

Diseño de un proceso experimental para la producción de papaína liofilizada

Javier Quino Favero, Nora Bernal Portilla, Juan Carlos Yácono Llanos

Ingeniería Industrial n° 26, 2008, ISSN 1025-9929, pp. 201-229

Resumen: Se describe el diseño de un proceso tecnológico para la obtención de papaína purificada a partir del látex fresco del fruto verde de *Carica papaya*. El látex fresco del fruto es resuspendido en *buffer* con agentes protectores de la actividad de la enzima cuya concentración y condiciones de aplicación fueron halladas de manera experimental. El extracto es centrifugado para separar la materia insoluble y la solución clarificada es sometida a precipitación con sulfato de amonio para obtener enzima insoluble. La enzima insolubilizada es resuspendida en agua, desalinizada en una unidad de filtración tangencial y el agua removida por liofilización. El proceso permite recuperar el 80% de la proteína y el 65% de la actividad original. El producto obtenido es un polvo blanco rápidamente soluble en agua. Todas las etapas pueden ser escaladas para la producción comercial de papaína.

Palabras clave: Papaína, proteasa, carica papaya

Experimental Process design for lyophilized papain production

Abstract: A process for papain (cystein papainase) extraction and purification from fresh latex obtained from unripped fruits of *Carica papaya* is described. Samples of fresh collected latex were suspended in citrate-phosphate buffer containing reducing agents whose concentration and application conditions were found experimentally. The extract was centrifugated and the clarified solution subjected to ammonium sulphate precipitation. The insoluble fraction was resuspended in water, desalted and concentrated by tangential filtration and, the remaining water removed by liophylization. The process allowed 80% recovery of the initial protein content and 65% of the original activity, the product obtained can be described as a white powder very soluble in water. All the steps can be scaled-up for commercial papain production.

Keywords: Papain, protease, carica papaya.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son biocatalizadores, agentes de origen biológico que aceleran la velocidad a la cual ocurren las reacciones químicas al disminuir los requerimientos de energía de activación necesaria para dichas reacciones (Cornish-Bowden, 1995). Las enzimas no se consumen en el proceso, por lo que una molécula de enzima sigue actuando.

La catálisis enzimática —como se denomina a la acción de las enzimas— es eficiente, altamente específica, puede llevarse a cabo en condiciones relativamente suaves —como temperatura ambiente y pH neutro— y permite un control muy preciso de la reacción. Por ello, la aplicación de las enzimas a la industria se constituye en uno de los primeros procesos biotecnológicos de la química moderna (Roberts, Turner et al., 1995).

Las enzimas han encontrado un gran número de aplicaciones en la industria, una de las clases de enzimas con mayor amplitud de aplicación son las proteasas.¹ Las proteasas son enzimas que provocan la hidrólisis o digestión de otras proteínas en fragmentos más pequeños y en ciertas condiciones pueden ser usadas para la síntesis de nuevos compuestos de interés farmacéutico (Chaiwut, Kanasawud et al., 2007). Una de las proteasas cuyo uso se encuentra muy difundido es la papaína, en realidad una mezcla de papaína y quimopapaína, que es extraída del látex de los frutos verdes de la *Carica papaya*.

Las plantas de *Carica papaya* tienen tallo recto, de crecimiento rápido y sin ramificaciones; de siete a ocho metros de alto y con un tallo de 20 cm de diámetro. Las hojas son suaves y se encuentran agrupadas cerca de la parte superior de la planta. Es nativa de América Central y se ha distribuido en los trópicos, donde se cultiva hasta 32 grados de latitud, tanto hacia el norte como hacia el sur. En algunas zonas tropicales es prácticamente una maleza.

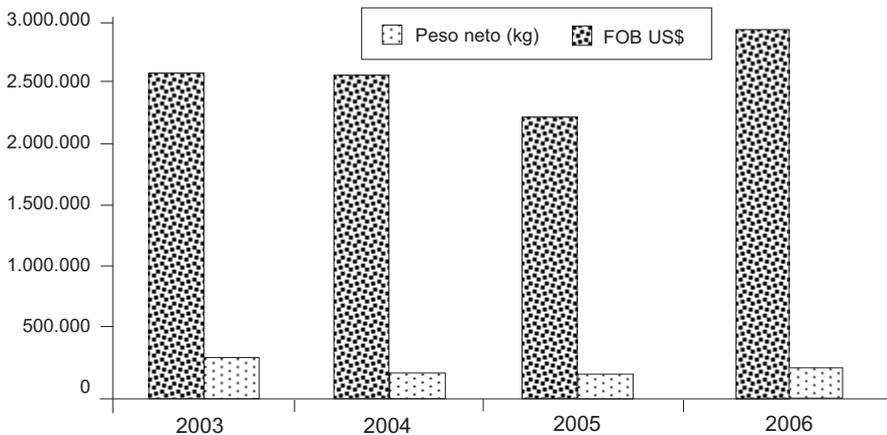
La papaína se encuentra en el látex y se colecta haciendo cortes sagitales en los frutos verdes, este fluye después de hacer cortes superficiales, para coagularse en la superficie del fruto después de algunos minutos, en un proceso similar a lo que ocurre con las heridas (Silva,

1 Medicamentos para facilitar la digestión, manufactura de vacunas, medicación para el tratamiento de desplazamiento de discos intervertebrales, soluciones para limpieza de lentes de contacto, síntesis de péptidos y medicamentos antiinflamatorios, entre otros.

García et al., 1997). El látex gotea en un recipiente apropiado y es secado al sol o en horno a 55-60 grados. Los mismos frutos son cortados nuevamente en diferentes lugares en intervalos semanales. Estos frutos son comestibles, por lo que el látex y el fruto son utilizados. Se han reportado rendimientos de 20 a 25 kg de papaína seca por hectárea durante el primer año; 90 a 100 kg durante el segundo; 60 a 90 kg en el tercero; 30 a 40 kg en el cuarto, y 20 o menos en el quinto (Morton, 1977; Duke y DuCellier, 1993).

El 2006, el Perú importó casi tres millones de dólares en poco más de 334 toneladas de diferentes tipos de enzimas (gráfico 1). Por ello, es de interés el desarrollo de métodos de extracción y purificación avanzados para producir enzimas que satisfagan la demanda interna y que puedan —a su vez— encontrar un mercado externo.

Gráfico 1
Importación de enzimas en el Perú en los años 2003-2006



Fuente: Datatrade SAC.
Elaboración propia.

La papaína es obtenida del látex del fruto verde de la *Carica papaya*. La *Carica* es un género que se originó en América tropical y subtropical, del cual se han descrito unas 40 especies nativas desde México hasta el norte de Argentina. De estas especies la *Carica papaya* (papaya) es la más diseminada en los trópicos del mundo y la fuente principal de papaína.

En la producción convencional de papaína se realiza una serie de incisiones a los frutos verdes de la papaya, los que empiezan a exudar el látex, el que es secado al sol o en hornos, previa mezcla con sulfito de potasio para evitar la oxidación; luego, el látex seco será pulverizado y vendido como papaína cruda. Este proceso deteriora una cantidad importante de la enzima presente e introduce muchas impurezas. A la fecha los principales exportadores de papaína cruda son Sri Lanka, Uganda y Tanzania (Duke, 1983).

El producto de estas exportaciones llega a países industrializados, como los Estados Unidos, en donde la papaína cruda es sometida a procesos de purificación con la finalidad de aumentar su actividad, removerle impurezas, estandarizada y aplicada a procesos industriales. La papaína cruda importada a los Estados Unidos está dentro del rubro productos hortícolas misceláneos, y como puede apreciarse en la tabla 1 el total mundial se encuentra en aumento.

Cerca del 80% de la cerveza producida en los Estados Unidos es tratado con papaína, la cual digiere los fragmentos de proteína que pueden precipitar, gracias a esta acción la cerveza se mantiene transparente cuando se enfría (Duke y DuCellier, 1993).

