

Obtención de papaína a partir de látex de *Carica papaya* mediante procesos extractivos escalables y de bajo impacto

Melisa Di Giacomo

Depto. Química-Física. Facultad Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNRosario. IPROBYQ – CONICET
Ciencias biológicas. Biotecnología.

INTRODUCCIÓN

Se ha marcado como tendencia mundial la progresiva utilización de enzimas en numerosos procesos industriales debido a la eficiencia y rapidez de las reacciones donde participan, y a la posibilidad de sustituir procesos o productos que dañan al medio-ambiente. La **papaína** (PAP), que se extrae del látex de los frutos verdes de la papaya (*Carica papaya*), es una fitoproteasa muy demandada por sus aplicaciones en la industria cervecera, en frigoríficos, curtiembres y panificación. Su obtención se realiza mediante precipitaciones con sales, solventes y cromatografías que requieren de tiempos prolongados y resultan costosos.

El considerable incremento del uso de enzimas en numerosos procesos productivos ha impulsado el desarrollo de nuevas estrategias bioseparativas sencillas, rápidas, no contaminantes y aplicables a macro-escala que permitan recuperar enzimas de importancia biotecnológica. Entre ellas, dos metodologías no tradicionales, los **sistemas bifásicos acuosos** (SBAs) (Albertsson, 1986) y el **reparto de afinidad** (RA) (Teotia y Gupta, 2001), han cobrado relevancia debido a sus múltiples ventajas. Los SBAs responden al principio de toda extracción líquido-líquido por el cual las biomoléculas de una mezcla compleja se distribuyen entre las dos fases de un SBA de acuerdo a un coeficiente de reparto (K_r). Una variante de esta metodología es el reparto de afinidad con macroligandos poliméricos, los cuales direccionan en forma selectiva a la molécula blanco hacia la fase donde ellos se reparten mayoritariamente (Hilbrig y Freitag, 2003).

OBJETIVO

Desarrollar una metodología limpia, eficiente y económica, basada en el empleo de SBAs y alginato sódico (NaALG) como macroligando de afinidad, que pueda aplicarse a la extracción y producción de PAP industrial a partir de látex de papaya.

METODOLOGÍA

Se utilizaron diferentes SBAs formados por citrato de sodio (NaCit) pH 5,20 y polietilenglicoles (PEGs) de diferentes pesos moleculares (PM) en el rango 600-8000, con y sin agregado de NaALG. Se preparó una solución de PAP comercial (PAP_{com}) y un extracto crudo de la enzima a partir de látex de papaya (PAP_{látex}).

Se caracterizaron los equilibrios de reparto del polímero, de la enzima y de los azúcares reductores (AR) contenidos en los extractos crudos, a través de los respectivos coeficientes de reparto (K_{rNaALG} , $K_{rPAPlátex}$, K_{rAR}), calculados mediante la ecuación (1) como el cociente entre la concentración del soluto en fase superior e inferior ($[St]_{FS}$ y $[St]_{FI}$). La determinación de NaALG se llevó a cabo por el método del fenol-sulfúrico (Dubois y col., 1956) y la de AR, por el método del DNS.

$$K_{rSt} = \frac{[St]_{FS}}{[St]_{FI}} \quad (1)$$

Proyecto: "Metodología bioseparativa integradora para la recuperación primaria de biocatalizadores industriales basada en el empleo de macroligandos poliméricos" PIP 0551/2014-2016.

Director proyecto: Bibiana B. Nerli Co-director proyecto: Diana Romanini

Director becario: Bibiana B. Nerli

La concentración de PAP se estimó mediante medidas de su actividad frente a un sustrato cromogénico. Se ensayó un protocolo preliminar de precipitación/redisolución de PAP_{látex} con NaALG. El mismo contempla la conocida propiedad del NaALG de precipitar reversiblemente formando un gel en presencia de iones Ca²⁺ (CaCl₂), fenómeno dependiente del valor de fuerza iónica del medio (dada por NaCl). El seguimiento del proceso se realizó determinando el rendimiento (R) y factor de purificación (FP) en las diferentes etapas experimentales.

RESULTADOS

Efecto del peso molecular del PEG sobre el coeficiente de reparto de papaína

La Fig. 1 muestra los valores de Kr de PAP comercial y de látex. La secuencia decreciente observada en los valores a medida que se incrementa el PM del PEG evidencia un mecanismo de reparto dominado por un efecto de exclusión estérica. Los valores de Kr_{PAPcom} y Kr_{PAPlátex}, obtenidos para todos los sistemas, fueron menores que la unidad, evidenciando un reparto preferencial de esta enzima hacia la fase salina (inferior).

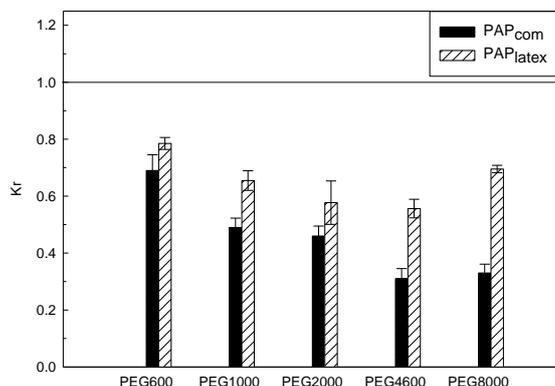


Figura 1: Valores de coeficientes de reparto para PAP_{com} y PAP_{látex} en SBAs PEG/NaCit. Temperatura 20°C

Determinación del coeficiente de reparto de azúcares reductores (Kr_{AR})

El contenido de AR en látex de papaya resultó significativo. Esto debe ser tenido en cuenta a la hora de diseñar una estrategia de purificación de PAP, ya que para muchas aplicaciones sería deseable recuperarla libre de AR y además porque estos azúcares podrían recuperarse para otras aplicaciones.

