

**ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL****ACTIVITY OF PAPAIN FROM LATEX OF *VASCONCELLEA CANDICANS* (A. GRAY) A. DC 1864 "MITO" AND BIOMETRIC ANALYSIS OF FRUIT****ACTIVIDAD DE PAPAÍNA DEL LÁTEX DE *VASCONCELLEA CANDICANS* (A. GRAY) A. DC 1864 "MITO" Y ANÁLISIS BIOMÉTRICO DEL FRUTO**Ana Gutiérrez¹ & Carlos Santa Cruz²^{1,2}Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular – Facultad de Ciencias Naturales y Matemática (FCCNM) – Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima–Perú¹anaisabelflor@gmail.com

The Biologist (Lima), 14(2), jul-dec: 327-337.

ABSTRACT

Papain is a cysteine protease (EC 3.4.22.2) extracted from the latex of *Carica papaya* L. (papaya) and has the ability to hydrolyze peptide bonds of the carbonyl group of aromatic amino acid residues and arginine, lysine or glutamine. The family includes many species of Caricaceae within which is *Vasconcellea candicans* A. Gray A. DC "mito", a characteristic bush from the hills of Peru. Our aim was to make a biometric analysis, obtain the index latex, and measure the specific activity of the enzyme papain in fresh latex in the fruits of "mito" from some hills in the Department of Lima, Peru. Our results indicate that the length and weight of the fruit of "mito" of the Quebrada Verde (Pachacamac) hill were significantly lower (9.417 ± 1.95 cm, 81.29 ± 14.45 g, respectively) with respect to the fruits harvested from the hills of District Huarochiri, Chamaure (Santo Domingo de Olleros) and Mital (San Bartolome). The index of seeds (107-111) and index latex (0.77-1.39) was significantly higher in the fruits of the hills of Quebrada Verde relative to the other hills studied. Specific activity of papain in fresh latex and that stored in semipurified acetate buffer of pH 7.5 of "mito" was 1.6 and 1.83 times respectively, of that found in the fresh latex of papaya. These results indicate the potential of *V. candicans* as a source of papain, however it requires additional studies.

Keywords: Biometric analysis – *Carica papaya* – Fruit latex – "Mito" – Papain – *Vasconcellea candicans*

RESUMEN

La papaína es una cisteína proteasa (EC 3.4.22.2) que se extrae del fruto de *Carica papaya* L. (papaya), y tiene la capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos del grupo carbonilo de residuos de aminoácidos aromáticos y de arginina, lisina o glutamina. La familia Caricaceae agrupa muchas especies dentro de las cuales esta *Vasconcellea candicans* A. Gray A. DC “mito”, un arbusto característico de las lomas de Perú. Nuestro objetivo fue hacer un análisis biométrico, obtener el índice de látex y medir la actividad específica de la enzima papaína en látex fresco y almacenado en los frutos de “Mito” obtenidos de algunas lomas del Departamento de Lima, Perú. Nuestros resultados indican que la longitud y el peso del fruto de “mito” de la loma Quebrada Verde (Pachacamac) fueron significativamente menores ($9,417 \pm 1,95$ cm; $81,29 \pm 14,45$ gr; respectivamente) con respecto a los frutos recolectados de las lomas del Distrito de Huarochiri, Chamaure (Santo Domingo de Olleros) y el Mital (San Bartolome). El índice de semillas (107-111) y el índice de látex (0,77-1,39) fue significativamente mayor en los frutos de las lomas de Quebrada Verde con respecto a los de las otras lomas estudiadas. La actividad específica de papaína en el látex fresco y en el látex almacenado en buffer acetato a pH 7,5 semipurificada de “mito” fue 1,6 y 1,83 veces mayor respectivamente, que la encontrada en el látex of papaya. Estos resultados nos indican el potencial de la especie *Vasconcellea candicans* (mito) como fuente de papaína, sin embargo se requiere de estudios adicionales.

Palabras clave: Análisis biométricos – *Carica papaya* – Látex fruto – “Mito” – Papaína – *Vasconcellea candicans*

INTRODUCCIÓN

La papaína es una cisteína proteasa (EC 3.4.22.2) que se extrae del fruto de *Carica papaya* L. (papaya) y de papayas silvestres (género *Vasconcellea*), que tiene la capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos del grupo carbonilo de residuos de aminoácidos aromáticos y de arginina, lisina o glutamina. Esta enzima es análoga en funciones a la pepsina que se encuentra en el estómago humano e hidroliza las proteínas de la dieta (Thomas *et al.* 1994).