Los procesos destinados a la separación de la papaína del látex, purificación, concentración y estabilización aumentan significativamente el valor de la papaína cruda y le permite ingresar a mercados y procesos productivos más sofisticados. La tecnología de purificación de papaína, aún en proceso de optimización, le da un alto valor al producto, lo cual demuestra su gran rentabilidad y atractivo para los inversionistas del país. El látex (papaína cruda) es cotizado con un valor promedio aproximado de US\$35/kg, mientras que la papaína purificada puede llegar a costar US\$160/100 g o más para las preparaciones muy purificadas. El precio del kilo de papaya pagado al productor en el año 2002 fue de S/.0,292 por kilogramo.² Se estima que cada fruto produce unos 9 gramos de látex por kilo (Monti, Basilio et al., 2000), y cada cajón de papaya comercializada podría producir 108 g de látex.

2 Ministerio de Agricultura del Perú. Cuadro 59. "Precio promedio pagado al productor (en chacra) por mes según principales productos agrícolas y pecuarios". [en línea] Portal Agrario. <http://www.portalagrario.gob.pe/precios/pppagprod_0212.shtml>. (Consulta: 27 de enero del 2008).

Tabla 1
Importación a los Estados Unidos de enzimas derivadas de productos hortícolas

Área/Países de origen y <i>commodities</i> importados Importes de consumo	Partidas arancelarias	Enero-diciembre					Enero-noviembre		variación %
		Valores en miles de dólares					Comparaciones		
		2002	2003	2004	2005	2006	2006	2007	
Total mundial	3507907000	261.463	285.292	336.087	367.293	418.400	384.941	412.546	7,17
Norteamérica	3507907000	13.176	13.130	14.334	21.774	28.208	26.072	26.457	1,48
Caribe	3507907000	0	47	437	51	50	50	50	0,00
América Central	3507907000	0	0	107	12	0	0	0	-
América del Sur	3507907000	3.828	3.630	2.471	5.883	5.350	4.978	8.406	68,86
Unión Europea-27	3507907000	180.762	187.500	225.125	244.815	277.767	255.148	277.300	8,68
Europa (otros)	3507907000	4.155	4.922	2.799	3.843	4.006	3.732	4.133	10,74
Ex Unión Soviética	3507907000	465	4.771	6.995	411	2.182	2.176	152	-93,01
Asia este	3507907000	51.289	62.913	72.747	80.263	89.470	82.578	85.584	3,64
Medio Oriente	3507907000	518	739	542	855	641	554	657	18,59
África subsahariana	3507907000	1.347	1.214	1.292	1.176	869	846	1.012	19,62
Asia del sur	3507907000	2.161	2.601	3.357	3.402	3.753	3.406	3.243	-4,79
Asia del sureste	3507907000	3.105	3.117	5.093	3.396	5.073	4.536	4.322	-4,72
Oceanía	3507907000	637	709	786	1.102	1.032	865	1.229	-42,08

Fuente: Foreign Agricultural Service, Departamento de Agricultura de Estados Unidos (fecha de consulta: 22 de enero del 2008).

En nuestro país la disponibilidad de papaya es abundante. Existen diversas regiones, como Huánuco, Amazonas, Ucayali, donde las condiciones climatológicas favorecen el cultivo de la papaya. La necesidad de recolección del látex propicia la demanda de mano de obra, lo que crea más fuentes de trabajo para la población.

El empleo de la papaya para la producción de papaína favorece el ecodesarrollo; es decir, promueve el desarrollo de las regiones, al utilizar racionalmente los recursos naturales con estilos tecnológicos y formas de organización que respetan los patrones sociales y culturales.³

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Obtención de látex de *Carica papaya*

Se obtuvo látex por incisiones longitudinales realizadas a frutos verdes de papaya (véase fotografía). La extracción se hizo entre las 9 y las 10 de la mañana, en plantas de papaya ubicadas en el distrito de San Borja, en Lima. Las incisiones se realizaron con la ayuda de una espátula plástica. El látex que emana de las incisiones fue recolectado en vasos de precipitado previamente lavados con mezcla sulfocrómica y enjuagados con agua destilada y bidestilada. Las muestras recogidas de esa manera fueron tapadas con parafilm y almacenadas en frío en una caja térmica con hielo para su transporte al laboratorio.

2.2 Determinación de la concentración de proteína

La determinación del contenido de proteína en el látex se realizó por el método de Lowry (Stoschek, 1990), utilizando como patrones albúmina de suero bovino (BSA Sigma) y papaína liofilizada (Sigma). El *buffer* alcalino consistió en 48 ml de NaOH 0.1M, conteniendo 2 por ciento de Na_2CO_3 , 1 ml de tartrato de sodio y potasio al 1% y 1 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5%. A 100 μL de muestra se le adicionaron 2000 μL de *buffer* alcalino y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se adicionaron 200 μL de reactivo Folin-Ciocalteu diluido (Sigma) 1:1, seguido de agitación inmediata en un vórtex.

3 Organización de las Naciones Unidas. "Glossary of Environment Statistics, Studies in Methods". Series F, núm. 67. Nueva York, 1997.

Incisiones en frutos de *Carica papaya* para obtener látex



Se preparó una batería de estándares con concentraciones 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/ml de BSA o papaína. Se siguió el siguiente esquema:

Tabla 2
Protocolo para cuantificar la cantidad de proteína

	Blanco	Muestra/estándar
Agua	100 μ L	
Muestra	–	100 μ L
<i>Buffer</i> alcalino	2.000 μ L	2000 μ L
Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente		
Reactivo Folin-Ciocalteu	200 μ L	200 μ L
Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente y leer absorbancias a 600nm		

2.3 Determinación de la actividad enzimática

Para la determinación de la actividad se utilizó como sustrato de reacción una disolución 25 mM de benzoíl-arginil-paranitroanilida (Bapna) (Sarath, Zeece et al., 2001), para ello se disolvió 0.1087 g de Bapna en 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Las muestras con la enzima extraída fueron resuspendidas en *buffer* ácido 4-morfolinoetanosulfónico (MES) 0.01 M pH 6.20, que contenía cisteína o 2-mercaptoetanol 50 mM como agentes reductores incubadas por 10 minutos a 25°C antes de iniciar la reacción por adición del Bapna 25 mM. La hidrólisis del Bapna por la acción enzimática se monitoreó de manera continua a 410 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 40. Se siguió el siguiente esquema:

Tabla 3
Protocolo para determinar la actividad enzimática

	Blanco	Muestra/estándar
Muestra	–	100 μ L
Agua	100 μ L	–
<i>Buffer</i> MES 0.01M pH 6.20	1900 μ L	1900 μ L
Incubar por 10 minutos a 25°C		
Bapna 25 mM	100 μ L	100 μ L
Leer absorbancia de manera continua a 410 nm y calcular la pendiente en el rango lineal.		

La variación de la absorbancia con respecto al tiempo (dA/dt) permite calcular la tasa de formación de p-nitroanilida con respecto al tiempo y determinar las unidades (Cornish-Bowden 1995). El cálculo de pendiente en la región de linealidad se ejecutó con la aplicación KinLab de Perkin-Elmer.

La unidad se definió como la cantidad de enzima que libera un micromol de p-nitroanilida por minuto a 25°C a pH 6.20. Cuando la muestra estuvo diluida se realizó la corrección apropiada según el factor de dilución.

2.4 Determinación de las condiciones de extracción

2.4.1 Evaluación del pH de extracción

Para la evaluación del pH de extracción se realizó una extracción con *buffer* citrato-fosfato a pH 3.00, 4.00, 5.00, 6.00 y 7.00. Para ello se efectuó una dilución 1:10 de látex fresco en *buffer*.

