

# **Diseño de un proceso experimental para la producción de papaína liofilizada**

*Quino Favero, Javier Martín  
Yácono Llanos, Juan Carlos*  
Instituto de Investigación Científica-IDIC  
Universidad de Lima,

## **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*, liofilización, papaína peptidasa I

## **Summary**

### **Experimental Process design for lyophilized papain production**

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 sulfate precipitation. The insoluble fraction was resuspended in water, desalted and concentrated by tangential filtration and, the remaining water removed by lyophilization. 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.

Key words: papain, protease, *Carica papaya*, lyophilization, papaya peptidase I

## 1. 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, constituye 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. 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*.

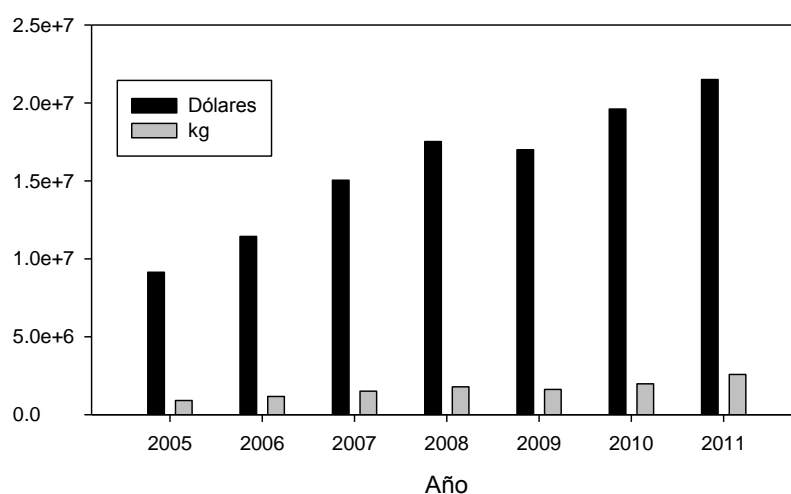
Las plantas de *Carica papaya* tienen tallo recto, de crecimiento rápido y sin ramificaciones. De siete a ocho metros de alto y con un tallo de 20 cm. de diámetro. Las hojas son suaves y se encuentran agrupadas cerca de la parte superior de la planta. Es nativa de América Central y se ha distribuido en los trópicos en donde se cultiva tanto al norte como al sur hasta 32 grados de latitud. 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 corte superficiales para coagularse en la superficie del fruto después de

algunos minutos en un proceso similar a lo que ocurre con las heridas (Silva, Garcia et al. 1997) . El látex gotea en un recipiente apropiado y es secado al sol o en horno a 55-60°C. 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 ha reportado rendimientos de 20-25kg de papaína seca por hectárea durante el primer año; 90-100 kg durante el año 2, 60-90 kg en el año 3, 30-40 kg en el año 4 y 20 o menos en el año 5 (Morton 1977) (Duke and DuCellier 1993).

El Perú importó en el año 2011 más de veintidós millones de dólares en casi 2600 toneladas de diferentes tipos de enzimas (gráfico 1). Por ello el desarrollo de métodos de extracción y purificación avanzados es de interés para producir enzimas que satisfagan la demanda interna y que puedan –a su vez– encontrar un mercado externo.

Importación de enzimas en el Perú 2005-2011  
Fuente: United Nations Commodity Trade Statistics Database



**Gráfico 1: Importación de enzimas en el Perú en los años 2005-2011. Elaboración propia.**

La papaína es obtenida del látex del fruto verde de la *Carica papaya*. *Carica* es un género que se originó en América tropical y subtropical, del cual se ha descrito unas 40 especies nativas desde México hasta el norte de Argentina. De estas especies *Carica papaya* (“papaya”) es la especie 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 mismos que empiezan a exudar el látex. El látex es entonces 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 tales como los Estados Unidos, en donde la papaína cruda es sometida a procesos de purificación con la finalidad de aumentar su actividad, removerle impurezas, estandarizarla y poder ser aplicada a procesos industriales.

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 and 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\$160/100gr o más para las preparaciones muy purificadas. El precio promedio por kilo de “papaya” pagado al productor entre los años 2000-2010 fue de S/. 0.34 por kilogramo (Instituto Nacional de Estadística e Informática, 2013). Se estima que cada fruto produce unos 9g de látex por kilo (Monti, Basilio et al. 2000), cada cajón de papaya que es comercializada podría producir 108g de látex.

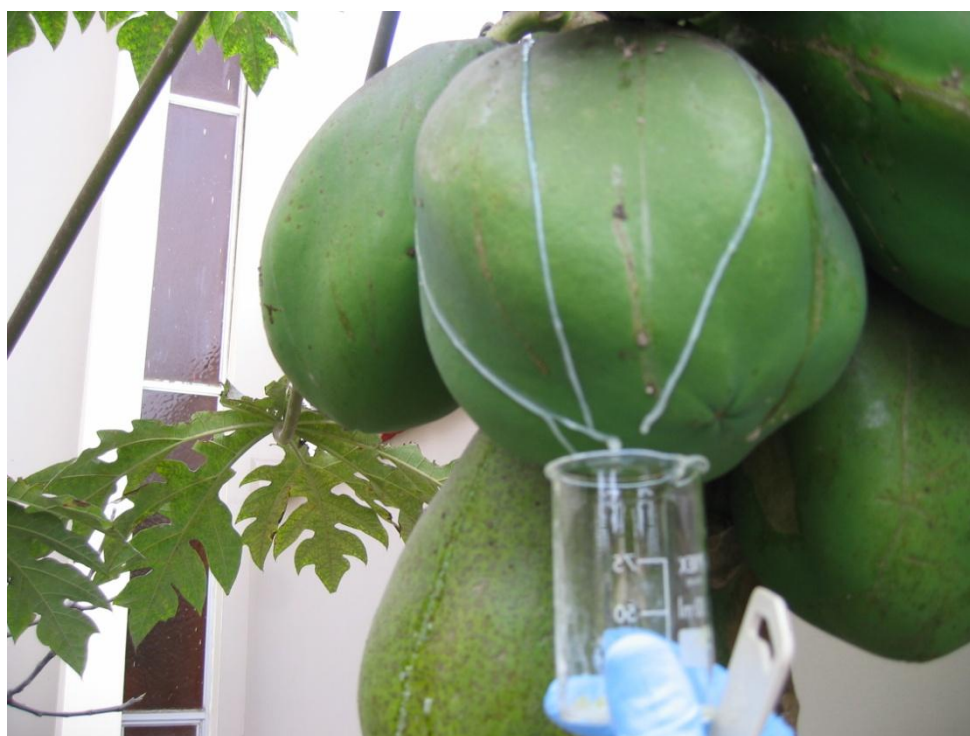
La disponibilidad de papaya en nuestro país es abundante. Existen diversas regiones en Huánuco, Amazonas, Ucayali en donde las condiciones climatológicas favorecen el cultivo de la papaya. La necesidad de recolección del látex propicia la demanda de mano de obra, creando más trabajo para la población.

