudios preliminares indican que, el látex fresco del “Mito” tiene una actividad específica de papaína de 1,84 veces mayor a la encontrada en el látex de papaya, por lo que el objetivo de este trabajo fue purificar y caracterizar las proteasas del látex fresco del “Mito” que tuvieran actividad de papaína. El extracto crudo de proteasas se obtuvo a partir del látex de “Mito” el cual fue resuspendido (1:1) en buffer acetato de Na 10 mM a pH 5,0; inmediatamente se precipitaron proteínas a pH 9,0 y luego con sulfato de amonio al 45%. Posteriormente se purificó en una columna de Sephadex G-100 y se obtuvieron tres fracciones: A, B y C; utilizando como sustrato caseína se midió la actividad enzimática específica (AEE). Se encontró que para la Fracción A la AEE fue de 87,74 nkat.mg⁻¹proteína, para la Fracción B fue de 14,93 nkat.mg⁻¹proteína y para la Fracción C fue de 16,13 nkat.mg⁻¹proteína. La AEE de la fracción A frente a la de papaína de látex fresco de *C. papaya* fue 13,3 veces mayor. En el análisis electroforético (gel desnaturante, 12%) se observa para la fracción A dos bandas de proteínas teniendo una de ellas una “relación de frente” semejante al estándar de papaína. Además, se observó que la fracción A (papaína de “Mito”) frente a diferentes concentraciones de caseína, usada como sustrato, presenta una curva sigmoidea michaeliana; a diferentes volúmenes de enzima se muestra un comportamiento lineal; tiene un pH óptimo a 7,5 y es activa hasta 60 °C.

Palabras clave: Lomas de Perú; papaya silvestre; látex; papaína; *Vasconcellea candicans* (A. Gray).

Abstract

Preliminary studies indicate that, the "Mito" fresh latex, has a specific activity of papain from 1.84 times greater than that found in the latex of papaya, so the objective of this study was to purify and characterize "Mito" fresh latex proteases that have activity of papain. The crude extract protease was obtained from the "Mito" latex which was re-suspended (1:1) in 10 mM Na acetate buffer at pH 5.0; immediately proteins were precipitated at pH 9.0 and then with 45% ammonium sulfate. Subsequently, the proteins were purified on a Sephadex G-100 column and were three fractions: A, B and C. Using as a substrate casein, the enzymatic specific activity (ESA) was measured and was found to be the fraction A was 87.74 nkat.mg⁻¹protein, for fraction B was 14.93 nkat.mg⁻¹protein and for fraction C it was 16.13 nkat.mg⁻¹protein. ESA of fraction A against papain of fresh latex of *C. papaya* was 13.3 times greater. Electrophoretic analysis (12% denaturant gel) shows for A fraction, two protein bands having one of them a relation similar to the papain standard. In addition, there was observed that the A fraction (papain of "Mito") against different concentrations of casein, used as a substrate, displays a michaeliane sigmoid curve; different volumes of enzyme shows a linear behavior; it has an optimum pH of 7.5 and is active up to 60 °C.

Keywords: Hills of Peru; wild papaya; latex; papain; *Vasconcellea candicans* (A. Gray).

1. Introducción

Los dos géneros económicamente más importantes de la familia Caricaceae son

Carica y *Vasconcellea*, antiguamente se encuentran clasificadas en el género Carica; sin embargo, estudios genéticos y

* Corresponding author
E-mail: anaisabelflor@gmail.com (A. Gutiérrez).

filogenéticos a secuencias de ITS y plastidios (Kyndt *et al.*, 2005) han mostrado una clara separación entre *Carica papaya* L. y las 21 especies de *Vasconcellea*, lo que confirma su clasificación en dos géneros separados (Badillo, 2000).

La familia Caricaceae presenta especies con laticíferos articulados que contienen un látex lechoso (Hegnauer, 1964), que son fuente tradicional de enzimas proteolíticas que son ampliamente utilizados en la industria (Malek *et al.*, 2016). Badillo (2000) menciona que un 30% de proteínas corresponden a cisteína proteasas, las cuales están en una alta concentración molar, superior a 1 mM (Oberg *et al.*, 1998).

Azarkan *et al.* (2003) indican que el látex de *C. papaya* L. es una fuente rica de las cisteínas endopeptidasas, incluyendo la papaína (EC 3.4.22.2), glicil-endopeptidasa (O papaya proteinasa IV; EC 3.4.22.25), quimopapaína (EC 3.4.22.6) y caricaína (anteriormente conocida como proteinasa W (EC 3.4.22.30) y que constituyen más del 80% de la fracción enzimática del látex.

La papaína (EC 3.4.22.2) es un constituyente menor (5-8%) entre las endopeptidasas del látex de papaya (Barret *et al.*, 1998; Azarkan *et al.*, 2003), sin embargo, presenta una extensiva actividad proteolítica hacia proteínas, péptidos, ésteres de aminoácidos y amidas y es aplicada en el campo de medicina e industria (Uhlig, 1998; Chaplin, 2002), por lo que los constituyentes del látex de *C. papaya* se han investigado a fondo desde el pasado (Drenth *et al.*, 1968; Mitchell *et al.*, 1970).

Aunque en el género *Vasconcellea*, el látex crudo de *V. heilbornii* ‘babaco’ ha revelado una equivalente actividad proteolítica y lipolítica (Dhuique-Mayer *et al.*, 2001), algunos estudios en *V. stipulata* y algunos genotipos de *V. heilbornii* babaco, y *V. cundinamarcensis*, han reportado entre 4 a 13 veces más actividad proteolítica (Scheldeman *et al.*, 2002). Sin embargo, hasta ahora, sólo el látex de *V.*

cundinamarcensis se ha estudiado en detalle (Baeza *et al.*, 1990; Walraevens *et al.*, 1993; Pereira *et al.*, 2001).

En las lomas de Perú existe un miembro de este género, *Vasconcellea candicans* (A. Gray) A. DC 1864 (Mito), un arbusto característico (Mendoza y Eusebio, 1995) que tiene importancia ecológica como captador de neblina, productor primario junto con el estrato arbustivo-arbóreo, así como también es hábitat y nicho ecológico de organismos importantes, para mantener el ciclo de materia y energía (Cuya-Matos, 1992).