Se tomaron alícuotas y se determinó la actividad en el momento de la extracción (0h) y a las 24 y 120 horas. Los ensayos se realizaron por duplicado.

2.4.2 Evaluación del tiempo de extracción

Se realizó una dilución 1:10 (w/w) de látex en *buffer* y se le proporcionó agitación constante mientras la temperatura se mantuvo a 5°C o a temperatura ambiente de 25°C.

Se extrajo periódicamente una alícuota de la suspensión, la cual fue centrifugada a 5.000 g durante 10 minutos en una centrífuga Heraeus Sepatech Biofugue 200.

La actividad fue determinada en el sobrenadante, adicionalmente se determinó la cantidad de proteína extraída.

2.4.3 Evaluación de la concentración del buffer y agentes protectores de la actividad

Se ejecutó un diseño factorial completo de tres factores en dos niveles para medir los efectos e interacciones de los componentes, de acuerdo con el siguiente esquema:

Tabla 4
Diseño factorial para evaluar los efectos del *buffer* y
la concentración de cisteína y 2-mercaptoetanol

Experimento	Concentración molar del <i>buffer</i>	Concentración mM de cisteína	Concentración mM de 2-mercaptoetanol
1	0.1	0	0
2	0.1	0	50
3	0.1	50	0
4	0.1	50	50
5	0.2	0	0
6	0.2	0	50
7	0.2	50	0
8	0.2	50	50

Los experimentos se efectuaron por duplicado y la determinación de la actividad también se realizó por duplicado. Se hizo un análisis de varianza (Anova) en la aplicación Systat. Todos los gráficos se elaboraron en el programa Sigma Plot y muestran los valores promedio \pm desviación estándar.

2.4.4 *Precipitación, desalinización y liofilización de la enzima*

Una vez extraída la enzima en *buffer* suplementado con agentes reductores (cisteína o 2-mercaptoetanol) la enzima fue precipitada por adición de sulfato de amonio en cristales al sistema de extracción hasta una saturación del 45%. El producto obtenido fue concentrado por centrifugación durante cinco minutos a 5.000 g y resuspendido en *buffer* hasta lograr un volumen final de 0.1 veces el volumen inicial del volumen inicial.

La solución obtenida se diafiltró contra agua destilada en una unidad de filtración tangencial *minimate*, con la finalidad de desalinizar el producto obtenido. La diafiltración se llevó a cabo a un flujo de 1.5 ml por minuto. La solución desalinizada fue precongelada a -20°C y liofilizada a -45°C y 0.045 mbar de presión durante 6 horas. Se obtuvo un polvo de color blanco con bastante volumen.

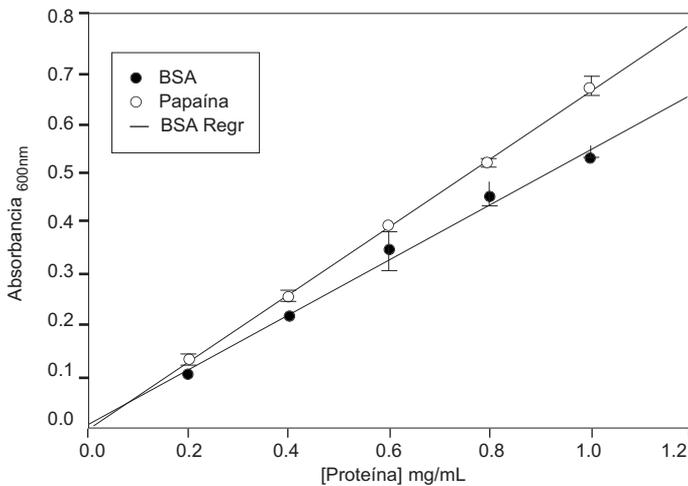
3. RESULTADOS

3.1 Ensayos para determinación de proteína

Los gráficos obtenidos al medir concentraciones crecientes de proteína contra la absorción medida muestran linealidad en el rango ensayado. La pendiente de las curvas es diferente para el caso de la albúmina de suero bovino (BSA) y la papaína. La papaína proporciona mejor linealidad en el ensayo, según se muestra en el gráfico 2:

Gráfico 2
Comparación de las curvas de calibración con papaína y albúmina de suero bovino (BSA)

Determinación de cantidad de proteína por el método de Lowry: Albúmina de suero bovino versus papaína



3.2 Recuperación de actividad en función del pH

Se logró recuperar un mayor número de unidades cuando el pH del *buffer* de extracción fue 3.00. Se encontró que a valores de pH más bajos (condiciones más ácidas) la recuperación fue mayor (gráfico 3).

3.3 Efectos de la concentración del *buffer*

Para todos los tiempos, el *buffer* citrato-fosfato pH 3.0 de mayor concentración molar produjo un más unidades recuperadas. Un mayor tiempo de extracción también produjo mayor recuperación (véase gráfico 4).

Gráfico 3
Recuperación de unidades de enzima a diferentes pH de extracción

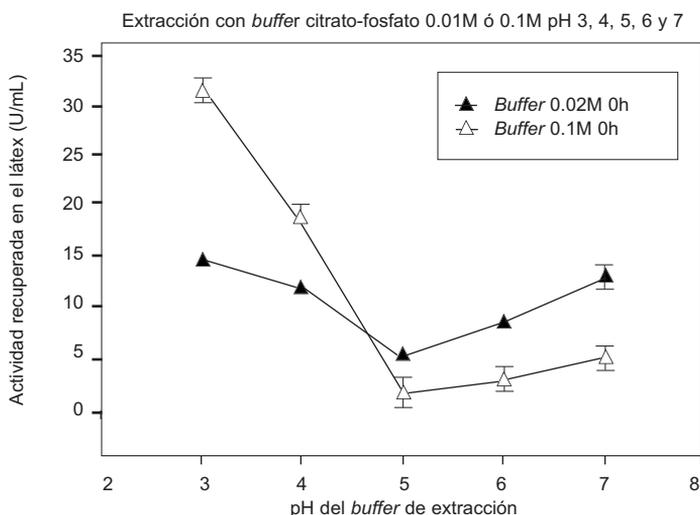
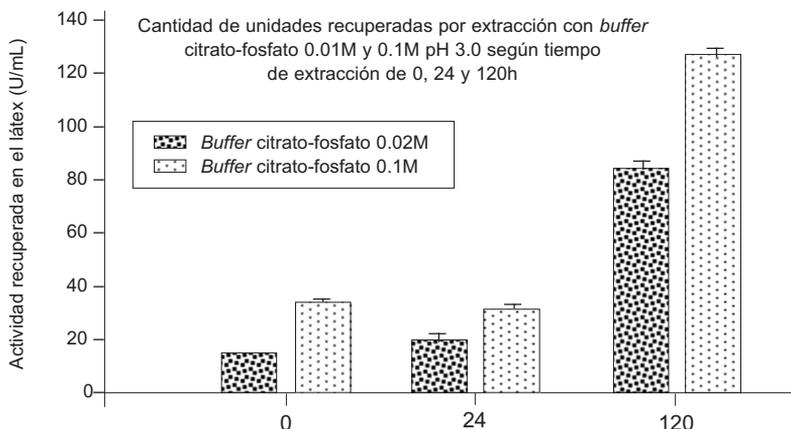


Gráfico 4
Efectos del tiempo de extracción en la recuperación de enzima



3.4 Experimentos factoriales

Se aplicó un análisis de varianza (Anova) a los resultados obtenidos del experimento factorial. Se muestran los efectos individuales de la concentración de *buffer* citrato-fosfato pH 3.0, en concentración 0.1 y 0.2M (gráfico 5), la concentración de cisteína 0 y 50mM (gráfico 6) y la concentración de 2-mercaptoetanol 0 y 50mM (gráfico 7). Los efectos encontrados fueron significativos para las variaciones en la concentración de *buffer* ($p=0.004$) y 2 mercaptoetanol ($p=0.013$), mas no para las concentraciones ensayadas de cisteína ($p=0.438$).