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.

## 2. Material y métodos:

### *Obtención de látex de Carica papaya*

Se obtuvo látex por incisiones longitudinales realizadas a frutos verdes de papaya (ver fotografía 1), las extracciones se realizaron entre 9 y 10 de la mañana. 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.



**Fotografía 1: Incisiones en frutos de *Carica papaya* para obtención de látex.**

### ***Determinación del contenido de proteína***

La determinación del contenido de proteína en el látex, se realizó por el método de Lowry (Stoschek 1990), utilizando como patrones la albúmina de suero bovino (BSA Sigma) y papaína liofilizada (Sigma). El buffer alcalino consistió en 48mL de NaOH 0.1M conteniendo 2% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1ml de tartrato de sodio y potasio al 1% y 1ml de CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O al 0.5%. A 100μL de muestra, se le adicionó 2000μL de buffer alcalino y se incubó por diez minutos a temperatura ambiente. Luego se adicionó 200 μL de reactivo Folin-Ciocalteu diluido (Sigma) 1:1 seguido de agitación inmediata en un vórtex.

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:

	Blanco	Muestra/standard
Agua	100μL	
Muestra	-	100μL
Buffer alcalino	2000 μL	2000 μL
Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente		
Reactivo Folin-Ciocalteu	200μL	200μL
Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente y leer absorbancias a 600nm		

**Tabla 1: Protocolo para cuantificar la cantidad de proteína.**

### ***Determinación de la actividad enzimática***

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

	Blanco	Muestra
Muestra	-	100 $\mu$ L
Agua	100 $\mu$ L	-
Buffer MES 0.01M pH 6.20	1900 $\mu$ L	1900 $\mu$ L
Incubar por 10 minutos a 25°C		
BAPNA 25mM	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Leer absorbancia de manera continua a 410nm y calcular la pendiente en el rango lineal.		

**Tabla 2: Protocolo para determinar la actividad enzimática**

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.

### *Determinación de las condiciones de extracción*

#### **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 realizó 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.

#### **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 temperatura ambiente de 25°C. Se extrajo periódicamente una alícuota de la suspensión la cual fue centrifugada a 5000 g durante diez minutos

en una centrífuga Heraus Sepatech Biofugue 200. La actividad fue determinada en el sobrenadante, adicionalmente se determinó la cantidad de proteína extraída.

### **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 al siguiente esquema:

Experimento	Concentración molar del buffer	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

**Tabla 3: Diseño factorial para evaluar los efectos del buffer y la concentración de cisteína y 2-mercaptoetanol**

Los experimentos se realizaron por duplicado y la determinación de la actividad también se realizó por duplicado. Se realizó 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.

### **Precipitación, desalinización y liofilización de la enzima.**

Una vez extraída la enzima en un 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 5000g y resuspendido en un buffer, hasta lograr un volumen final de 0.1 veces el volumen inicial del volumen inicial.

La solución así obtenida se diafiltró con 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



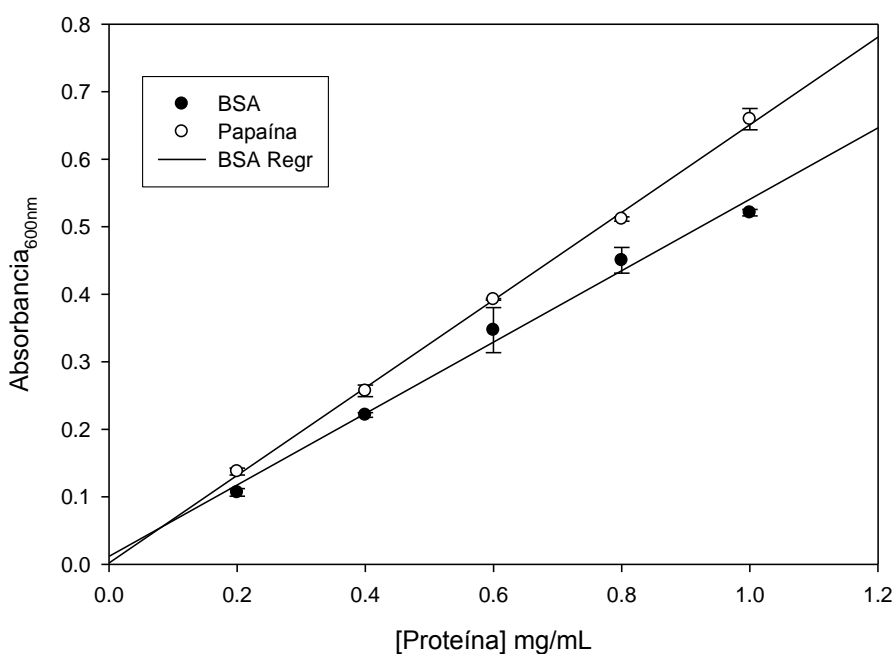
flujo de 1.5 ml por minuto. La solución desalinizada fue precongelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  y liofilizada a  $-45^{\circ}\text{C}$  y 0.045 mbar de presión durante seis horas. Se obtuvo un polvo de color blanco con bastante volumen.