El “mito” es una papaya silvestre que se encuentra en peligro de extinción, el fruto es de sabor agradable, aromático, que se consume en forma natural o soasada, en bebidas y mermeladas, atribuyéndole propiedades nutritivas. Se le usa como digestivo y el látex sirve para el tratamiento de la Leishmaniasis (Uta) y Bartonellosis (Verruga) (Soukup, 1970; Brack, 1999; de Feo *et al.*, 1999).

En un estudio preliminar (Gutiérrez y Santa Cruz, 2016) demostramos que la actividad enzimática específica de proteasa (papaína), del látex de *V. candicans* es 1,84 veces superior a la de *C. papaya*, cuando es semipurificada y guardada en buffer acetato a pH 7; por lo que el objetivo de este estudio fue purificar y caracterizar la enzima proteasa (papaína) del látex de los frutos de *V. candicans*.

2. Materiales y métodos

Muestra

De una planta de *Vasconcellea candicans* (A. Gray) A. DC (mito) se obtuvieron ocho frutos con madurez fisiológica (peso, tamaño), pero no madurez organoléptica, para la extracción del látex y su posterior purificación de proteasas y caracterización de las proteasas mayoritarias.

Extracción del látex *Vasconcellea candicans*

Cada fruto (mito) fue desinfectado con lejía (1%), enjuagado con agua potable (estéril) y secado. Luego se estimó el peso

fresco (g), con una balanza analítica (Ohaus, AP210-0, USA) y se extrajo el látex el cual se pesó (g), para cada fruto, según la técnica mencionada por Nitsawang *et al.* (2006).

Purificación de las proteasas desde el látex con precipitación por sales

Utilizando el método modificado de Baines y Brocklehurst (1978) modificado por Monti *et al.* (2000), se procedió de la siguiente manera: Se disolvieron 5,0 g de látex estabilizados con EDTA (1mM pH7) y con buffer acetato de sodio (10 mM a pH5.0) 1:1 w/v, hasta tener un pH 5 teniendo un volumen de 10 mL (M1). La solución de látex M1 fue ajustada hasta pH 9,0 agregándole granallas de NaOH (221465 Sigma-Aldrich), en agitación (agitador magnético Labor MRM LE302, Bulgaria). Se dejó reposar 10 min en refrigeración a 4 °C (refrigeradora Bosch, KAN60, Alemania) y luego se centrifugó a 3000 g x 15 min a 4 °C (centrifuga IEC HN-SII, USA), se obtuvo 5,0 mL de sobrenadante (M2) y se descartó el precipitado. Posteriormente al M2 se le llevo a una saturación del 45% con (NH₄)₂SO₄ (A4418 Sigma), el cual fue agregado lentamente y en agitación por 30 min. Se dejó en reposo a 4 °C por 14 horas y luego se centrifugó a 3000 g x 15min a 4 °C. Al precipitado se le llamo Extracto Crudo (EC) y fue desalinizado a través de un filtro Millipore (MWC0 10,000), lavándolo y concentrándolo con el buffer acetato sodio (10 mM) más acetato de calcio (5 mM) a pH 7,5 a 37 °C, para lo cual se centrifugó a 3000 g x 15 min por 2 veces consecutivas obteniéndose un volumen final de 3,5 mL, luego el extracto se pasó por la columna de Sephadex G-100. A todas las muestras generadas se les cuantifico la concentración de proteínas totales (método de Microlowry) cuya absorbancia de la solución de color se leyó en un espectrofotómetro ((Shimadzu, UV-1700, Japan), a 700 nm. La concentración de proteína se determinó a partir de una curva de calibración, utilizando BSA (A9647 Sigma-Aldrich).

Preparación de las proteasas por cromatografía de Sephadex-G100

Se utilizó el método de Robinson (1975) modificado por Baines y Brocklehurst (1978). Se preparó una columna Sephadex G-100 (G100120 Sigma) de 21,0 x 2,0 cm, con los siguientes factores de elución: volumen vacío (V₀) = 24,5 mL; volumen total (V_t) = 99,5 mL; volumen de retención (V_r) = 71,5 mL; K_{av} = V_r - V₀ / V_t - V₀ = 47 / 75 = 0,62 mL. Estos factores fueron determinados a un flujo de 1,0 mL/min. El intervalo de fraccionamiento de esta columna para proteínas globulares está entre los pesos moleculares PM: 4000 - 150000 daltons. El EC fue aplicado a la columna pre-equilibrada con el buffer acetato de sodio (10 mM, pH 5) que contenía EDTA (1mM) (E4884 Sigma-Aldrich) y cuyos eluatos de 2,5 ml/min fueron colectados (volumen total 200 ml). A cada eluato colectado se le midió la absorbancia en espectrofotómetro (Shimadzu, UV-1700, Japan), A₂₈₀ nm y se calculó la concentración de proteínas según la fórmula $y = 0,0078 \cdot X$ que fue obtenida de la curva de calibración utilizando albúmina de suero bovino (BSA A9647-Sigma).

Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis desnaturante se desarrolló según el método de Laemmli (1970) utilizando un gel de separación de 12% y un gel de apilamiento al 4% de poliacrilamida y a una corriente constante de 200V y 24 mA. La cantidad de muestra utilizada fue un equivalente de 40 µg de proteínas denaturadas con 2-mercapto-etanol (5%) (M7154 Sigma) y SDS (4%) (436143 Sigma-Aldrich) sobre agua hirviendo durante 60 s. Los geles fueron teñidos con Coomassie-Azul R-250 (0,1%) (Merck). Como estándar de peso molecular se usó una solución de papaína de látex de papaya (PM: 21 kDa) (Sigma P3125).

Ensayo enzimático de proteasa

Se utilizó el protocolo de Sigma (1999). El ensayo utilizó 455 µL de Buffer-Sustrato que fue caseína al 0,65% (p/v) (C3400 Sigma) en buffer fosfato de potasio (50

mM, pH 7,5 a 37 °C), al cual se le adicionó 50 µL de la muestra y se incubó a 37 °C por 10 min. La reacción fue detenida con 455 µl de ácido tricloroacético (110 mM) (Merck) y el sistema siguió en incubación por otros 30 min. Cada reacción tuvo su control negativo al cual se le adicionó la enzima después del tricloroacético.