Gráfico 5
Efecto de la concentración molar de *buffer* en la extracción de papaína ($p=0.004$)

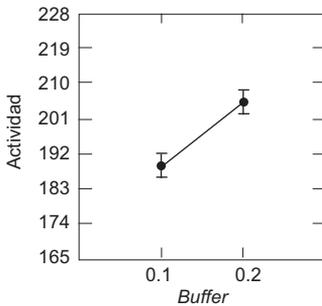


Gráfico 6
Efecto de la concentración de cisteína (1=0mM y 2=50mM) de cisteína en la extracción de papaína (no significativo)

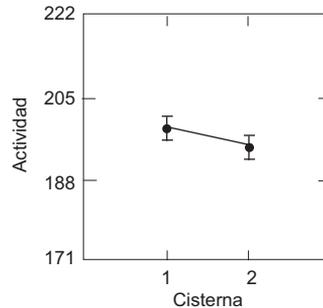
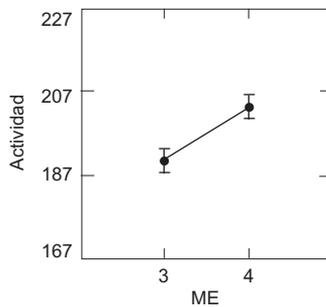


Gráfico 7
Efecto de la concentración de 2-mercaptoetanol (3=0mM y 4=50mM) en la extracción de papaína ($p=0.013$)



Se encontraron efectos independientes entre la concentración de *buffer* empleado y la concentración de cisteína (gráfico 8) o 2 mercaptoetanol (gráfico 9).

Gráfico 8
Efectos combinados de la concentración del *buffer* (0.1 y 0.2M) y cisteína (0 y 50 mM)

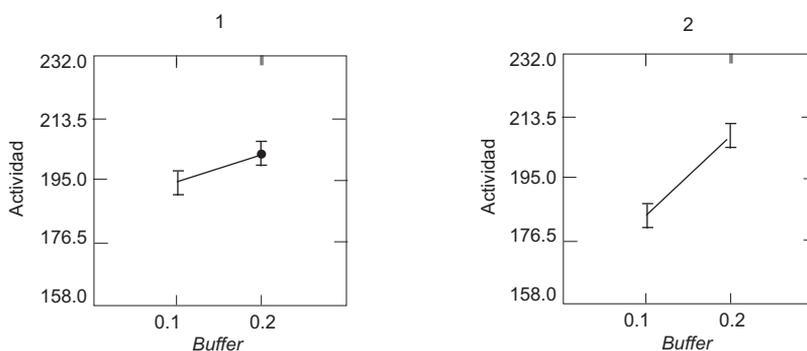
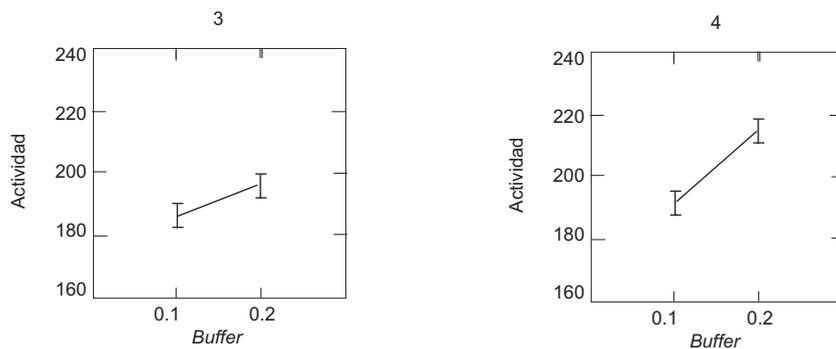
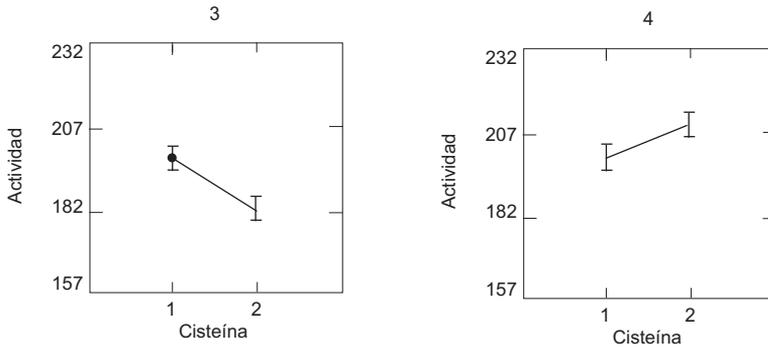


Gráfico 9
Efectos combinados de la concentración de *buffer* (0.1 y 0.2M) y 2-mercaptoetanol



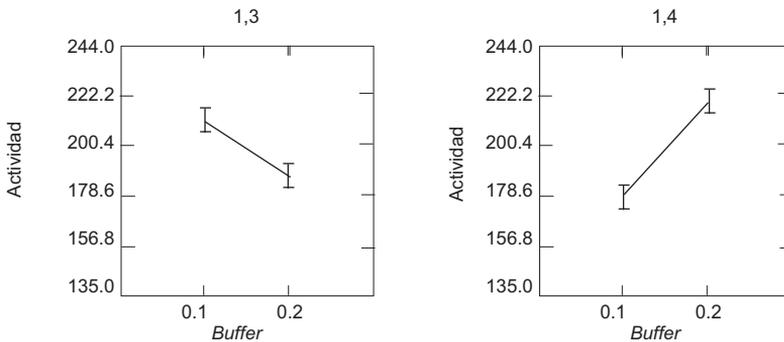
El gráfico 10 muestra que en ausencia de 2-mercaptoetanol (3) la adición de cisteína (1=0mM; 2= 50mM) produce un efecto negativo que puede neutralizarse en presencia de 2 mercaptoetanol 50mM.

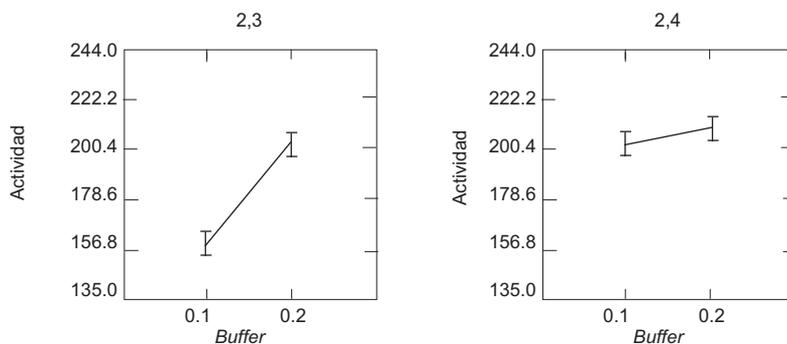
Gráfico 10
Efectos combinados de cisteína 0 y 50mM (1 y 2) y 2-mercaptoetanol 0 y 50mM (3 y 4)



El gráfico 11 muestra los efectos combinados para los tres factores en los cuatro niveles ensayados (Buffer Citrato-Fosfato 0.1 y 0.2M, cisteína 0mM (1) y 50mM (2), 2-mercaptoetanol 0mM (3) y 50mM (4)). Se encontró una interacción significativa entre los tres factores ($p=0.000$).