### 3. Resultados

#### *Ensayos para determinación de proteína*

Los gráficos obtenidos al medir las 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 gráfico 2:

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



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

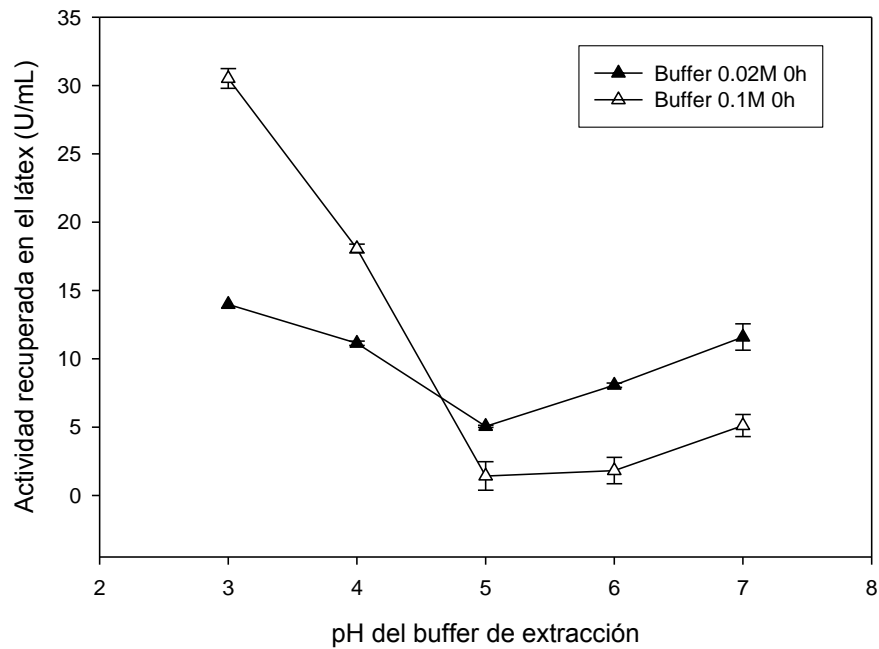
#### *Recuperación de actividad en función del pH*

Se logró recuperar 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. Ver Gráfico 3.

### *Efectos de la concentración del buffer*

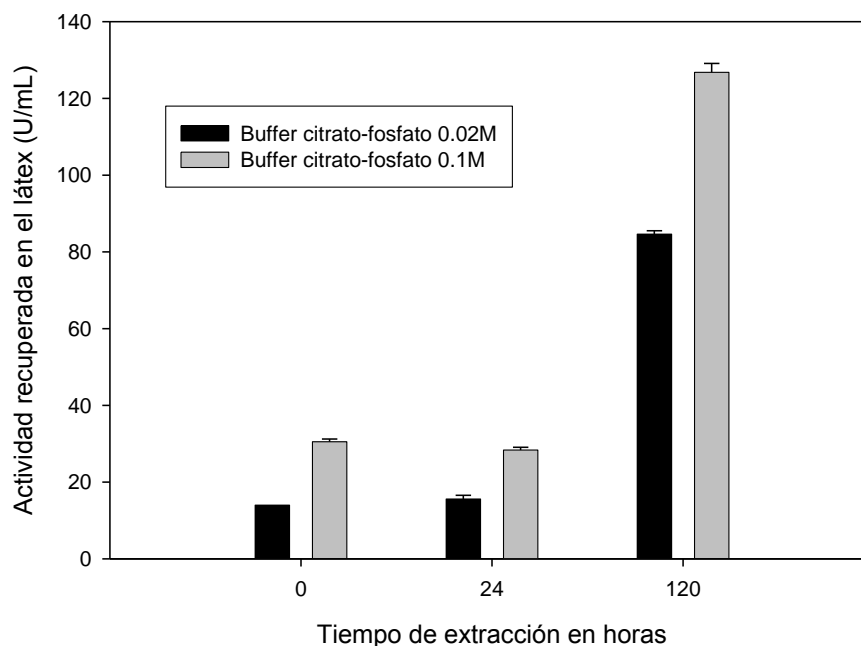
Para todos los tiempos, el buffer citrato-fosfato pH 3.0 de mayor concentración molar, produjo un mayor número de unidades recuperadas. Un mayor tiempo de extracción también produjo mayor recuperación (Ver Gráfico 4).

Extracción con buffer citrato-fosfato 0.01M ó 0.1M pH 3, 4 5, 6 y 7



**Gráfico 3: Recuperación de unidades de enzima a diferentes pH de extracción.**

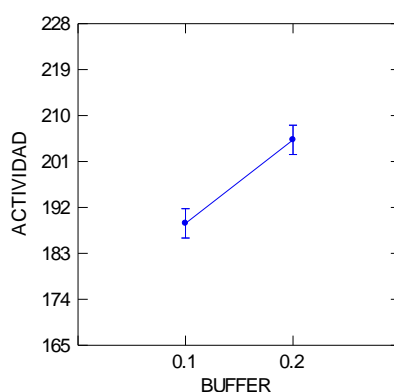
Cantidad de unidades recuperadas por extracción con buffer citrato-fosfato 0.01M y 0.1M pH 3.0 según tiempo de extracción de 0, 24 y 120h



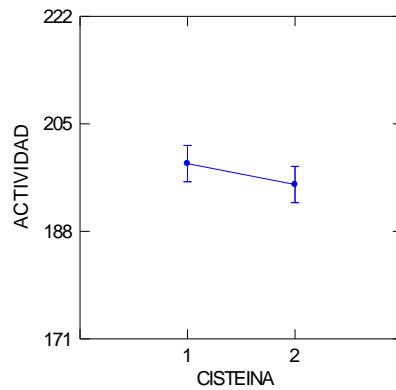
**Gráfico 4: Efectos del tiempo de extracción en la recuperación de enzima.**

### *Experimentos Factoriales*

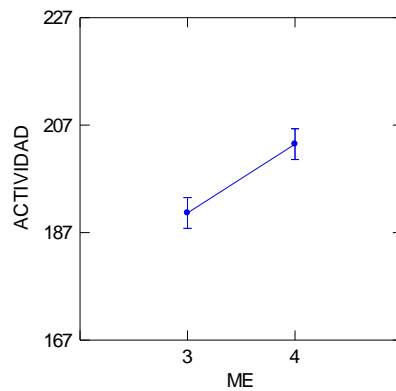
Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) a los resultados obtenidos del experimento factorial. Se muestra los efectos individuales de la concentración de buffer citrato-fosfato pH 3.0, en concentración 0.1 y 0.2 M (ver Gráfico5), la concentración de cisteína 0 y 50mM (ver Gráfico 6) y la concentración de 2-mercaptoetanol 0 y 50mM (ver 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 ( $p=0.004$ ).**