Los productos de la reacción fueron separados en una centrifuga refrigera a 9000 g por 3 min a 4 °C (Hettich, Mikro 200R, Germany). A 625 µl del sobrenadante se le adicionaron 1570 µl de carbonato de sodio (500 mM) (223484 Sigma-Aldrich) y 250 µl del reactivo de Folin & Ciocalteu's (47641 Sigma) y se midió la absorbancia a 660 nm. Para estimar la actividad enzimática se utilizó la siguiente formula $y = 0,001 \cdot x + 0,0211$, la cual se obtuvo de la curva patrón de L-Tirosina (1,1 mM) (T4321 Sigma). La Actividad Enzimática (AE) se definió como la cantidad de enzima que hidroliza caseína y produce un color cuya absorbancia equivalente a 1 µmol (181 µg) de L-Tirosina por minuto a pH 7,5 y 37 °C (con reactivo de color Folin & Ciocalteu's). Nuestros resultados fueron convertidos a la unidad katal, sabiendo que 1katal equivale a 60×10^6 unidades de actividad enzimática (AE). La Actividad Enzimática Específica (AEE) se obtuvo relacionando la AE/mg proteína.

Estudio de la cinética

EL Km y Vmax fue determinada por la gráfica de Lineweaver-Burk, considerando seis concentraciones de caseína entre 0,65 a 6,5 mg. La temperatura óptima fue determinada incubando la mezcla de la reacción a diferentes temperaturas, con rango desde 9 °C hasta 45 °C. El pH óptimo fue medido usando los siguientes buffers: buffer de acetato de sodio de pH 5,6; buffer fosfato de potasio de pH 7,5; buffer Tris-HCl de pH 8,8 y buffer Glicina de pH 9,5.

El efecto de la concentración de la Enzima purificada fue medido utilizando diferentes volúmenes de enzima que equivalen desde 7,12 a 35,6 µg de proteína.

Para medir el efecto de iones se utilizaron: calcio desde CaCl₂ a concentraciones de 2,5 a 15,0 µM y fósforo inorgánico desde H₂PO₄ desde 1,3 a 9,1 µM.

Diseño experimental y análisis de datos

Para seguir los pasos de purificación y caracterización de las proteasas con actividad enzimática, se tuvo como variables la concentración de proteínas y la actividad de la papaína, las cuales fueron evaluadas por triplicado en cada fracción y en cada paso de purificación. Se utilizó ANOVA de una vía usando SPSS v19 para evaluar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos. Para comparar las medias se aplicó el estadístico de Tukey y para establecer el efecto entre las variables se utilizó la Correlación de Pearson.

3. Resultados y discusión

Las características biométricas de los frutos de "mito" colectados para esta investigación tuvieron: Peso $\bar{x} = 149,8 \pm 38,99$ g, longitud $\bar{x} = 12,37 \pm 1,56$ cm y el látex colectado $\bar{x} = 0,827 \pm 0,14$ g/fruto.

Análisis de las proteínas

El látex colectado de "mito" fue procesado según descrito en la sección anterior, determinándose la concentración de proteínas durante la purificación (Figura 1).

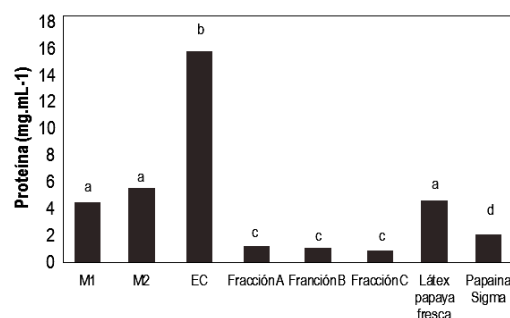


Figura 1. Concentración de proteínas de las diferentes muestras obtenidas en el proceso de purificación de proteasas del látex de *V. candidans*. M1: Látex de mito fresco diluido (1:1 con buffer acetato). M2: Sobrenadante del Látex de mito llevado a pH 9,0. EC: Sobrenadante M2 saturado con sulfato de amonio 45%. Fracciones A, B y C obtenidas en columna Sephadex G-100. Látex de papaya fresca diluida 1:1 con buffer acetato. Papaína sigma. Según Análisis de Tukey, letras diferentes en las barras presentan diferencias estadísticas con $\alpha=0,05$ (7,24 grados de libertad).

Se observa que existen diferencias significativas entre las muestras. La muestra denominada EC proveniente del látex de “mito”, presenta la más alta concentración de proteínas ($15,78 \mu\text{g proteína}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). Estos datos se utilizaron para determinar donde se encontraba la proteína de interés y además la pureza de las fracciones, para lo cual se midió la actividad enzimática específica (AEE) de la papaína relacionando la cantidad de la proteína específica relativa frente a la cantidad de proteínas totales (Ritchie, 2012).

Purificación

El látex de *V. candidans* diluido 1:1 con el buffer acetato 10 mM, pH 5 (M1), mostró una AEE de $12,1 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{proteína}$ y después de llevarlo a pH 9,0 y pasándolo por un filtro Millipore (M2), se observa un aumento de la AEE en 60% ($19,30 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{proteína}$) (Tabla 1), lo cual se debe a que a este pH un gran número de proteínas precipitan, quedando libre un grupo reducido de proteínas, donde la mayoría son cisteínas proteasas, dentro de las cuales está la papaína y sus isoenzimas (Kimmel y Smith, 1954; Gomes *et al.*, 2008).