Gráfico 11
Efectos combinados de la concentración de *buffer* 0.1 y 0.2M, cisteína 0 y 50mM (1,2) y 2-mercaptoetanol 0 y 50mM (3,4)

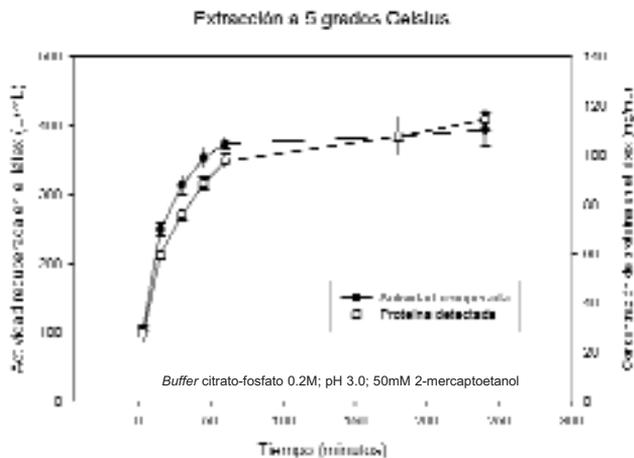




3.5 Extracción de actividad en función del tiempo

La curva de recuperación de actividad y proteína versus el tiempo a baja temperatura (5°C) y agitación constante muestra un comportamiento clásico, esto es, pasado un tiempo los valores de actividad enzimática y concentración de proteína muestran una tendencia a un valor constante (gráfico 12). Esto indica que ya no es posible lograr una mayor extracción de proteína o una mayor recuperación de la actividad enzimática al aumentar los tiempos de extracción. La extracción se realizó bajo agitación constante, *buffer* citrato-fosfato 0.2M y pH 3.0. La relación látex: *buffer* de extracción fue 1:10. Idéntica a los experimentos de los gráficos 3 y 4.

Gráfico 12
Actividad recuperada frente al tiempo para látex de papaya mezclado con *buffer* bajo agitación constante a 5° C



La extracción a 25° muestra menores niveles de recuperación de actividad y pérdida de la actividad en el tiempo, que se evidencia por la disminución del número de unidades recuperadas al transcurrir el tiempo (gráfico 13). Este comportamiento es marcadamente diferente a los valores estables de actividad cuando el ensayo se realizó a 5°C.

La cantidad de proteína recuperada al transcurrir el tiempo es muy similar en ambos casos (gráfico 14), en consecuencia la disminución de la actividad obedece a la desactivación de la enzima por la temperatura.

La extracción con *buffer* citrato-fosfato 0.2M; pH 3.0; 50mM 2-mercaptoetanol y temperatura de trabajo a 5°C permitió recuperar 400 U/mL de látex en 50 minutos.

Gráfico 13
Actividad recuperada durante extracción a 5° y 25° C

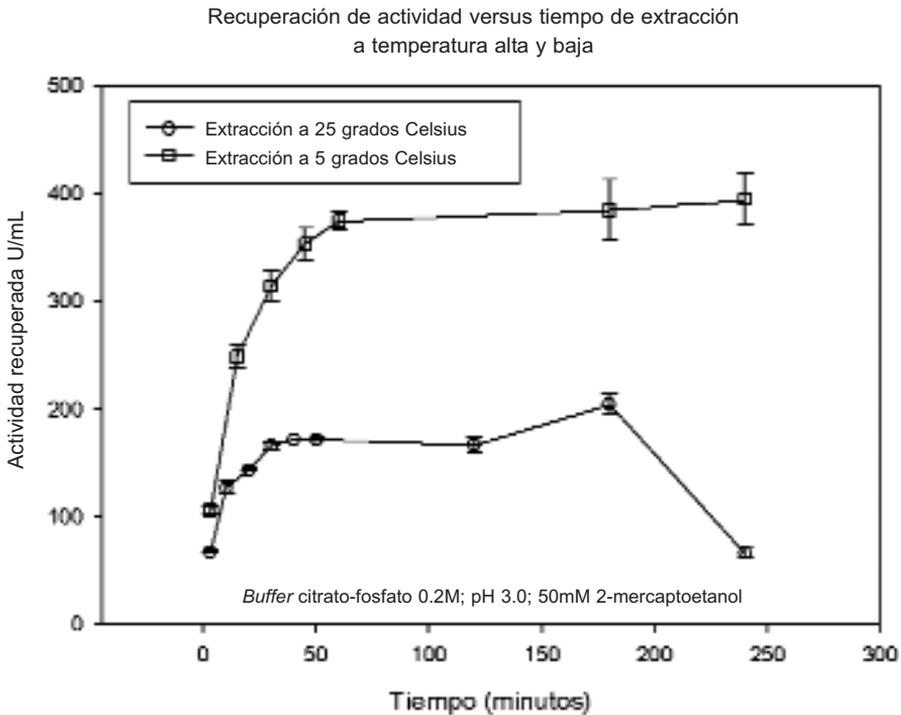
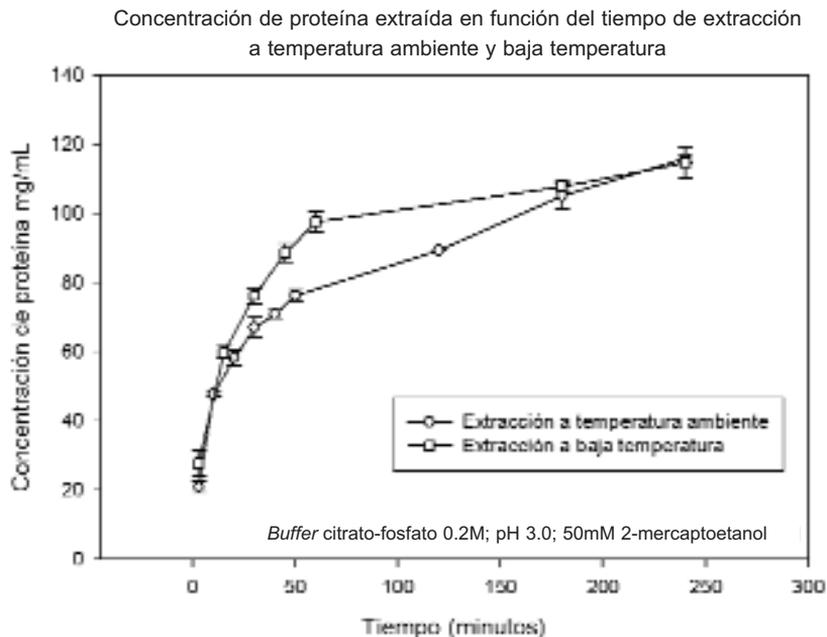
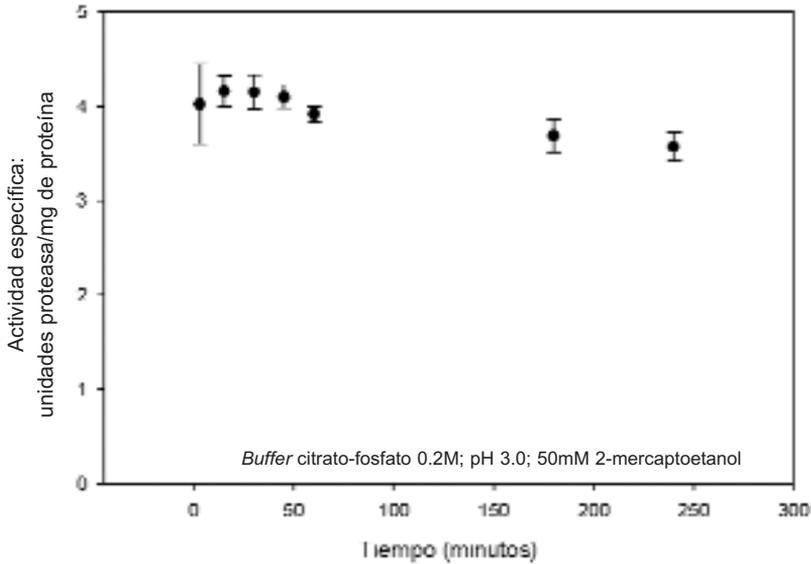


Gráfico 14
Concentración de proteína extraída a 5° y 25° C



La medición de la actividad y proteína recuperadas permitió calcular el valor de actividad específica: el número de unidades enzimáticas recuperadas dividido entre la cantidad de proteína recuperada (una medición de la pureza del producto). Al aumentar el tiempo de extracción aumenta la cantidad de proteína recuperada, lo mismo ocurre con la actividad pero a un ritmo menor, es por ello que la pureza de producto recuperado disminuye (véase gráfico 15). Por ello, el tiempo de extracción para las condiciones ensayadas se estima entre 40 y 50 minutos.