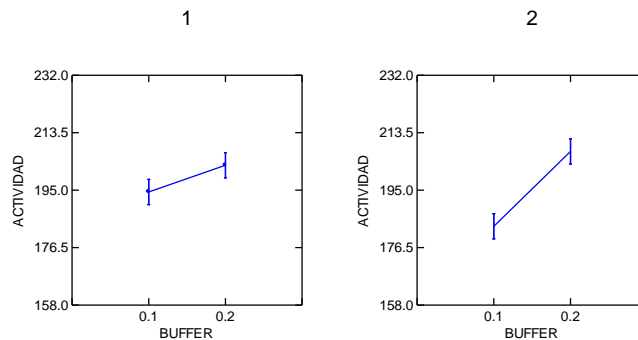


**Gráfico 6 Efecto de la concentración de cisteína (1=0 mM y 2=50 mM) de cisteína en la extracción de papaína (no significativo)**

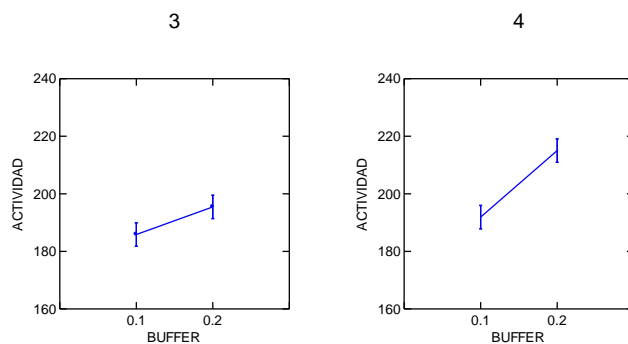


**Gráfico 7: Efecto de la concentración de 2-mercaptoetanol (3=0 mM y 4= 50mM) en la extracción de papaína (p=0.013).**

Se encontró efectos independientes entre la concentración de buffer empleado y la concentración de cisteína (ver Gráfico 8) o 2-mercaptoetanol (ver Gráfico 9).

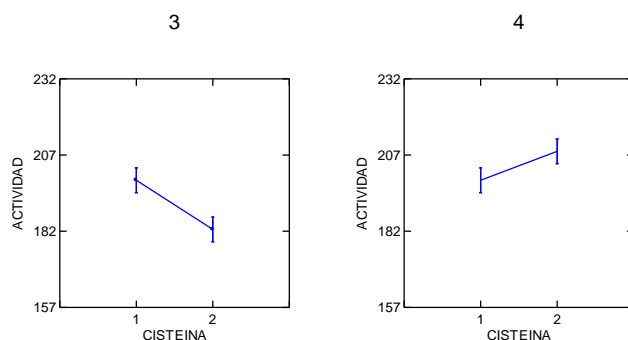


**Gráfico 8: Efectos combinados de la concentración del buffer (0.1 y 0.2 M) y cisteína (0 y 50 mM)**



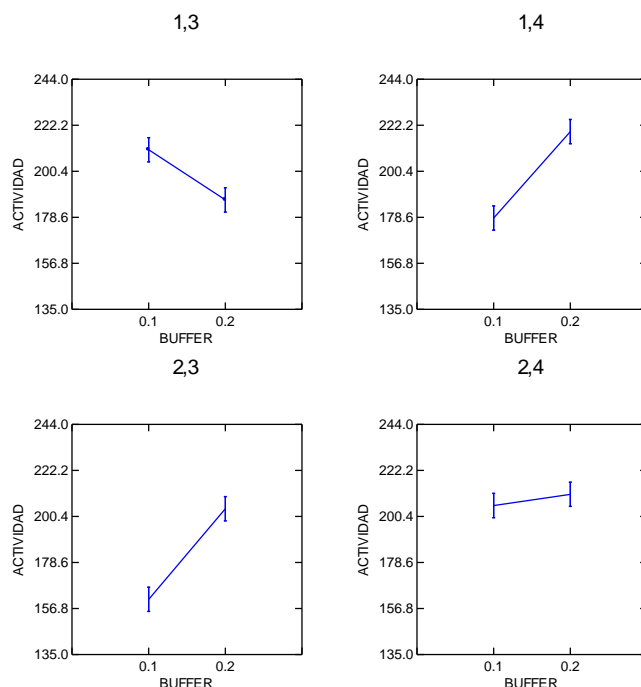
**Gráfico 9: Efectos combinados de la concentración de buffer (0.1 y 0.2 M) y 2-mercaptoetanol**

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)**

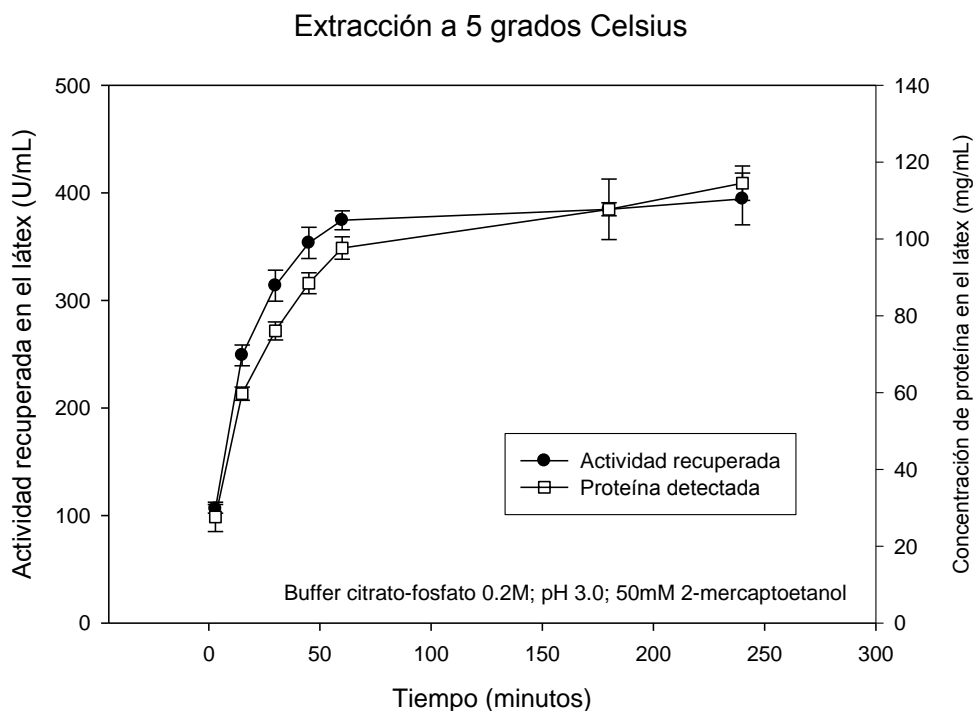
El Gráfico 11 muestra los efectos combinados para los tres factores en los cuatro niveles ensayados (Buffer Citrato-Fosfato 0.1 y 0.2M, cisteína 0mM (1) y 50mM (2), 2-mercaptoetanol 0mM (3) y 50mM (4)). Se encontró una interacción significativa entre los tres factores ( $p=0.000$ ).