El EC desalinizado mostro un incremento de AEE frente a M1 de 147% ($29,9 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{proteína}$). Resultados similares obtuvieron Arnon (1970) y Nitsawang *et al.* (2006) quienes precipitaron papaína de *C. papaya* con una saturación de 40% y 45% de sulfato de amonio, respectivamente y observaron el aumento de la actividad de la enzima. Wang *et al.* (2006) demostraron que en las proteínas existe un núcleo hidrofóbico que ayuda a estabilizar su estructura terciaria por interacción hidrofoba, mientras que las superficies polares externas preferentemente interactúan con el medio acuoso exterior. Por lo tanto, al agregarse altas concentraciones de sal, la estructura terciaria y secundaria de proteasas como la papaína se exponen más al solvente, y causa un aumento del número de las interacciones entre los grupos hidrofobos expuestos en la superficie y el solvente (Edwin y Jagannadham, 2000), lo

cual trae como consecuencia la agregación de estas proteasas. Kimmel y Smith (1954), Gomes *et al.* (2008) y Malek *et al.* (2016) postulan que al precipitar y cristalizar estas proteasas se liberan de sus inhibidores (péptidos, iones, otras proteínas etc.), por lo cual incrementan su actividad.

El patrón de elución de la cromatografía en columna de Sephadex G-100 nos indica claramente que se eluyó tres fracciones de proteínas (Figura 2), encontrándose una AEE menor para la Fracción B y C ($14,93$ y $16,13 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{proteína}$, respectivamente), que para la Fracción A ($87,74 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{proteína}$). Nuestros resultados difieren de Kyndt *et al.* (2005) quienes encontraron para *Vasconcella x Heilbornii* (Badillo) Badillo var. *pentagona* (Heilborn) (Caricaceae) que la actividad de sus cisteínas proteasas estaban en el rango de $7,5$ a $23,3 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{proteína}$, la cual comparada con la quimopapaína del látex de papaya ($1,68 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{proteína}$) estaba entre 4,5 a 14 veces más alta. También difieren de la actividad de cisteína proteasas de *V. cundinamarcensis* ($14,2 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{proteína}$) reportada por Gravina *et al.* (1994). Sin embargo, es comparable con la actividad de cisteína proteasa ($84 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{proteína}$) reportada para *V. cundinamarcensis* por Pereira *et al.* (2001).

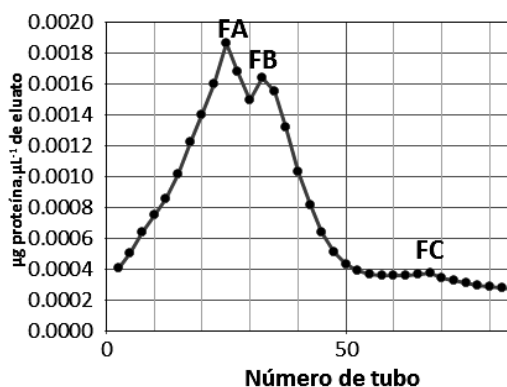


Figura 2. Cromatografía en columna con Sephadex G-100 desde EC del látex de *Vasconcella candidans* (A. Gray) A. DC 1864 (Mito): Columna 21,0 x 2,0 cm, buffer acetato 50 mM, pH 5,6; promedio de flujo: $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Se muestra la concentración de proteína ($A_{280\text{nm}}$) de cada eluato.

Tabla 1Purificación de proteasas de látex de *Vasconcellea candicans* (mito)

Etapas/Muestras (*)	Volumen (mL)	AE (nkat/mL)	Proteína (mg/mL)	AE Total (nkat)	Proteína Total (mg)	AEE (nkat/mg-proteína)	Purificación	Rendimiento (%)
1. Látex (M1)	10,00	55,30	4,47	553,05	45,70	12,10	1,00	100,00
2. Látex M2	5,00	107,52	5,57	537,59	27,85	19,30	1,60	97,21
3. EC	0,70	471,77	15,78	330,24	11,05	29,90	2,47	59,71
4. Fracción A	0,50	106,17	1,21	53,08	0,61	87,74	7,25	9,60
Fracción B	0,40	16,72	1,12	6,7	0,45	14,93		
Fracción C	0,50	14,03	0,87	7,0	0,44	16,13		
Papaína (látex de papaya)	5,00	23,81	3,62	119,1	18,10	6,58		
Papaína (estándar)	1,00	51,69	2,08	51,7	2,08	24,85		

(*) M1=Látex 1:1 con buffer acetato 10 mM pH 5 (3000 x g sobrenadante látex). 2) M2= Látex soluble: Se llevó a pH 9.0 (3000 x g sobrenadante látex). 3) EC.= Fraccionamiento con sulfato de amonio al 45%. Lavado y concentrado con Filtro Millipore. 4) Fracción A (Cromatografía Gel de filtración Sephadex G-100, concentrado con Filtro Millipore). Fracción B (Cromatografía Gel de filtración Sephadex G-100). Fracción C (Cromatografía Gel de filtración Sephadex G-100). Papaína, Látex de papaya (1:1) con buffer acetato 10 mM pH 5 (3000 x g sobrenadante látex). Papaína de papaya (Sigma P3125).

Electroforesis en gel de poliacrilamida (12%) con SDS

El análisis de SDS/PAGE al 12% (Figura 3) a través de Quantity One 1-D de las fracciones obtenidas en la purificación con Sephadex G-100, corresponde al estándar de papaína de látex papaya (P3125) con un peso molecular de 21,0 kDa (carril 1). En M2 se encuentran tres bandas cuyos Rf son 1,69, 1,75 y 1,91 (carril 2). En M1 se observan cuatro bandas con un Rf de 1,28, 1,39, 2,41 y 2,62 (carril 3). En la Fracción C, no se observó ninguna banda a la concentración de proteínas usada (carril 4). En la Fracción B se encuentran dos bandas con Rf 1,72 y de 1,88 (carril 5). En la Fracción A se visualizan dos bandas con Rf 2,13 y 2,46 (carril 6). Probablemente estas bandas de la Fracción A y B podrían corresponder a la papaína, la quimopapaína, cariana, quitinasa y/o péptidos inhibidores, las cuales han sido observadas por Kimmel y Smith (1954), Baines y Brocklehurst (1979) y Nitsawang *et al.* (2006). La separación de cuatro proteasas y no de una sola puede deberse a que no se realizó el ajuste de proteínas del extracto del látex a 65 mg/mL antes del fraccionamiento de sal, como lo sugieren Baines y Brocklehurst (1979).

La Fracción A, papaína de “mito”, muestra una banda muy nítida a nivel del estándar de papaína de Sigma (Figura 3A, 3B) y

según el Rf tiene una masa molecular de 21,0 kDa, dato semejante al obtenido por Monti *et al.* (2000) al purificar papaína de *C. papaya* en una columna de Sephadex G75.