Gráfico 15
Actividad específica versus tiempo



3.6 Recuperación de la enzima

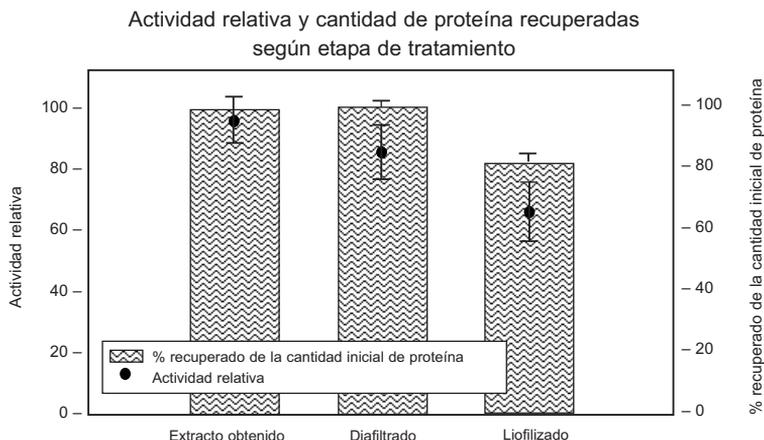
El gráfico muestra la recuperación de la enzima después de la diafiltración (desalinización) y la liofilización del extracto obtenido con *buffer* citrato-fosfato 0.2M; pH 3.0; 2-mercaptoetanol 50mM.

El extracto inicial se toma como punto de partida y se le asignó un valor del 100% al valor de actividad medido más alto. Las actividades medidas para el diafiltrado y el liofilizado se calculan como porcentajes del máximo inicial.

Los datos muestran promedios y desviaciones estándar, cada punto representa cuatro mediciones independientes de actividad en un intervalo de 3 minutos. También se incluye la determinación de la cantidad de proteína recuperada.

Se logró recobrar el 80% de la proteína y se retuvo el 65% de la actividad inicial. El producto obtenido es un polvo blanco muy soluble en agua.

Gráfico 16
Balance de masa para el proceso de extracción y purificación de papaína



El gráfico 17 muestra el balance de materia para el proceso diseñado sobre la base de los resultados experimentales de la purificación de papaína a partir de látex de *Carica papaya*.

Cálculos preliminares

- a) *Buffer* de extracción pH = 3: por 100 mL
 39.8 mL de ácido cítrico + 10.2 mL de Na₂HPO₄·12 H₂O
 39.8 mL x 19.21 g / 1000 mL + 10.2 mL x 71.7 g / 1000 mL

Se agrega 2-mercaptoetanol a 50mM
 $50 \times 10^{-3} \text{ mol/L} \times 0.1 \text{ L} \times 78.13 \text{ g/mol} = 0.39065 \text{ g}$ para 100 mL de *buff*.

Entonces, para preparar 100 mL de *buffer* se requiere:

- 0.7646 g de ácido cítrico
 - 0.7313 g de Na₂HPO₄·12 H₂O
 - 0.39065 g de 2-mercaptoetanol
- Completar con agua.

b) Solución de NH_4SO_4 al 40%:

Se utiliza 0.243 g/mL

c) Rendimiento en la liofilización = 0.5 g de papaína purificada / 30 mL de líquido alimentado.

Cálculos realizados para el balance de materia en base a los datos tomados el día 11 de diciembre del 2007.

Base: 8.2856 g de látex

Buffer de extracción

$$\text{masa} = 8.2856 \times 90/10 = 74.57 \text{ g}$$

$$\rho = 1.009 \text{ mL}$$

$$V = 73.90 \text{ mL}$$

Líquido con papaína que sale de la centrífuga 1:

$$\text{masa} = 75.314 \text{ g}$$

$$\rho = 1.0112 \text{ g/mL}$$

$$V = 74.4798 \text{ mL}$$

Sulfato de amonio aL 40%

$$\text{masa} = 74.4798 \text{ mL} \times 0.243 \text{ g/mL} = 18.0986 \text{ g}$$

Masa total inicial en la etapa de precipitación = 75.314 + 18.0986 = 93.4126 g

Masa de líquido residual que sale de la centrífuga 2 = 88.9756 g

Masa de sólidos con papaína que sale de centrífuga 2 = 4.4369 g

Cantidad de agua para la dilución = 9 x 4.4369 = 39.9321 g

Líquido inicial de la liofilización

$$\text{Masa total} = 4.4369 + 39.9321 = 44.369 \text{ g}$$

$$\text{volumen total} = 40 \text{ mL}$$

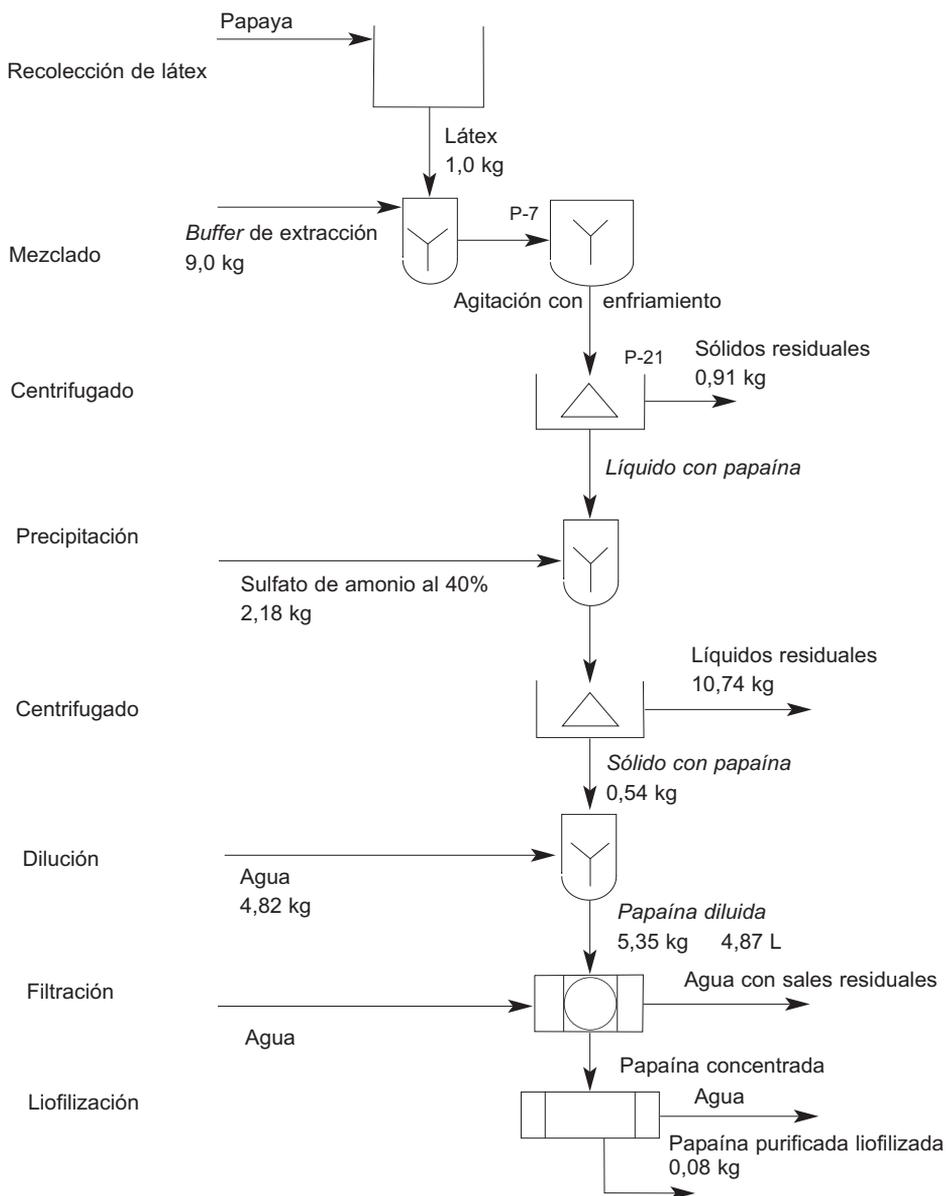
Masa de papaína purificada = 0.5 / 30 x 40 = 0.67g

El diagrama muestra un balance de materia expresado en kilogramos para una base de 1 kg de látex.