**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)**

### *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 (ver 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 (ver 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 (ver 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.

Recuperación de actividad versus tiempo de extracción a temperatura alta y baja

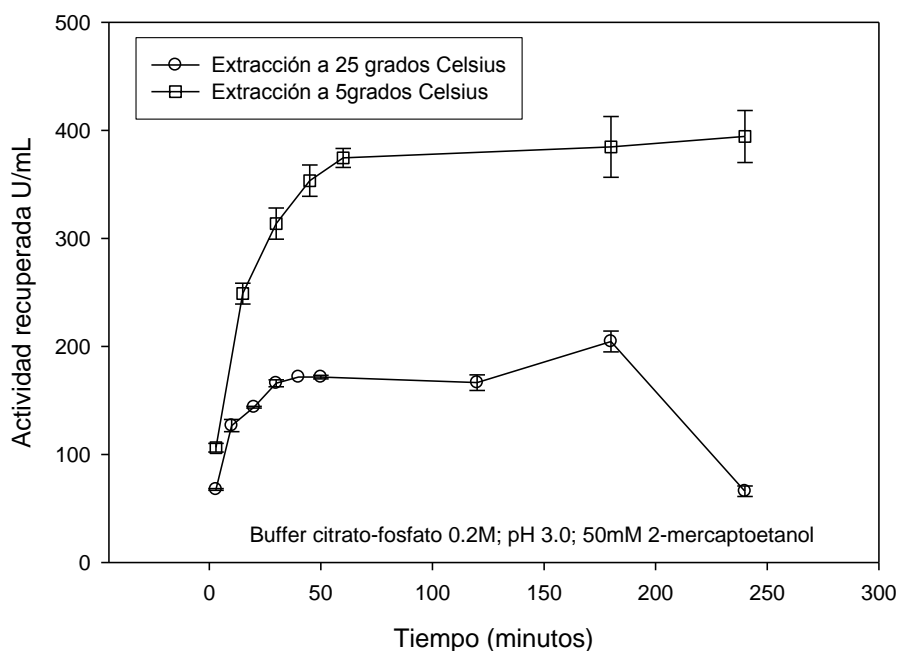


Gráfico 13: Actividad recuperada durante extracción a 5° y 25° C.

Concentración de proteína extraída en función del tiempo de extracción a temperatura ambiente y baja temperatura

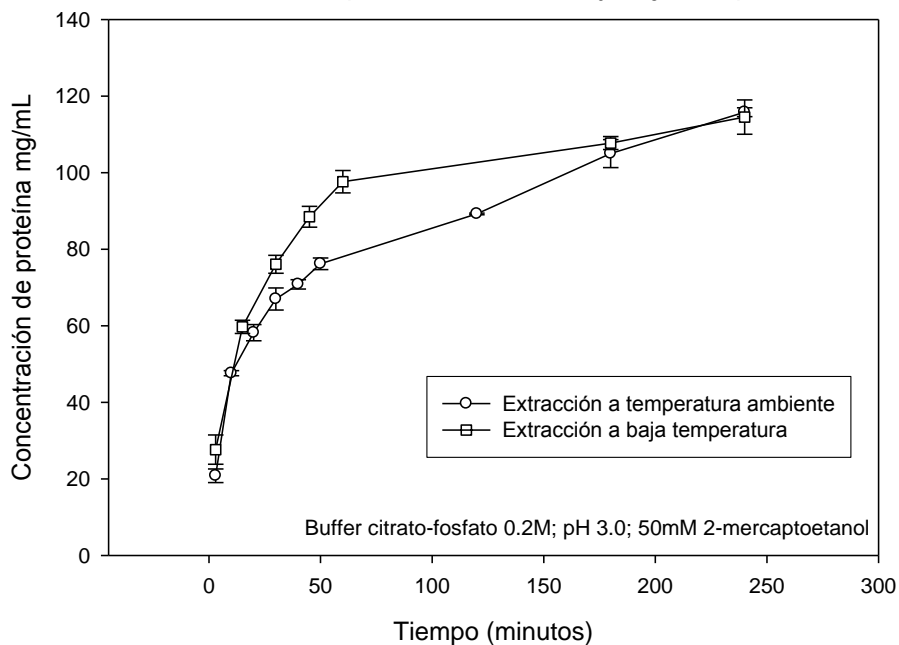
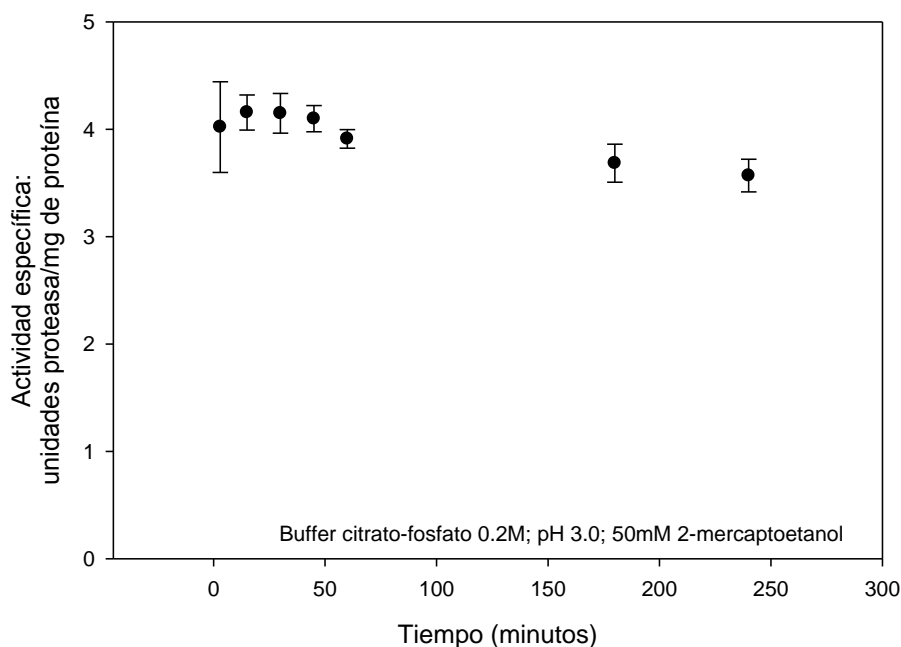


Gráfico 14: Concentración de proteína extraída a 5° y 25° C.