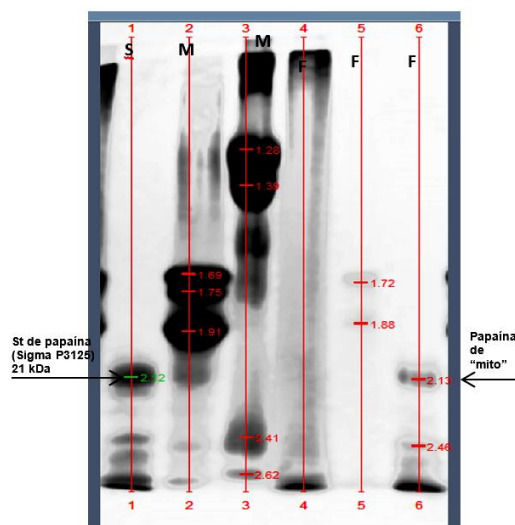


Figura 3. Electroforesis de gel de poliacrilamida desnaturalante al 12%. Muestras de la purificación de papaína de *V. candicans*, frente a las Fracciones A, B, C y a papaína de látex de papaya (Sigma P3125).

Estos resultados concuerdan con otras investigaciones donde al purificar papaína de papaya encontraron diferentes bandas de proteínas como 27 kDa, 30 kDa, 33 kDa (Kyndt *et al.*, 2005), papaína 23 kDa y quimopapaína 27 kDa (Arnon, 1970),

caricain 24 kDa (Dubois *et al.*, 1988), CC-IV 28 kDa (Gravina *et al.*, 1994), CC23 23 kDa (Pereira *et al.*, 2001), CC1b y CMS1MS2 de 22,99 kDa (Walraevens *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2008).

La microheterogeneidad observada durante las etapas de purificación indica que hay múltiples isoformas de las enzimas proteolíticas en el látex de *V. candicans*, lo cual también fue reportado para *V. heilbornii* (Badillo, 2000) y para *V. cundinamarcensis* (Walraevens *et al.*, 1999). Además, sugiere que en cada paso de la purificación las proteasas se separan de otras proteínas y/o impurezas que estarían interfiriendo con su actividad (Kynndt *et al.*, 2005).

Estudio cinético de la Fracción A (papaína) de *V. candicans*

La Actividad Enzimática Específica (AEE) se expresó en la unidad $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{proteína}$. Los parámetros cinéticos para la Fracción A (papaína de "mito") fueron calculados con el diagrama de Lineweaver-Burk que utiliza el recíproco de la cinética de Michaelis-Menten, observándose un comportamiento michaeliano para el sustrato caseína.

En la Figura 4A se muestra las inversas de $[S]$ vs velocidad según Lineweaver -Burk y determinamos que para la Fracción A (papaína) del látex de *V. candicans* frente al sustrato caseína, tiene una $V_{\text{máx}}$ de

165,3 $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{proteína}$ y K_m de 2,02 mg/mL , respectivamente.

Efecto de la Fracción A (papaína) de látex de *V. candicans* frente a su AEE

En la Figura 4B se muestra como la actividad enzimática aumenta en forma directamente proporcional a la cantidad de enzima (expresada como proteína). No mostrando saturación para la cantidad de enzima máxima utilizada.

Efecto de pH sobre la Fracción A de látex de *V. candicans*

La Figura 5A nos indica que para (caseína al 0,65% (p/v) y en buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,5 se obtiene la mayor actividad enzimática. Además, se observa que para el sustrato a pH ácido (pH 5,6) hay una disminución de la actividad en 12%, mientras que a pH alcalino (pH 8,8 y 9,5) disminuye en 40,6% y 60%. Lo cual podría deberse a que en buffer fosfato a pH 7,5 y acetato pH 5,6 habría una mejor interacción de iones con el sitio catalítico, mientras que a pH muy alcalino habría una pérdida de interacción con iones y agua, (Pinazo *et al.*, 2005). Resultados similares fueron obtenidos para papaína de papaya utilizando caseína a pH 7,0 por otros investigadores (Smith *et al.*, 1958, Chu chi Ming *et al.*, 2002, Ding *et al.*, 2003; Omeje *et al.*, 2014).

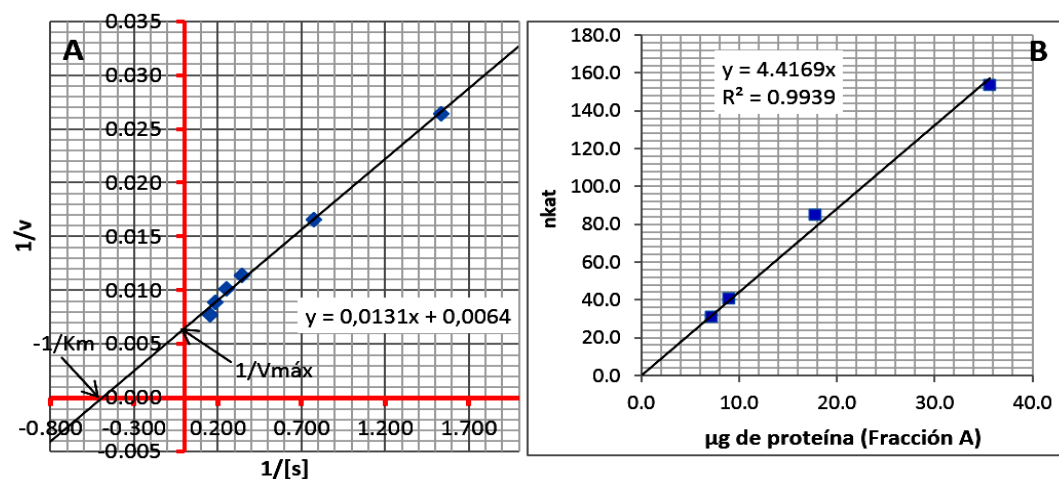


Figura 4. Determinación de $V_{\text{máx}}$, K_m y efecto del volumen de la fracción A (papaína) de látex de *V. candicans*. **A)** Determinación de $V_{\text{máx}}$ y K_m , utilizando la gráfica de Lineweaver -Burk **B)** AEE vs. μg de proteínas de la fracción A vs velocidad.