En la Fig. 2 se observan valores de Kr_{AR} <<< 1, lo cual indica que los diferentes azúcares presentes se reparten preferencialmente hacia la fase salina. La capacidad de los SBAs de separar la enzima PAP de los azúcares se estimó a través de su selectividad, β, calculada como el cociente Kr_{PAPlátex}/Kr_{AR}. Puede apreciarse que todos los sistemas mostraron una selectividad satisfactoria, destacándose especialmente aquellos formados por PEG2000 y PEG4600 con valores de β superiores a 13.

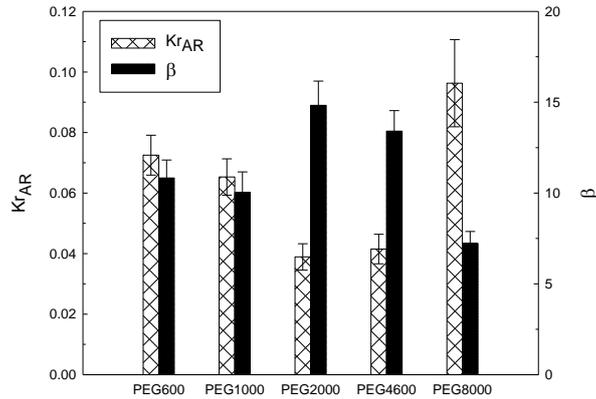


Figura 2: Valores de K_r y selectividad ($\beta = K_{rPAP}/K_{rAR}$) para azúcares reductores presentes en látex en SBAs PEG/NaCit. Temperatura 20°C.

Determinación del perfil de reparto de PAP en SBAs en presencia del macroligando de afinidad

La Fig. 3 muestra los valores de $K_{rPAPcom}$ obtenidos luego de adicionar NaALG a los SBAs hasta una concentración final de 0.1 % P/P. Como puede observarse, en presencia de NaALG, el reparto de PAP se desplaza hacia la fase polimérica, fase en la cual el NaALG se distribuye mayoritariamente ($K_{rNaALG} \gg 1$).

El efecto observado (incremento en el valor de $K_{rPAPcom}$ en sistemas con NaALG) evidenciaría la capacidad de este polímero de unir PAP. Un análisis de las posibles fuerzas intermoleculares involucradas indicaría como más probables a aquellas de origen electrostático, dado que el pH de trabajo (5,20) es un valor intermedio entre los pKa de los grupos ácidos del NaALG (3-5) y el pI de PAP (8,75).

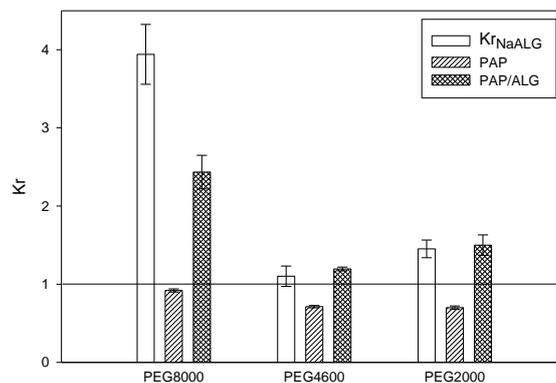


Figura 3: Comparación de los valores de K_r para PAP_{com} en SBAs PEG/NaCit en ausencia y presencia de NaALG. Temperatura 20°C.

Diseño de la estrategia extractiva de PAP

En base a lo observado en las experiencias precedentes se diseñó una estrategia conformada por los siguientes pasos (Tabla 1).

Tabla 1: Rendimientos (R%) y factores de purificación (FP) totales obtenidos en el proceso de precipitación y redisolución de PAP_{látex}.

	R%	FP
Látex de papaya	100	1
Reparto de PAP _{látex} en SBA PEG8000/NaCit/NaALG 0.3%P/P y separación de fase superior (FS)		
FS	85	2.01
Agregado de NaALG hasta 1%P/P y precipitación con CaCl ₂ hasta 80mM de concentración final. Separación del precipitado (PPDO) y sobrenadante (SN)		
SN	13	1.5
Redisolución del PPDO aumentando fuerza iónica con NaCit y NaCl obteniéndose redisoluto (RD)		
RD	72	2.41

Se observa un buen rendimiento en fase superior en la primera etapa del proceso, permitiendo recuperar gran cantidad de enzima en la fase polimérica gracias a la capacidad de NaALG de unir PAP. Al finalizar el proceso de precipitación/redisolución, se obtuvieron rendimientos satisfactorios, mayores al 70%, y un factor de purificación de 2.4.

CONCLUSIONES

El reparto unilateral de NaALG hacia la fase rica en PEG, el direccionamiento de PAP hacia dicha fase, el reparto mayoritario de los AR hacia la fase contraria, sumado a la precipitación ALG-PAP, la disolución/disociación de dicho complejo y la posibilidad de reprecipitar el ALG permite plantear como viable la estrategia de recuperación de PAP planteada. Debe tenerse presente que la misma resulta ventajosa por cuanto permite integrar en una única operación el clarificado, la concentración y la purificación del bioproducto, y reciclar los polímeros empleados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albertsson, P.**, 1986. *Partition of cell particles and macromolecules*. 3^o Edition. Edited by Wiley-Interscience. New York.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, K., Rebers, P.A., Smith, F.**, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350.
- Hilbrig, F.; Freitag, R.**, 2003. Protein purification by affinity precipitation. *J. Chromatogr. B.* 790, 79.
- Teotia, S.; Gupta, M.N.**, 2001. Reversibly soluble macroaffinity ligand in aqueous two-phase separation of enzymes. *J. Chromatogr. A.* 923, 275.