

REPARTO DE PROTEINAS VEGETALES EN SISTEMAS BIFASICOS ACUOSOS

ISOLATION OF VEGETABLES PROTEINS BY PARTITIONING IN AQUEOUS TWO PHASE SYSTEMS

MG Bertoluzzo- SM Bertoluzzo- Rubén Rigatuso- G. Picó

Fac. de Cs. Bioq. y Farm. UNR
Suipacha 531- (2000) Rosario-Argentina
mgbysmb@cablenet.com.ar

En este trabajo se estudian las características del reparto de proteínas de látex de *Ficus carica* (higuera) en sistemas bifásicos acuosos con el objetivo de aplicar esta información al aislamiento y purificación de papaína, una de las más valiosas enzimas del látex, por la multiplicidad de sus aplicaciones. Para ello se prepararon sistemas bifásicos formados por polietilenglicol de peso molecular 4000 y fosfato de potasio en presencia de 4% de NaCl y se reemplazó parte del agua por un homogenado de látex de higuera. Se observó que la papaína, tiene preferencia por la fase rica en fosfato de potasio. El coeficiente de reparto de las proteínas totales resultó ser 0.54 ± 0.02 , y el coeficiente de reparto de la papaína fue de $K_{pap} = 0.60 \pm 0.01$. El rendimiento fue del 63% con un factor de purificación del 1.5.

The aqueous two-phase partitioning method of liquid-liquid extraction is useful for separating materials of biological origin. In these systems, both phases consists mainly of water, an environment suitable for biomolecules which are denatured in organic solvents. The objective of this work was the study of the partition profile of papain from the *Ficus carica* latex, in aqueous two phase systems of polyetyleneglycol and potassium phosphate, in order to apply these systems for the enzyme isolation. It was found that papain, has preference for the potassium phosphate rich phase. Protein partitioning coefficient was 0.54 ± 0.02 . The system formed by polyethylene glycol of molecular weight 4000 and 4% NaCl produced a yield of 63% of the enzyme, and a purification factor 1.5.

PALABRAS CLAVES: Sistemas bifásicos- Aislación de proteínas- Papaína
KEY WORDS: Biphasic systems- Protein separation- Papain.

Introducción

En el látex de *Ficus carica* y *Carica papaya* hay una mezcla compleja de cisteíno endopeptidasas. La más conocida y empleada es la papaína por el valor comercial que adquiere debido a su empleo en coagular leche, eliminar la turbidez en cerveza, reducir la viscosidad y sabores amargos en jugos. En medicina se emplea para reducir edemas y procesos inflamatorios, limpiar tejidos, en tratamientos de úlceras, para reducir las adhesiones luego de una cirugía, para disolver membranas de microorganismos, etc. Su amplio uso la hace una enzima muy valiosa, y por lo tanto es necesario contar con métodos de aislamiento y purificación en macro escala. La extracción de biomaterial usando sistemas bifásicos acuosos (SBA) es una herramienta poderosa para la separación y análisis de partículas biológicas. Estos SBAs se forman cuando se mezclan soluciones acuosas de dos polímeros de cadena flexible o bien un polímero y una sal por encima de una concentración crítica (sistemas preformados). En este caso espontáneamente se

originan dos fases, una rica en uno de los polímeros y la otra rica en el otro polímero o la sal. [1, 2]

El objetivo de este trabajo fue estudiar el perfil de reparto de la papaína del látex de *Ficus carica*, en sistemas bifásicos acuosos formados por polietilenglicol y fosfato de potasio, con el fin de aislar y purificar dicha enzima.[3]

Materiales y método

Se prepararon SBAs formados por fosfato de potasio, pH 7.4 y polietilenglicol (PEG) de peso molecular 4000 en presencia de NaCl 4% P/P, de acuerdo a los diagramas binodiales obtenidos con anterioridad. Se reemplazó el 50 % de agua necesaria para la formación del sistema bifásico por un homogenado de látex de *Ficus carica* disuelto en buffer fosfato 50 mM. (Fig.1).

Los sistemas se mantuvieron a 8°C durante una hora. Se separaron las fases y se determinó el coeficiente de reparto de las proteínas totales (K_p) y el coeficiente de reparto de la papaína (K_{pap}).