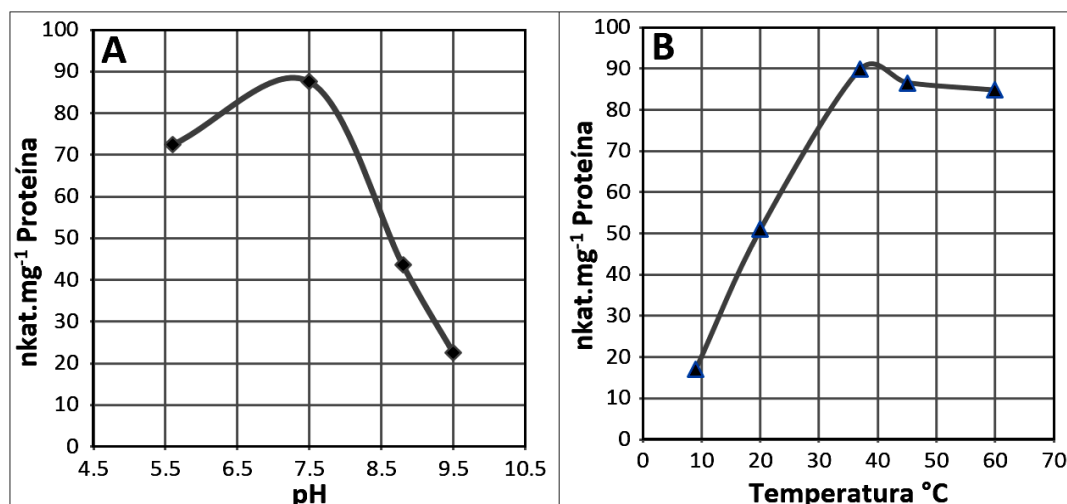


Figura 5. Actividad Enzimática Específica (AEE) la Fracción del látex de *V. candidans*: **A)** AEE vs. Frente a diferentes pH. **B)** AEE vs. Frente a diferentes temperaturas.

Efecto de temperatura

La Figura 5B nos muestra que la actividad de la enzima se obtiene desde los 37 °C, y se mantiene hasta los 60 °C. Estos resultados concuerdan con los de Schechter y Berger (1968) quienes reportaron que la papaína de papaya era termófila. Summer *et al.* (1993) afirman que la papaína de papaya comienza a perder actividad a partir de 55,8 °C, difiriendo de Harton *et al.* (2002) para quienes la papaína de papaya tiene una temperatura óptima en el intervalo de 65 a 80 °C.

Al respecto, Gul *et al.* (2006) sugieren que la eficacia de papaína a temperaturas altas y a valores de pH alrededor de 6,0, tendría una alta probabilidad de que su estado de transición en estas condiciones este bien organizado, dado que el componente tiolato (Cis-S⁻) y el componente Imidazol (His-Im⁺) del sitio catalítico están orientadas correctamente para actuar como donante nucleófilo y formar un par iónico.

Efecto de iones de calcio y fósforo inorgánico sobre la Fracción A (papaína) de látex de *V. candidans*.

En la Figura 6 se puede apreciar que la AEE de la Fracción A (papaína de mito) aumenta en forma lineal hasta una concentración de Ca de 10 μM, permaneciendo constante hasta 15 μM; mientras que para el fósforo inorgánico esta AEE aumenta

hasta una concentración de Pi de 3,25 μM y empieza a decrecer hasta 14% (9,1 μM), pero no en forma significativa ($p < 0,05$).

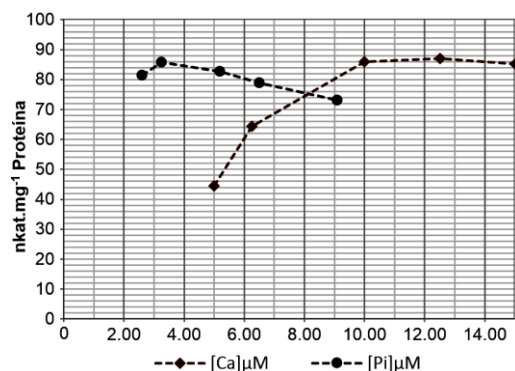


Figura 6. Comportamiento cinético de la Fracción A (papaína) de látex de *V. candidans*: **---♦---** AEE vs. [Ca]; **---●---** AEE vs. [Pi].

Se conoce que una amplia variedad de iones metálicos inhibe la actividad de las enzimas, pero la función más importante de estos iones metálicos es mejorar la actividad de las enzimas y su estabilidad (Menger *et al.*, 1996).

La inhibición de la enzima papaína de *C. papaya* por metales fue estudiada por Kaul *et al.* (2002), quienes encuentran que la enzima se inhibe en 50% cuando está presente en una concentración de 20 a 60 μg el fósforo y una total inhibición al utilizar 80 μg de Pi. Los mismos autores al evaluar la actividad de la papaína frente a calcio y magnesio, encuentran que estos

son activadores de AEE de la enzima y en el caso del calcio esta actividad fue hasta 18% con una concentración de calcio de 1×10^{-3} M, lo cual no concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que se obtuvo la máxima actividad a una concentración de calcio de $12,5 \times 10^{-6}$ M. Sin embargo, se observa que conforme la concentración de calcio aumenta la actividad de la enzima también aumenta.

4. Conclusiones

Se obtuvieron tres proteasas con diferente actividad papaína, teniendo la mayor actividad la Fracción que denominamos A. La Fracción A que nosotros llamamos papaína, aislada de “Mito” tiene 3,5 veces más activa que papaína de papaya (Sigma) y 13,3 veces mayor que la papaína del látex fresco de *C. papaya*. La Fracción A (papaína de “Mito”) describe una curva sigmoidea a diferentes concentraciones de sustrato (caseína) y es lineal a diferentes volúmenes de enzimas. La Fracción A describe una buena Actividad Enzimática Específica (AEE) hasta 60 °C, y a pH 7,5 y se activa frente a iones de fósforo inorgánico y de calcio, cuando guardan una proporción de dos. Sin embargo, faltó purificar mayor cantidad de las fracciones para poder seguir haciendo estudios de cristalografía y secuenciamiento, con lo que podríamos confirmar que la Fracción A corresponde a la papaína.