El factor de escalamiento fue: 1/8.

Gráfico 17 Balance de masa en base a los procesos experimentales desarrollados

Extracción y purificación de papaína a partir del fruto de papaya
balance de material para una base de 1 kilo de látex



Estimación de costos

Determinación de P.U

	Cantidad	Costo (US\$)	P.U
Látex, g1	0.05	0.050	
Agua bidestilada (l)	20	0.0427	0.85
Ácido cítrico, g	0.7646	0.0542	0.041
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O, g	0.7313	0.0724	0.053
2-mercaptoetanol, g	0.39065	0.101	0.039
Agua bidestilada, l	0.0985	0.85	0.084
Costo buffer de extracción pH = 3 por 100 mL			0.218
Por kg costo buffer pH = 3			2.180
Agitador magnético			
Agitador magnético x hr	21600	400	0.019
Electricidad (kwh)	0.012	0.3	0.004
Incubadora			
Incubadora x hr	36000	3000	0.083
Electricidad kwh	1	0.3	0.300
Centrífuga			
Centrífuga (x hr)	36000	1500	0.042
Electricidad (kwh)	0.065	0.3	0.020
Solución de amonio al 40%			
Sulfato de amonio	0.872	40.8	35.58
Agua bidestilada	1.308	0.08	0.11
Costo solución de amonio al 40%			35.69
Filtración tangencial			
Bomba peristáltica			
Agitador magnético			
Equipo	43200	1500	0.035
Electricidad (kwh)	0.0373	0.3	0.011
Liofilización			
Congelador	43200	6000	0.139
Electricidad (kwh)	0.7	0.3	0.210
Liofilizador	43200	14693	0.340
Electricidad (kwh)	0.7	0.3	0.210
Mano de obra			
Investigador, h	4	77.193	19.298
Auxiliar, h	4	56.140	14.035

Costos del proceso de purificación de papaína

Mezclado y agitación con enfriamiento	Cantidad	P.U	Costo (US\$)
Látex, g	1.000	0.05	0.05
Buffer de extracción, g	9.00	2.18	19.62
Depreciación del equipo(hr) - agitador	0.83	0.02	0.02
Electricidad (kwh) - agitador	0.83	0.30	0.25
Depreciación del equipo(hr) - incubadora	0.67	0.08	0.06
Electricidad (kwh) - incubadora	0.67	0.30	0.20
Investigador	1.0	19.30	19.30
Auxiliar	1.0	14.04	14.04
Costo proceso 1 mezclado y agitación con enfriamiento (\$)			53.52
Cantidad procesada	10.000		
Costo unitario proceso 1 mezclado y agitación con enfriamiento (\$)	5.352		
Factor de escalamiento	120.69		
Centrifugado			
Costo proceso 1 mezclado y agitación con enfriamiento (\$)	10.00	5.35	53.52
Depreciación del equipo - centrifuga, h	0.50	0.04	0.02
Electricidad (kwh) - centrifuga, kwh	0.50	0.02	0.01
Investigador, h	0.50	19.30	9.65
Auxiliar, h	0.50	14.04	7.02
Costo proceso 2 centrifugado, US\$			70.22
Sólidos residuales, kg	0.91		4.00
Cantidad procesado, kg	9.090		
Costo unitario proceso 2 centrifugado, US\$	7.725		
Factor de escalamiento	120.69		
Costo del proceso, US\$	16.70		
Precipitación			
Costo proceso 2 centrifugado, US\$	9.09	7.72	70.22
Sulfato de amonio al 40%, g	2.18	35.69	77.80
Depreciación del equip - agitador, h	0.17	0.02	0.00
Electricidad (kwh) - agitador, Kwh	0.17	0.00	0.00
Investigador, h	0.2	19.30	3.86
Auxiliar, h	0.2	14.04	2.81
Costo proceso 3 de precipitación			154.69
Cantidad procesado, kg	11.270		
Costo unitario proceso 3 precipitación	13.726		
Factor de escalamiento	120.65		
Costo del proceso	84.47		
Centrifugado			
Costo unitario proceso 3 precipitación, US\$/kg	11.270	13.726	154.69
Depreciación del equipo (hr) - centrifuga, h	0.083	0.04	0.00
Electricidad – centrifuga, Kwh	0.083	0.020	0.00
Investigador, h	0.15	19.30	2.89
Auxiliar, h	0.15	14.04	2.11

(continuación)

Costo proceso 4 centrifugado			159.69
Sólidos residuales, kg	10.74		
Cantidad procesado, kg	0.54		
Costo unitario proceso 4 centrifugado, US\$	295.73		
Factor de escalamiento	121.71	US\$	
Costo del proceso, US\$	5.01	9.27	
Dilución			
Costo proceso 4 centrifugado, US\$	0.54	295.73	159.69
Agua de dilución, l	4.82	0.08	0.41
Depreciación del equipo - agitador, h	0.25	0.019	0.00
Electricidad - agitador, Kwh	0.25	0.004	0.00
Investigador, h	0.3	19.30	5.79
Auxiliar, h	0.3	14.04	4.21
Costo proceso 5 dilución			170.10
Cantidad procesado, kg	5.36		
Costo unitario proceso 5 dilución	31.74		
Factor de escalamiento	120.70	US\$/kg	
Costo del proceso, US	10.41	1.94	
Filtración tangencial			
Costo proceso 5 dilución	5.360	31.74	170.10
Agua de desalinización	5.360	0.85	4.58
Depreciación del equipo - filtración tangencial, h	1.000	0.03	0.03
Electricidad - filtración tangencial	1.000	0.01	0.01
Investigador, h	1.50	19.30	28.95
Auxiliar, h	1.50	14.04	21.05
Costo proceso 6 filtración tangencial			224.73
Cantidad procesado, kg	5.360		
Costo unitario proceso 6 filtración tangencial	41.93		
Factor de escalamiento	120.81	US\$	
Costo del proceso, US\$	54.62	10.19	
Liofilización			
Costo proceso 6 filtración tangencial, US\$	5.360	41.93	224.73
Depreciación del equipo - pre congelador, h	1.00	0.139	0.14
Electricidad - pre congelado, Kwh	1.00	0.210	0.21
Depreciación del equipo - liofilización, Kwh	10.00	0.340	3.40
Electricidad (kwh) - liofilización	10.00	0.210	2.10
Investigador, h	2.00	19.30	38.60
Auxiliar, h	5.00	14.04	70.18
Costo proceso 7 liofilización, US\$			339.35
Papáina liofilizada, kg	0.08		
Costo unitario proceso 7 liofilización, US\$	4241.86		
Rendimiento en la liofilización	0.0149		
Factor de escalamiento	120.81	US\$/kg	
Costo del proceso de liofilización,US\$	114.62	1432.7747	

4. DISCUSIÓN

Para cuantificar la cantidad de proteína se realizó el ensayo de Lowry. En este tipo de determinación se usa con frecuencia la albúmina de suero bovino (BSA) como estándar para realizar una curva de calibración. Dado que en este tipo de métodos colorimétricos diferentes proteínas dan como resultado diferentes valores de absorbancia, es mejor utilizar la proteína de interés —papaína— en la construcción de las curvas de calibración (Stoschek, 1990). El gráfico 2 ilustra estas diferencias importantes en la respuesta, en especial en los límites altos de la determinación.