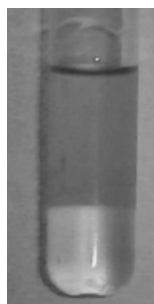


Fig. 1- SBA formado por PEG4000 y fosfato de potasio, pH:7.4 en presencia de 4% NaCl, la fase inferior es rica en fosfato de potasio y la fase superior rica en PEG.

El coeficiente de reparto de las proteínas (K_p) se define como:

$$K_p = \frac{[P_s]}{[P_i]}$$

donde $[P_s]$ y $[P_i]$ son las concentraciones de la proteína en la fase superior e inferior respectivamente. Para el caso en que se cumple la ley de Beer es posible reemplazar los valores de $[P_s]$ y $[P_i]$ por las respectivas absorbancias de cada fase diluida convenientemente.

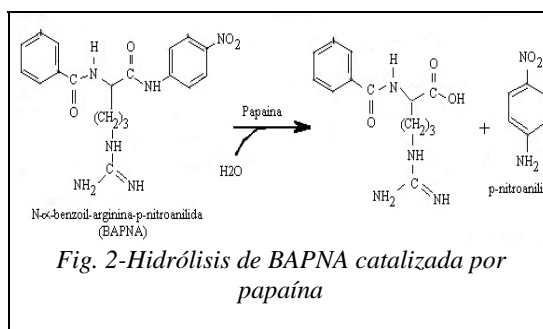
Para determinar K_p se extrajeron muestras de ambas fases, se diluyeron y se determinó el contenido de cada una midiendo la absorbancia a 230nm.

Para determinar la actividad enzimática de papaína se utilizó BAPNA (N α Benzoyl-bL-Arginine 4- nitroanilide hydrochloride) como sustrato, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 383 nm en función del tiempo, en sistemas formados por 10 μ l de la fase superior o inferior de cada SBA en 2,5 ml de BAPNA en presencia de cisteína, para liberar el sitio activo de la papaína, cisteína-25 [3].

La interacción específica con el sustrato BAPNA se produce a través del residuo de fenilalanina. La hidrólisis de este enlace peptídico genera entre otros productos de reacción, la p-nitroanilina, de color amarillo, lo que permite seguir espectrofotométricamente la actividad de la papaína mediante la medida de la velocidad de formación de este producto. (Fig.2)

Se define el coeficiente de reparto de papaína (K_{PAP}) como el cociente de las pendientes de la curva de absorbancia de la fase superior y la fase inferior en función del tiempo.

$$K_{PAP} = \frac{m_s}{m_i}$$



El rendimiento de la proteína de interés en la fase inferior se expresa como $Y(\%)$ de la misma:

$$y_{inf} (\%) = \frac{100}{1 + K_{PAP} R}$$

R es la relación de volúmenes de la fase superior e inferior:

$$R = \frac{V_s}{V_i}$$

El factor de purificación (FP) se define como la concentración de la proteína que se quiere aislar en una de las fases respecto de la concentración de la misma proteína en el estado inicial, (antes de la extracción):

$$FP = \frac{\frac{C_{PAPI}}{C_{PTI}}}{\frac{C_{PAPHomog}}{C_{PTHomog}}}$$

donde: C_{PAPI} y C_{PTI} son la concentración de la proteína de interés (papaína) y la concentración de proteínas totales en la fase inferior; $C_{PAPHomog}$ y $C_{PTHomog}$ son la concentración de papaína y concentración de proteínas totales antes de la extracción.

Resultados y discusión

En los rangos de proteína ensayados, un gráfico de la concentración en la fase superior en función de la concentración de la misma en la fase inferior mostró un comportamiento lineal con K_p como pendiente.

El coeficiente de reparto de las proteínas totales fue de $K_p=0.54\pm 0.02$ lo que indicaría que las proteínas del látex tienen preferencia por la fase inferior del SBA, rica en fosfato de potasio. (Fig.3)

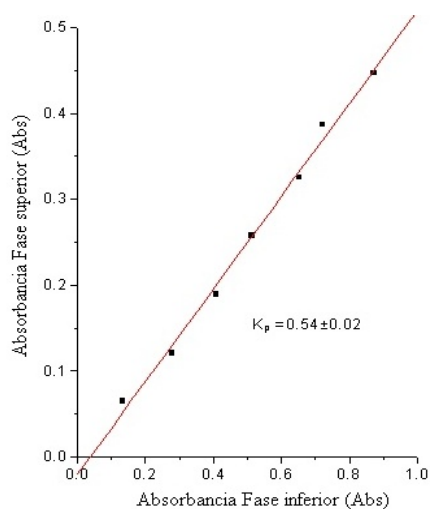


Fig.3 Absorbancia de la fase superior del SBA en función de la absorbancia de la fase inferior medida a 230 nm.