Finalmente, dado que la caracterización de las proteasas está vinculada a su rol como catalizador biológico, se debería estudiar la forma que adopta la proteína, específicamente su sitio activo, ya que ello permitiría conocer más acerca de su función y sus implicaciones en los mecanismos reguladores de la vida; esto se puede obtener primero cristalizando la proteína (Dunn *et al.*, 2013). Además, se deberían estudiar estas proteasas mediante las técnicas de “ionización suave” (MALDI y electrospray) que, en combinación con diversas técnicas de análisis (espectrometría de masas), nos permitan identificar y secuenciar las proteasas aisladas (Obregón

et al., 2007a; 2007b), lo cual podría confirmar que la Fracción A es la papaína de “Mito”.

Agradecimientos

A David Durand V, por su colaboración en la determinación de los Rf de las bandas de proteínas en las fotos de SDS/PAGE.

Referencias bibliográficas

- Arnon, R. 1970. Papain. *Methods Enzymology* 19: 22-44.
- Azarkan, M.; Moussaoui, A.E.; van Wuytswinkel, D.; Dehon G.; Looze Y. 2003. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. *Journal of Chromatography B* 790: 229–238.
- Badillo, V.M. 2000. *Carica L. vs. Vasconcella St. Hil.* (Caricaceae): con la rehabilitación de este último. *Ernstia* 10: 74–79.
- Baeza, G.; Correa, D.; Salas C. 1990. Proteolytic enzymes in *Carica candamarcensis*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 51: 1–9.
- Baines, B.S.; Brocklehurst, K. 1978. A spectrophotometric method for the detection of contaminant chymopapains in preparations of papain. Selective modification of one type of thiol group in the chymopapains by a two-protonic-state reagent. *Biochemical Journal* 173: 345–347.
- Baines, B.S.; Brocklehurst K. 1979. A necessary modification to the preparation of papain from any high-quality latex of *Carica papaya* and evidence for the structural integrity of the enzyme produced by traditional methods. *Biochemical Journal* 177: 541–548.
- Barrett, A.J.; Rawlings, N.D.; Woessner J.F. 1998. Introduction: cysteine peptidases and their clans. In: *Handbook of proteolytic enzymes*. San Diego: Academic Press. 545–66 pp.
- Brack, A. 1999. *Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú*. Descripción física. Lima, Perú. 556 pp.
- Chaplin, M. 2002. Application of proteases in food industries. Disponible en: <http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/proteases.html>
- Chu Chi Ming, A.B.; Duduku, K.; Tie Sing H. 2002. Effects of ionic and non-ionic surfactants on Papain activity. *Borneo Science* 12: 71-77.
- Cuya-Matos, O. 1992. *Carica candicans* (mito): una papaya de zonas áridas que urge revalorar. *Boletín de Lima* 14: 75-80
- de Feo, V.; De Simone, F.; Arroyo, G.A.; Senatore F. 1999. *Carica candicans* Gray (mito), an alimentary resource from Peruvian flora. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3682-3684.
- Dhuique-Mayer, C.; Caro, Y.; Pina, M.; Ruales, J.; Dormier, M.; Graille, J. 2001. Biocatalytic properties of lipase in crude latex from Babaco fruit (*Carica pentagona*). *Biotechnology Letters* 23: 1021–1024.
- Drenth, J.; Jansonius, J.N.; Koekoek, R.; Swen, H.M.; Wolthers, B.G. 1968. Structure of papain. *Nature* 218: 929–932.
- Ding, L.; Yao, Z.; Li, T.; Yue, Q.; Chai, J. 2003. Study on Papain immobilization on a macroporous polymer carrier. *Turkish Journal of Chemistry* 27: 627-637.
- Dubois, T.; Jacquet, A.; Schnek, A.G.; Looze Y. 1988. The thiol proteinases from the latex of *Carica papaya* L. I. Fractionation, purification and preliminary