La papaína (PM 23.4 KD) está contenida en un líquido blanco (látex) extraído mediante incisiones superficiales de los frutos inmaduros de la papaya, del cual se debe separar la enzima y purificarla para su comercialización y uso. Los extractos acuosos del látex de *C. papaya* contienen además otras proteasas, entre ellas la quimopapaína (PM 27

kD). La enzima en estado líquido presenta actividad, aún, si se le mantiene en refrigeración hasta por un periodo de seis meses (Nakasone & Paull 1998).

La cualidad principal de la papaína es su uso farmacéutico, alimenticio o en aplicación industrial como ablandador y aclarador de diversas sustancias. En la industria cosmética, se aprovecha su capacidad para remover manchas de la piel así como su poder cicatrizante (Neidlema 1991).

Uno de los principales problemas que se tiene sobre la papaína es que a pesar de los avances biotecnológicos, todas sus propiedades no se han podido reproducir en una enzima sintética, por lo que papaína se torna insustituible en su estado natural, por ejemplo para la producción anual de cerveza se requiere alrededor de 500 t como clarificador. El otro problema es que hoy en día, la demanda de este insumo actualmente es de 900 a 1000 t al año a nivel mundial y

existe una brecha de producción no cubierta de al menos 100 t, la cual crecerá en los próximos años debido a los nuevos usos que se le está encontrando a la papaína y que todavía no se desarrollan a niveles industriales.

La familia Caricaceae agrupa muchas especies dentro de las cuales las papayas silvestres son reconocidas por tener altas actividades de papaína (NRC 1989). Un integrante de esta familia es *Vasconcellea candicans* (A. Gray) A. DC 1864 (mito), un arbusto característico de las lomas peruanas, que tiene importancia ecológica como captador de neblina, productor primario junto con el estrato arbustivo-arbóreo, así como también es hábitat y nicho ecológico de organismos importantes, para mantener el ciclo de materia y energía (Cuya 1992). Además, Scheldeman *et al.* (2003) menciona que las propiedades fitoquímicas y enzimas proteolíticas de las papayas silvestres son muy prometedoras y la investigación en este ramo solo está en su etapa preliminar.

Nuestro objetivo principal fue evaluar la actividad enzimática específica de la papaína en el látex de *V. candicans* y el análisis biométrico del fruto.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRA

Obtención de los frutos verdes

Carica papaya L. (papaya común). Se obtuvieron cuatro papayas del Mercado Mayorista de Frutas de la ciudad de Lima, Perú de una población de 1000 frutos por muestreo simple y aleatorio.

Vasconcellea candicans (A. Gray) A. DC (Mito). Se obtuvieron seis frutos de las lomas del distrito de Huarochirí, seis frutos de las lomas Quebrada verde (Distrito de Pachacamac, Provincia de Lima), 22 frutos de las lomas El Mital (Distrito de San Bartolomé,

Provincia de Huarochirí) y seis frutos de las lomas de Chamaure, (Distrito Santo Domingo de Olleros Provincia de Huarochirí), Perú. De esta población de 40 frutos, por muestreo simple y aleatorio se extrajeron 10 papayas “mitos” para analizar la actividad enzimática específica de la papaína.

Materiales

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal. Equipos: Congelador a -20°C, estuche de disección, tubos, pipetas, probetas, vasos de precipitación, microcentrífuga refrigerada (HETTICH); balanza analítica (OHAUS/AP210-0), calibrador vernier (SOMET), Espectrofotómetro (SHIMADZU/UV-1700), baño de maría (GEMMY. CO/YCW-010E); Cámara fotográfica digital. Reactivos: NaOH 0,1 y 0,3 M, EDTA 1mM, pH 7,0; buffer acetato de sodio 10 mM con acetato de calcio 5 mM a pH 7,5 a 37°C; buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 7,5 a 37 °C; solución de caseína 0,65 % (w/v); ácido tricloroacético 110 mM; reactivo Folin Ciocalteu's fenol; solución de carbonato de sodio 500mM (Na₂CO₃); solución estándar de L-Tirosina 1,1 mM (P.M. 181,19), (Todos estos reactivos son de Sigma-Aldrich). El resto de los reactivos fueron de grado analítico.

PROCEDIMIENTO

Para la recolección de las muestras

Se recolectaron frutos verdes de *V. candicans* en forma manual, dejándose un pequeño péndulo de tallo de aproximadamente de 2,0 cm. Cada fruto fue cuidadosamente guardado en una bolsa de papel y almacenado en una caja para su transporte al laboratorio.