El látex colectado al hacer incisiones en los frutos verdes de *Carica papaya* se mezcló con *buffer* fosfato-citrato (Stoll y Blanchard, 1990) 0.02M en una proporción 1:10 a valores de pH, que comprendieron desde el pH 3 hasta el pH 7. Para evaluar la actividad recuperada se tomó una alícuota de cada extracto y se llevó a pH 6.20 para determinación de la actividad (según protocolo descrito en la tabla 3). La máxima actividad recuperada se produjo a pH 3.0 a las 0, 24 y 120 horas de haber realizado la extracción. El resultado se explica porque la papaína se encuentra inactiva a pH 3.0 y no se produce la autólisis o autodigestión de la papaína por la propia papaína (Greenberg y Winnick, 1940); adicionalmente a este efecto de desactivación reversible se suma el efecto que los iones fosfato y citrato tienen sobre la papaína: favorecen la activación aunque esta no se encuentre al pH óptimo (Kimmel y Smith, 1954). El gráfico también indica que períodos más largos de extracción brindan mayor recuperación de la actividad.

La obtención de enzimas a partir de extractos vegetales requiere ambientes reductores (Gegenheimer, 1990), máxime si la enzima de interés necesita agentes que prevengan la oxidación (Baines y Brocklehurst, 1979; Monti, Basilio et al., 2000). Por ello, se evaluaron los efectos de dos agentes reductores comúnmente usados en la extracción de enzimas (Nitsawang, Hatti-Kaul et al., 2006): cisteína y 2-mercaptoetanol en un diseño factorial de 2 niveles y 3 factores. El tercer factor fue la concentración de *buffer* de extracción, con una fuerza iónica superior mayor (0.1 y 0.2M) para aumentar la compatibilidad con las concentraciones de solutos halladas en el látex (Gegenheimer, 1990). Se encontraron diferencias significativas que favorecieron al 2-mercaptoetanol sobre la cisteína y también al *buffer* de extracción 0.2M sobre la concentración 0.1M.

La aplicación de cisteína, 2 mercaptoetanol o ambos es rutinaria en la extracción de las enzimas de clase similar a la papaína (cisteína proteasas). Los resultados encontrados bajo las condiciones de extracción utilizadas indican que la presencia de cisteína tiene un efecto negativo que no es significativo en la recuperación de la actividad.

Visto que la extracción no se realizó con agitación constante se repitieron las condiciones de extracción con *buffer* citrato-fosfato 0.2M, pH 3.0 y 50mM 2-mercaptoetanol y se proporcionó agitación constante a 5°C.

La curva de recuperación de actividad frente al tiempo aumenta de manera constante y el valor de actividad se estabiliza en el tiempo, lo mismo sucede con la cantidad medida de proteína extraída. Los valores de actividad recuperada (gráfico 12) son 4 veces más altos que lo logrado en los ensayos iniciales de extracción. Para el caso de la extracción a condiciones similares pero a 25°C la extracción de proteína sigue una curva similar, sin embargo, la actividad recuperada es menor y cae con el tiempo: las bajas temperaturas estabilizan la estructura de las enzimas y permiten una mejor recuperación (Fido, Clare Mills et al., 2004).

El extracto fue desalinizado y liofilizado para obtener un polvo de color blanco soluble en agua.

La integración de las diversas etapas, según se describe en el gráfico 16, permite obtener 80 g de papaína a partir de 1 kg de látex fresco. El estimado de costos indica que la producción de 1 kg de papaína purificada tendría un costo de US\$4.241,86; el gramo de papaína purificada y liofilizada se encuentra en un rango que oscila entre US\$10 y US\$60, dependiendo de la pureza de la preparación y del uso que se le dará al producto.

5. CONCLUSIONES

- Se ha logrado diseñar un proceso de producción de papaína a partir de látex fresco de *Carica papaya*. El proceso tiene cuatro etapas: extracción, precipitación, desalinización y liofilización.
- La extracción de papaína de látex fresco del fruto verde de *Carica papaya* requiere *buffer* citrato-fosfato pH 3.0, 0.2M, 50mM de 2-mercaptoetanol con relación 1:10 (látex:*buffer*) y agitación constante a 5°C.

- La enzima extraída se precipita con sulfato de amonio a una saturación del 45% y se desaliniza por diafiltración en un sistema de filtración tangencial.
- Al final de la liofilización se recupera el 80% de la proteína total y el 65% de la actividad original.
- El producto obtenido es soluble en el agua y puede ser estandarizada su comercialización para aplicaciones en la industria de alimentos.
- El proceso descrito permite obtener 80 g de papaína por kg de látex fresco.
- La producción de 1 kg de papaína purificada y liofilizada tiene un costo estimado de US\$4.241,86.

BIBLIOGRAFÍA

- Baines, B. S. y K. Brocklehurst. "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, 1979.
- Cornish-Bowden, A. *Analysis of enzyme kinetic data*. Oxford: Oxford University Press, 1995.
- . *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Cambridge: Portland Press, 1995.
- Chaiwut, P.; Kanasawud, P. et al. "Solid-to-solid peptide synthesis by glycyI endopeptidase". *Enzyme and Microbial Technology* 40, 2007.
- Duke, J. A. "Carica papaya L." [en línea]. <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Carica_papaya.html#Description>. (Consulta: 21 de enero del 2008).
- Duke, J. A. y J. L. DuCellier. *CRC handbook of alternative cash crops*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1993.
- Fido, R. J.; Clare Mills, E. N. et al. "Protein Extraction From Plant Tissues". *Methods in molecular biology* 244, 2004.
- Gegenheimer, P. "Preparation of extracts from plants". *Guide to Protein Purification* 182. San Diego: Academic Press, 1990.

- Greenberg, D. M. y T. Winnick. "Plant proteases: pH-activity curves". *The Journal of Biological Chemistry* 2, 1940.
- Kimmel, J. R. y E. L. Smith. "Crystalline papain. I. Preparation, specificity, and activation". *J. Biol Chem* 207, 1954.
- Monti, R.; Basilio, C. A. et al. (2000). "Purification of papain from fresh latex of *Carica papaya*". *Brazilian Archives of Biology and Technology* 43, 2000.
- Morton, J. F. *Major medicinal plants: botany, culture and use*. Springfield, IL: Charles C. Thomas, 1997.
- Nitsawang, S.; Hatti-Kaul, R. et al. "Purification of papain from *Carica papaya* latex: Aqueous two-phase extraction versus two step salt precipitation". *Enzyme and Microbial Technology* 39, 2006.
- Roberts, S. M.; Turner, N. J. et al. *Introduction to biocatalysis using enzymes and micro-organisms*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.
- Sarath, G.; Zeece, M. Z. et al. (2001). "Protease assay methods". *Proteolytic Enzymes*. Nueva York: Oxford University Press, 2001.
- Silva, L. G.; García, O. et al. "Changes in protein profile during coagulation of latex from *Carica papaya*". *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30, 1997.
- Stoll, V. S. y J. S. Blanchard. "Buffers: Principles and practice". *Methods in Enzimology: Guide to protein purification* 182. San Diego: Academic Press, 1990.
- Stoschek, C. M. "Quantitation of protein". *Guide to protein purification* 182. San Diego: Academic Press, 1990.