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 (ver Gráfico 15). Por ello el tiempo de extracción para las condiciones ensayadas se estima entre 40 y 50 minutos.

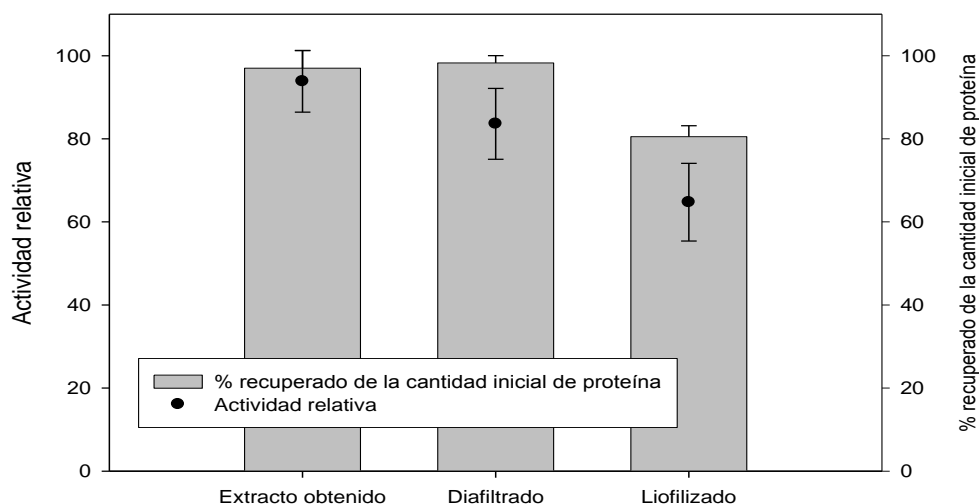


**Gráfico 15: Actividad específica versus tiempo.**

### ***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 tres minutos. También se incluye la determinación de la cantidad de proteína recuperada. Se recuperó 80% de la proteína y se retuvo el 65% de la actividad inicial. El producto obtenido es un polvo blanco muy soluble en agua.

Actividad relativa y cantidad de proteína recuperadas según etapa de tratamiento



### ***Balace de masa para el proceso de extracción y purificación de papaína***

El Gráfico 16 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

1) Buffer de extracción pH = 3: por 100 mL

39.8 mL de ácido cítrico + 10.2 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O

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 buffer

Entonces, para preparar 100 mL de buffer se requiere:

0.7646 g de ácido cítrico

0.7313 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O

0.39065 g de 2-mercaptoetanol

Completar con agua

2) Solución de NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> al 40%:

Se utiliza 0.243 g /mL

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

**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 =  $75.314 + 18.0986 = 93.4126 \text{ g}$

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 =  $9 \times 4.4369 = 39.9321 \text{ g}$

Líquido inicial de la liofilización

$$\text{Masa total} = 4.4369 + 39.9321 = 44.369 \text{ g} \quad \text{volumen total} = 40 \text{ mL}$$

Masa de papaína purificada =  $0.5 / 30 \times 40 = 0.67 \text{ g}$

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

El factor de escalamiento fue:  $1/8$

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PAPAÍNA A PARTIR DEL FRUTO DE PAPAÑA  
BALANCE DE MATERIA PARA UNA BASE DE 1 KILO DE LATEX