- characterization. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 369: 733-40.
- Dunn, B.J.; Cane, D.E.; Khosla, C. 2013. Mechanism and specificity of an acyltransferase domain from a modular polyketide synthase. *Biochemistry* 52(11): 1839-1841.
- Edwin, F.; Jagannadham, M.V. 2000. Single disulfide bond reduced papain exists in a compact intermediate state. *Biochimica et Biophysica Acta* 1479: 69-82.
- Gomes, M.T.R.; Teixeira, R.D.; Ribeiro, H. de A.L.; Turchetti, A.P.; Junqueira, C.F.; Lopes, M.T.P.; Nagem, R.A.P. 2008. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of CMSIMS2: a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* latex. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* 64: 492-494.
- Gravina, M.; Termignoni, C.; Salas C. 1994. Biochemical characterization of a new cysteine endopeptidase from *Carica candamarcensis*. *L. Plant Science* 102:11-18.
- Gul, S.; Mellor, G.W.; Thomas, E.W.; Brocklehurst, K. 2006. Temperature-dependences of the kinetics of reactions of papain and actinidin with a series of reactivity probes differing in key molecular recognition features. *Biochemical Journal* 396: 17-21.
- Gutiérrez, R.A.; Santa Cruz, C.C. 2016. Actividad de papaína del látex de *Vasconcellea candicans* (A. Gray) A. DC 1864 "mito". Análisis biométrico del fruto. *The Biologist (Lima)* 14(2): 327-337.
- Harton, M.; Ochs, R.; Scrigueur, E. 2002. *Principle of Biochemistry*. Prentice-Hall Inc. New York. pp. 568-570.
- Hegnauer, R. 1964. *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Band 3 Dicotyledonae: Acanthaceae-Cyrtaceae. pp. 743. Birkhäuser - user Report, Basel und Stuttgart.
- Kaul, P.; Sathish, H. A.; Prakash, V. 2002. Effect of metal ions on structure and activity of papain from *Carica papaya*. *Nahrung* 46: 2-6.
- Kimmel, J.R.; Smith, E.L. 1954. Crystalline papain: preparation, specificity and activation. *Journal of Biological Chemistry* 207: 515-531.
- Kyndt, T.; Van Droogenbroeck, B.; Romeijn-Peters, E.; Romero-Motochi, J.P.; Scheldeman, X.; Goetghebeur, P.; Van Damme, P.; Gheysen, G. 2005. Molecular phylogeny and evolution of Caricaceae based on rDNA internal transcribed spacer (ITS) and chloroplast sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 442-459.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Malek, K.; Norazan, M.; Ramaness, P.; Othman, N.Z.; Malek, R.A.; Aziz, R.; Aladdin, A.; El Enshasy, H. 2016. Cysteine Proteases from *Carica papaya* a key enzyme for many industrial applications: A Review. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 11(2): 11-16.
- Mendoza, A.; Eusebio, L. 1995. Ecología y aspectos sociales de algunas lomas centrales del Perú durante 1991 a 1993. *Boletín de Lima* 16: 9-96.
- Menger, M.; Tuschl, T.; Eckstein, F.; Porschke, D. 1996. Mg²⁺-dependent conformational changes in the hammerhead ribozyme. *Biochemistry* 35: 14710-14716.
- Mitchell, R.E.J.; Chaiken, I.M.; Smith, E.L. 1970. The complete amino acid sequence of papain: additions and corrections. *Journal of Biological Chemistry* 245: 3485-3492.
- Monti, R.; Basilio, C.A.; Trevisan, H.C.; Contiero, J. 2000. Purification of papain from fresh latex of *Carica papaya*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 43: 501-507.
- Nitsawang, S.; Hatti-Kaul, R.; Kanasawuda, P. 2006. Purification of papain from *Carica papaya* latex: aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 1103-1107.
- Oberg, K.A.; Ruyschaert, J.; Azarkan, M.; Smolders, N.; Zerhouni, S.; Wintjens, R.; Amrani, A.; Looze, Y. 1998. Papaya glutamine cyclase, a plant enzyme highly resistant to proteolysis, adopts an all β conformation. *European Journal of Biochemistry* 258: 214-222.
- Obregón, W.D., Trejo, S.A., Liggieri, C.L., Morcelle, R., Hernández, M., Priolo, N.S. 2007a. Desarrollo de un método para detectar la presencia de cistein proteasas en extractos vegetales por medio del análisis de mapas peptídicos por MALDI-TOF". *Memorias del VII Congreso Internacional Biotecnología y Agricultura BIOVEG*, Ciego de Ávila, Cuba.
- Obregón, D., Torres, M.J., López, L., Morcelle, S., Bruno, M., Liggieri, C., Trejo, S. 2007b. Characterization by PMF MALDI-TOF analysis of plant cysteine endopeptidases. *Congreso; 1st. Annual Iberoamerican Proteomics Congress*. Pilar, Bs. As. Argentina.
- Omeje, K.O.; Eze, S.O.; Ozougwu, V.E.O.; Ubani, Ch.S.; Osayi, E.; Onyike, Ch. C.; Chilaka, F.C. 2014. Application of papain from paw paw (*carica papaya*) latex in the Hydrolysis of Tiger Nut (*C. esculentus*) Proteins. *Mitteilungen Klosterneuburg* 64: 1-17.
- Pereira, M.T.; Lopes, M.T.P.; Meira, W.O.; Salas, C.E. 2001. Purification of a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* L. & cloning of a genomic putative fragment coding for this enzyme. *Protein Expression and Purification* 22: 249-257.
- Pinazo, M.O.; Gutiérrez, S.P.; Quequezana, B.M.; Arenas, Ch.C. 2005. Extracción de la papaína de *Carica papaya* var. Arequipensis. *Véritas* 9: 128 - 134.
- Ritchie, C. 2012. *Protein Purification*. Iowa State University, United States. *Mater Methods* 2: 134.
- Robinson, G.W. 1975. Isolation and characterization of papaya peptidase A from commercial chymopapain. *Biochemistry* 14: 3695-3700.
- Schechter, I.; Berger, A. 1968. On the active site of proteases. 3. Mapping the active site of papain; specific peptide inhibitors of papain. *Biochemical, Biophysical Research Communication* 32: 888-902.
- Scheldeman, X.; Van Damme, P.; Romero-Motochi, J.P. 2002. Highland Papayas in Southern Ecuador: need for conservation actions. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 575:199-205.
- Sigma. 1999. *Enzymatic Assay of Protease*. Sigma Quality Control Test Procedure: SSCASE01.001. 4 pp. Disponible en: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/p5459enz.pdf
- Smith, E.L.; Chavre, V.J.; Parker, M.J. 1958. Kinetics of papain action. II. Effect of pH on hydrolysis of three substrates. *J. of Biological Chemistry* 230: 283-93.
- Soukup, J. 1970. *Vocabulario de los Nombres Vulgares de la Flora Peruana*. Edit. Salesiana S.A. Lima, Perú.
- Sumner, I.G.; Harris, G.W.; Taylor, M.A.J.; Pickersgill, R.W.; Owen, A.J.; Goodenough, P.W. 1993. Factors effecting the thermostability of cysteine proteinases from *Carica papaya*. *European Journal of Biochemistry* 214: 129-134.
- Uhlig, H. 1998. *Industrial Enzymes and their Applications* 1st Edition John Wiley and Sons, New York. pp. 454-456.

- Walraevens, V.; Jaziri, M.; Van Beeumen, J.; Schnek, A.G.; Kleinschmidt, T.; Looze, Y. 1993. Isolation and characterization of the cysteine-proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* Hook. *Journal of Biological Chemistry* 374: 501–506.
- Walraevens, V.; Vandermeers-Piret, M.C.; Vandermeers, A.; Gourlet, P.; Robberecht, P. 1999. Isolation and primary structure of the CCI papain-like cysteine proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* Hook. *Journal of Biological Chemistry* 380: 485–488.
- Wang, L.J.; Sun, N.; Terzyan, S.; Zhang, X.J.; Benson, D.R. 2006. A histidine/tryptophan π -stacking interaction stabilizes the heme-independent folding core of microsomal apocytochrome b5 relative to that of mitochondrial apocytochrome b5. *Biochemistry* 45: 13750–13759.