Las papayas verdes obtenidas en el Mercado Mayorista de Frutas estuvieron totalmente enteras, sin cortes y se les transportó en cajas, al laboratorio. En el laboratorio, cada muestra (papaya y mito) fue desinfectada con lejía al

1% y cuidadosamente lavada con agua potable (estéril) y luego secada. A los mitos, según su lugar de origen se les midió la longitud (cm) y el peso fresco (g), se les extrajo el látex y se pesó (g). Posteriormente a los frutos maduros de “mito”, se les extrajo las semillas, se lavaron, se dejaron secar a flujo de aire, se pesaron y examinaron su forma.

Obtención del látex

A cada fruto después de su limpieza se les hicieron incisiones de 2-3 mm de profundidad con una hoja de bisturí estéril y se colectó el látex en una luna de reloj, previamente pesada. (Nitsawang *et al.* 2006). Terminada la recolección, se pesó rápidamente la luna de reloj conteniendo el látex para determinar el peso del látex de la siguiente forma:

$$\text{Peso látex (g)} = \text{peso luna de reloj con látex (g)} - \text{peso luna de reloj (g)}$$

La muestra de látex colectada de los 10 frutos seleccionados para analizar la actividad enzimática específica de la papaína, fueron dividida en tres partes iguales: A) Látex de muestra fresca. B) Látex de muestra en NaOH 0,3 M en una relación 1:1 (Ortiz *et al.* 1980). C) Látex en buffer acetato de sodio 10 mM, con acetato de calcio 5 mM a pH 7,5, en una proporción 1:1. Todas estas muestras fueron almacenarlas a -20°C hasta su uso.

Análisis biométrico

Se utilizaron 40 frutos, evaluándose en cada uno de ellos: longitud (cm) y peso del fruto fresco (g); la forma e Índice de Semillas (número de semillas/100 g fruto; y el Índice de látex (g de látex / 100 g de fruto).

Semipurificación de la papaína

Con las fracciones B y C descritas anteriormente se procedió según el diagrama de la figura 1.

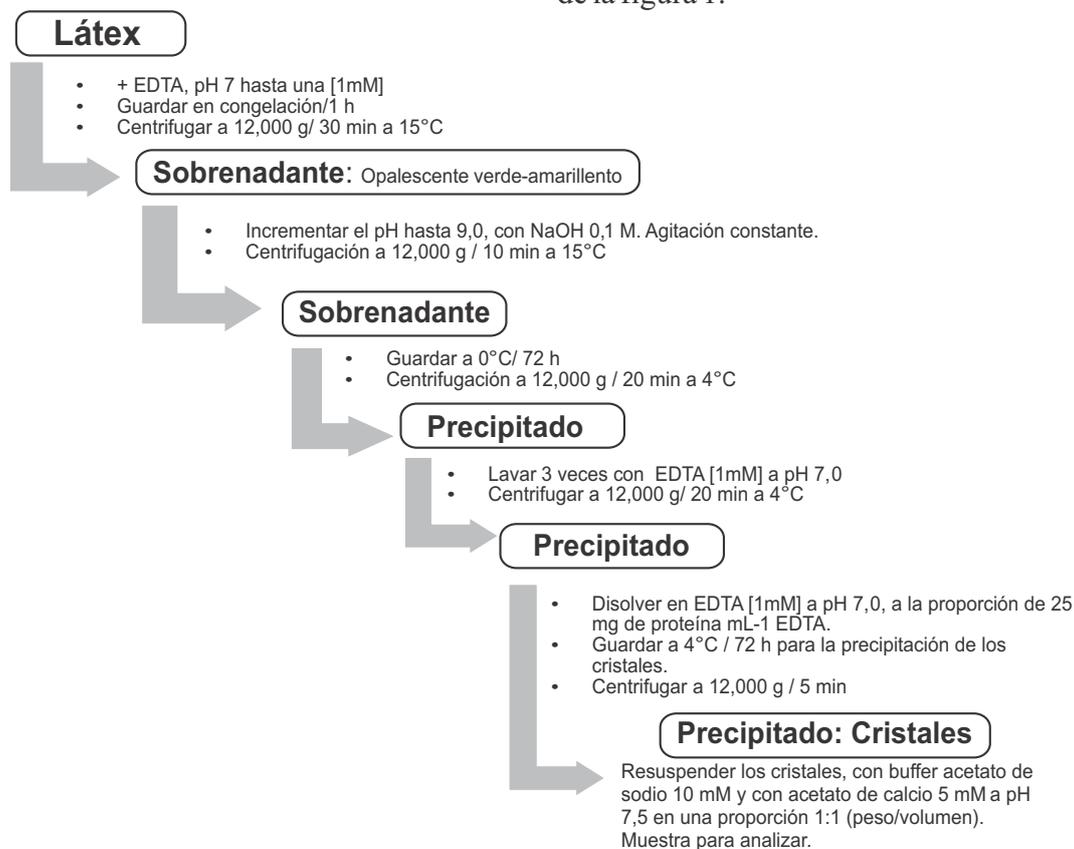


Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de semipurificación que se realizaron en las muestras B y C del látex del “mito”.