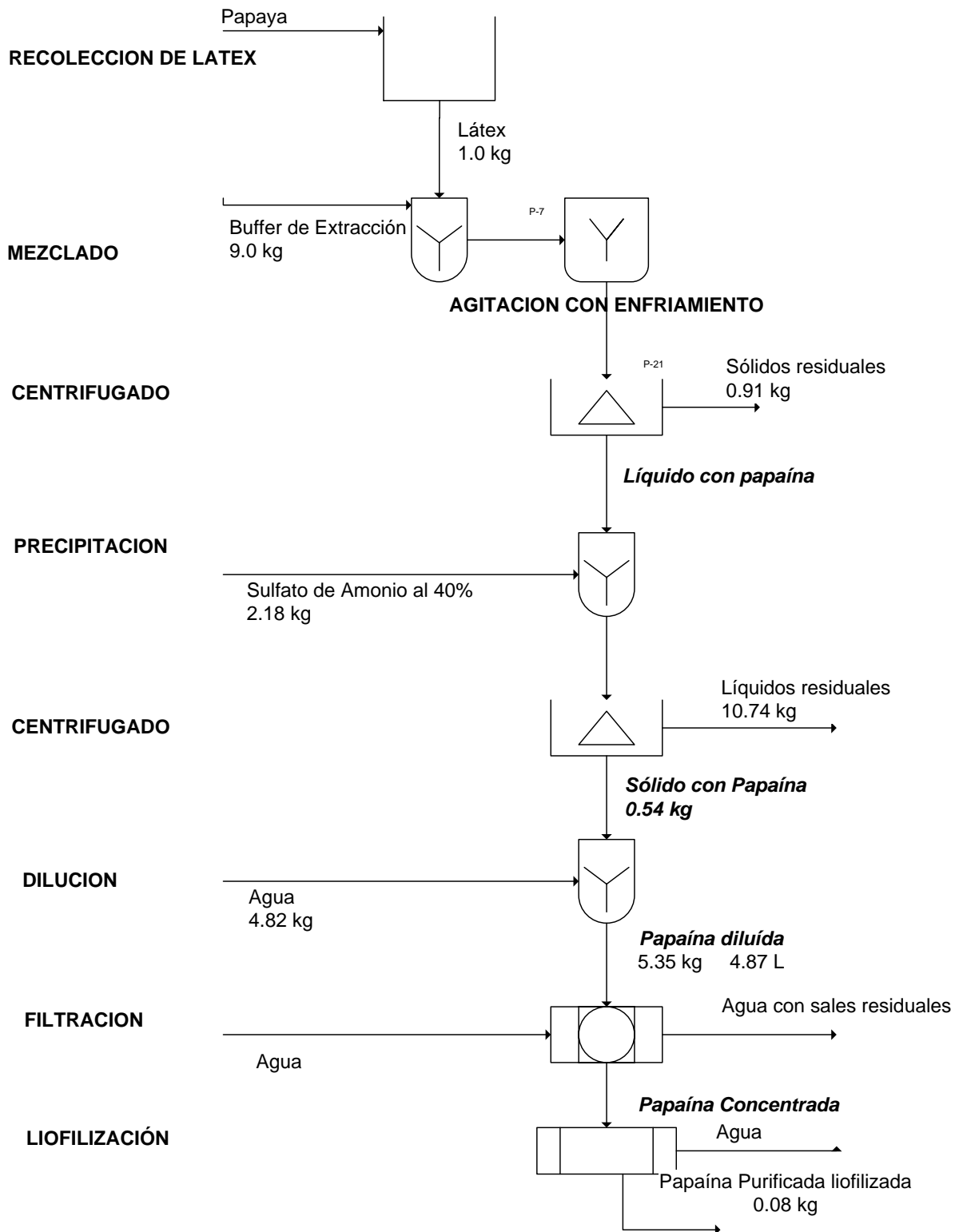


Gráfico 16: Balance de masa en base a los procesos experimentales desarrollados

## Estimación de costos

### DETERMINACION DE P. U.

	Cantidad	Costo(\$)	P.U
Látex	1	0.05	0.050
Agua Bidestilada (L)	20	0.0427	0.85
<b>Descripción</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo(\$)</b>	<b>P.U</b>
Acido cítrico, g	0.7646	0.0542	0.041
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12 H <sub>2</sub> O, g	0.7313	0.0724	0.053
2-mercaptoetanol, g	0.39065	0.101	0.039
Agua bidestilada	0.0985	0.85	0.084
<b>Costo Buffer de Extracción pH =3 por 100 mL</b>			<b>0.218</b>
<b>Por kg Costo Buffer pH=3</b>			<b>2.180</b>
<b>Agitador Magnético</b>			
Agitador Magnético(x hr)	21600	400	0.019
Electricidad(kwh)	0.012	0.3	0.004
<b>Incubadora</b>			
Incubadora(x hr)	36000	3000	0.083
Electricidad(kwh)	1	0.3	0.300
<b>Centrífuga</b>			
Centrífuga(x hr)	36000	1500	0.042
Electricidad(kwh)	0.065	0.3	0.020
<b>Solución de Amonio al 40%</b>			
Sulfato de amonio	0.872	40.8	35.58
Agua Bidestilada	1.308	0.08	0.11
<b>Costo Solución de Amonio al 40%</b>			<b>35.69</b>
<b>Filtración Tangencial</b>			
Bomba Peristáltica			
Agitador Magnético			
Equipo	43200	1500	0.035
Electricidad(kwh)	0.0373	0.3	0.011
<b>Liofilización</b>			
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
<b>Mano de Obra</b>			
Investigador	4	77.193	19.298
Auxiliar	4	56.140	14.035

	Cantidad	P.U	Costo
<b>Mezclado y Agitación con enfriamiento</b>			
Látex	1.000	0.05	0.05
Buffer de extracción	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
<b>Costo Proceso 1 Mezclado y Agitación con enfriamiento (\$)</b>			<b>53.52</b>
Cantidad procesada	10.000		
<b>Costo unitario Proceso 1 Mezclado y Agitación con enfriamiento (\$)</b>			<b>5.352</b>
Factor de escalamiento	120.69		
<b>Centrifugado</b>			
Costo Proceso 1 Mezclado y Agitación con enfriamiento (\$)	10.00	5.35	53.52
Depreciación del Equipo(hr)-Centrífuga	0.50	0.04	0.02
Electricidad(kwh)-Centrífuga	0.50	0.02	0.01
Investigador	0.50	19.30	9.65
Auxiliar	0.50	14.04	7.02
<b>Costo Proceso 2 Centrifugado</b>			<b>70.22</b>
Sólidos residuales(kg)	0.91		4.00
Cantidad procesado(kg)	9.090		
<b>Costo unitario Proceso 2 Centrifugado</b>			<b>7.725</b>
Factor de escalamiento	120.69		
<b>Costo del Proceso</b>			<b>16.70</b>
<b>Precipitación</b>			
Costo Proceso 2 Centrifugado	9.09	7.72	70.22
Sulfato de amonio al 40%	2.18	35.69	77.80
Depreciación del Equipo(hr)-Agitador	0.17	0.02	0.00
Electricidad(kwh)-Agitador	0.17	0.00	0.00
Investigador	0.2	19.30	3.86
Auxiliar	0.2	14.04	2.81
<b>Costo Proceso 3 de Precipitación</b>			<b>154.69</b>
Cantidad procesado(kg)	11.270		
<b>Costo unitario Proceso 3 Precipitación</b>			<b>13.726</b>
Factor de escalamiento	120.65		
<b>Costo del Proceso</b>			<b>84.47</b>
<b>Centrifugado</b>			
Costo unitario Proceso 3 Precipitación	11.270	13.726	154.69
Depreciación del Equipo(hr)-Centrífuga	0.083	0.04	0.00
Electricidad(kwh)-Centrífuga	0.083	0.020	0.00
Investigador	0.15	19.30	2.89
Auxiliar	0.15	14.04	2.11

<b>Costo Proceso 4 Centrifugado</b>		<b>159.69</b>
Sólidos residuales(kg)	10.74	
Cantidad procesado(kg)	0.54	
<b>Costo unitario Proceso 4 Centrifugado</b>	<b>295.73</b>	
Factor de escalamiento	121.71	
<b>Costo del Proceso</b>	<b>5.01</b>	

#### COSTOS PROCESO PURIFICACION PAPAINA(CONTINUACION)

<b>Dilución</b>	Cantidad	P.U	Costo
Costo Proceso 4 Centrifugado	0.54	295.73	159.69
Agua de dilución	4.82	0.08	0.41
Depreciación del Equipo(hr)-Agitador	0.25	0.019	0.00
Electricidad(kwh)-Agitador	0.25	0.004	0.00
Investigador	0.3	19.30	5.79
Auxiliar	0.3	14.04	4.21
<b>Costo Proceso 5 Dilución</b>			<b>170.10</b>
Cantidad procesado(kg)	5.36		
<b>Costo Unitario Proceso 5 Dilución</b>	<b>31.74</b>		
Factor de escalamiento	120.70		
<b>Costo del Proceso</b>	<b>10.41</b>		