Un gráfico de la actividad de papaína en la fase superior del SBA en función de la actividad en la fase inferior es lineal, con K_{Pap} como pendiente. (Fig.4)

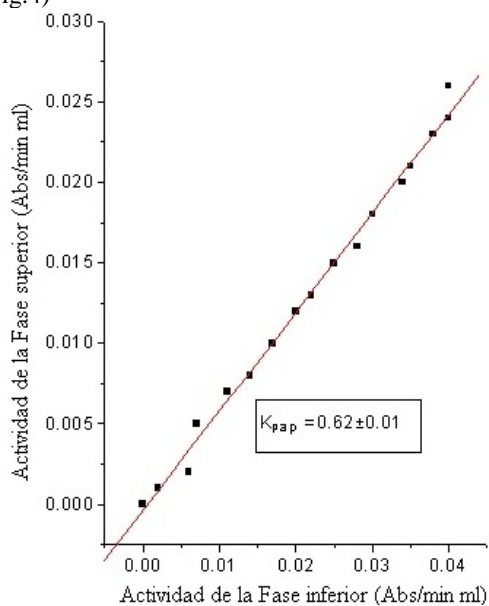


Fig.4- Actividad de la fase superior de SBA en función de la actividad de la fase inferior.

La K_{PAP} fue de 0.62 ± 0.01 , al igual que las demás proteínas, la papaína tiene preferencia por la fase inferior del sistema bifásico.

Para estos SBA formados por PEG y fosfato de potasio, pH7.4 en presencia de 4% NaCl el rendimiento obtenido fue de 63% con un factor de purificación de 1.5.

En la tabla I se muestran los resultados de las proteínas totales y la actividad específica para el homogenado de látex (H) y la fase inferior del SBA (M).

| Sistema | Proteínas totales mg/ml | Actividad específica Abs/min mg |
|---------|-------------------------|---------------------------------|
| H | 19.1 | 0.046 |
| M | 10.4 | 0.070 |

En la Fig.5 se muestran micrografías de gotas de la fase inferior y la fase superior de un SBA en presencia de papaína.

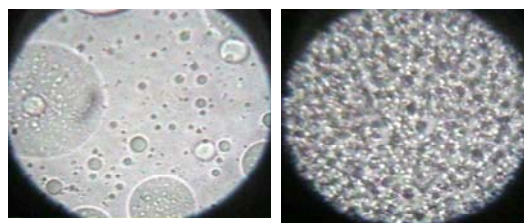


Fig.5- Micrografías de gotas de la fase inferior (izquierda) y de la fase superior (derecha) de un SBA en presencia de papaína.

Conclusion

Los presentes resultados muestran que la extracción es muy eficiente, obteniéndose un 63% del total de papaína contenido en el látex de higuera, en la primera extracción. Además la enzima se mantiene activa, lo cual es confirmado por los elevados valores de actividad específica encontradas en la fase rica en fosfato. El factor de purificación no fue muy alto, lo cual podría deberse al hecho de que el látex tiene proteínas hidrofílicas al igual que la papaína y ambas muestran una preferencia por la misma fase rica en fosfato.

Referencias

- 1- Rajni Hatti-Kaul (Ed) 2000 Methods in Biotechnology. Aqueous Two-Phase Systems. Humana Press.
- 2- Mohamed Azarkan, Anouar El Moussaoui, Delphine van Wuytswinkel G. Dehon, Y. Looze. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. Journal of Chromatography B, 790 (2003) 229–238 .
- 3- Joel Huet Yvan Looze, Kristin Bartik , Vincent Raussens, Rene Wintjens, Paule Boussard Structural characterization of the papaya cysteine proteinases at low pH Biochemical and Biophysical Research Communications 341 (2006) 620 –626