<b>Filtración Tangencial</b>	Cantidad	P.U	Costo
Costo Proceso 5 Dilución	5.360	31.74	170.10
Agua de desalinización	5.360	0.85	4.58
Depreciación del Equipo(hr)-Filtración Tangencial	1.000	0.03	0.03
Electricidad(kwh)-Filtración Tangencial	1.000	0.01	0.01
Investigador	1.50	19.30	28.95
Auxiliar	1.50	14.04	21.05
<b>Costo Proceso 6 Filtración Tangencial</b>			<b>224.73</b>
Cantidad procesado(kg)	5.360		
<b>Costo Unitario Proceso 6 Filtración Tangencial</b>	<b>41.93</b>		
Factor de escalamiento	120.81		
<b>Costo del Proceso</b>	<b>54.62</b>		

<b>Liofilización</b>	Cantidad	P.U	Costo
Costo Proceso 6 Filtración Tangencial	5.360	41.93	224.73
Depreciación del Equipo(hr)-Precongelador	1.00	0.139	0.14
Electricidad(kwh)-Precongelador	1.00	0.210	0.21
Depreciación del Equipo(hr)-Liofilización	10.00	0.340	3.40
Electricidad(kwh)-Liofilización	10.00	0.210	2.10
Investigador	2.00	19.30	38.60
Auxiliar	5.00	14.04	70.18
<b>Costo Proceso 7 Liofilización</b>			<b>339.35</b>
Papaína Liofilizada(kg)	0.08		
<b>Costo Unitario Proceso 7 Liofilización</b>	<b>4241.86</b>		

<b>Rendimiento en la liofilización</b>	<b>0.0149</b>
Factor de escalamiento	120.81
<b>Costo del Proceso de Liofilización</b>	<b>114.62</b>

#### 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 and 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, la autodigestión de la papaína por la propia papaína (Greenberg and 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 en el pH óptimo (Kimmel and 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 de ambientes reductores (Gegenheimer 1990), máxime si la enzima de interés requiere de agentes que prevengan la oxidación (Baines and Brocklehurst 1979) (Monti, Basilio et al. 2000). Por ello se evaluó 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 dos niveles y tres factores. El tercer factor fue la concentración del buffer de extracción con una fuerza iónica superior mayor (0.1 y 0.2M) para aumentar la compatibilidad con las concentraciones de solutos encontradas en el látex (Gegenheimer 1990). Se encontró 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 (ver el Gráfico 12) son cuatro 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 proteínas 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 80g. de papaína a partir de 1Kg. de látex fresco. El estimado de costos indica que la producción de 1Kg. 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 a la misma.

## 5. Conclusiones

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Al final de la liofilización se recupera 80% de la proteína total y 65% de la actividad original.
5. El producto obtenido es soluble en agua y puede ser estandarizado para ser comercializado para aplicaciones en la industria de alimentos.
6. El proceso descrito permite obtener 80g. de papaína por Kg. de látex fresco.
7. La producción de 1 Kg. de papaína purificada y liofilizada tiene un costo estimado de US\$ 4 241.86.

Los autores agradecen al Instituto de Investigación de la Universidad de Lima por haber auspiciado la investigación y a la Facultad de Ingeniería Industrial, por las facilidades brindadas para el trabajo en los laboratorios.

## Bibliografía

BAINES, B. S. and K. Brocklehurst

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.» En: *Biochemical Journal* 177: 541-548.

CORNISH-BOWDEN, A.

1995a *Analysis of enzyme kinetic data*. Oxford, Oxford University Press.

1995b *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Cambridge, Portland Press.

CHAIWUT, P., P. Kanasawud, et al.

2007 «Solid-to-solid peptide synthesis by glycyI endopeptidase.» En: *Enzyme and Microbial Technology* 40(4): 954-960.

DUKE, J. A.

s.f «*Carica papaya* L»

En: [http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke\\_energy/Carica\\_papaya.html#Description](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Carica_papaya.html#Description).

Fecha de consulta: 12/09/2013

DUKE, J. A. and J. L. DuCellier

1993 *CRC Handbook of Alternative Cash Crops*. Boca Raton, FL, CRC Press.

FIDO, R. J., E. N. Clare Mills, et al.

2004 «Protein Extraction From Plant Tissues. *Methods in molecular biology*.» En: J. Walker. Totowa, NJ, *Humana Press*. 244: 21-27.

GEGENHEIMER, P.

1990 «Preparation of Extracts from Plants. *Guide to Protein Purification*.» En: M. P. Deutscher. San Diego, *Academic Press*. 182: 174-193.

GREENBERG, D. M. and T. Winnick

1940 «Plant Proteases: pH-Activity Curves.» En: *The Journal of Biological Chemistry* 2: 775-780.

KIMMEL, J. R. and E. L. Smith

1954 «Crystalline papain. I. Preparation, specificity, and activation.» *J Biol Chem* 207: 515-530.

Instituto Nacional de Estadística e Informática (Perú).

s.f. «Precios promedios pagados al productor (En Chacra) de los principales productos agropecuarios 2000-2010».

<<http://www.inei.gob.pe/biblioineipub/.../Cap12053.XLS%E2%80%8E>> Fecha de consulta: 12/09/2013.

MONTI, R., C. A. Basilio, et al.

2000 «Purification of Papain from Fresh Latex of *Carica papaya*.» En: *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 43(5): 501-507.

MORTON, J. F.

1977 *Major medicinal plants: botany, culture and use*. Springfield, IL, Charles C. Thomas.

NITSAWANG, S., R. Hatti-Kaul, et al.

2006 «Purification of papain from *Carica papaya* latex: Aqueous two-phase extraction versus two step salt precipitation.» En: *Enzyme and Microbial Technology* 39(39): 1103-1107.

ROBERTS, S. M., N. J. Turner, et al.

1995 *Introduction to biocatalysis using enzymes and micro-organisms*. Cambridge, Cambridge University Press.

SARATH, G., M. G. Zeece, et al.

2001 «Protease Assay Methods.» En: *Proteolytic Enzymes*. R. Beynon and J. S. Bond. New York, Oxford University Press: 45-76.

SILVA, L. G., O. García, et al.

1997 «Changes in protein profile during coagulation of latex from *Carica papaya*.»  
En: *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30: 615-619.

Stoll, V. S. and J. S. Blanchard

1990 «Buffers: Principles and Practice». En: *Methods in Enzimology: Guide to protein purification*. M. P. Deutscher. San Diego, Academic Press. 182: 24-38.

STOSCHEK, C. M.

1990 «Quantitation of protein.» *Guide to protein purification*. M. P. Deutscher. San Diego, Academic Press. 182: 50-68.