Actividad enzimática específica (AEE)

Se utilizó el protocolo de SSCASE01.001 (1999). El ensayo utilizó 455 µL de Buffer-Sustrato (caseína al 0,65% (p/v) en buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,5) y al cual se le adicionó 50 µL de la muestra A o B o C (semipurificadas), se incubó a 37°C por 10 min. La reacción fue detenida con 455 µL de ácido tricloroacético 110 mM y el sistema siguió en incubación por otros 30 min. Cada reacción tuvo su control negativo al cual se le adicionó la enzima después del tricloroacético. Los productos de la reacción fueron separados por centrifugación a 9000 g a 4°C. A 625 µL del sobrenadante se le adicionaron a 1570 µL de carbonato de sodio (500 mM), y 250 µL del reactivo de Folin & Ciocalteu's y se midió la absorbancia a 660 nm, cuyos valores se compararon con una curva patrón de L-Tirosina para estimar la actividad enzimática.

La Actividad Enzimática (AE) se definió como la cantidad de enzima que hidroliza caseína y produce un color cuya absorbancia equivalente a 1 µmol (181 µg) de L-Tirosina por min a pH 7,5 y 37°C (con reactivo de color Folin & Ciocalteu's). Nuestros resultados fueron convertidos a la unidad katal, sabiendo que 1katal equivale a 60 x 10⁶ unidades de actividad enzimática (AE).

$$AE = \frac{\mu kat}{mL \text{ Enzima}} = \frac{(\mu mol \text{ Tirosina}) (V_T)}{(V_E) (t)(V_C)}$$

Donde V_T es el volumen total del ensayo en mL, V_E es el volumen de la enzima utilizada en mL, t es el tiempo de la reacción en min, y V_C es el volumen usado en la reacción colorimétrica en mL.

La Actividad Enzimática Específica (AEE) de la enzima se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad Enzimática Específica (AEE)} = \frac{\mu kat}{mg \text{ proteína}}$$

Diseño experimental y Análisis de datos

Para la ejecución de los experimentos se empleó un diseño completamente al azar y los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza, comparación de medias mediante la prueba de Tukey y regresión lineal según correspondió, utilizando Programa Excel 2010.

RESULTADOS

El análisis biométrico de los frutos de *V. candicans* muestran que los frutos de lomas de Quebrada Verde Pachacamac presentaron diferencias significativas (p<0,05); en el peso y longitud (81,29 ± 14,45 g y 9,417 ± 1,95 cm respectivamente) fueron menores, mientras que en el índice de semillas (107 - 111) los valores fueron mayores respecto a los frutos obtenidos en las otras lomas. No habiendo diferencias significativas entre el peso de las semillas de las lomas en estudio (Tabla 1).

En los frutos de las lomas de Quebrada Verde el índice de látex (0,77 - 1,39) fue significativamente mayor, con respecto a los frutos de las otras lomas en estudio. Sin embargo se encontró una correlación positiva, entre el peso (g) del látex recolectado en cada fruto y el peso (g) de estos, con un r=0,86 para lomas de Quebrada Verde y con r > 0,92 para las otras lomas (Tabla 1).

El análisis del ANOVA a 95% de confiabilidad para la actividad enzimática específica (AEE) de la papaína de *V. candicans*, nos indica que hay diferencias significativas con la papaína de papaya, estas diferencias también se perciben en las diferentes formas de almacenamiento del látex.

Con el análisis de Tukey, encontramos que en el látex fresco de *V. candicans* la AEE de papaína fue significativamente más alta (α=0,05) que la obtenida en el látex de C.

Tabla 1. Análisis biométricos de frutos de *Vasconcellea candicans* (A. Gray) A. DC 1864 (mito), según procedencia.

	Lomas del Distrito de Huarochiri	Lomas de Quebrada Verde (Pachacamac)	Lomas de Chamaure (Santo Domingo de Olleros)	El Mital (San Bartolomé)
Peso fruto (g)	149,33 ± 34,15	81,29 ± 14,45*	135,56 ± 38,99	149,82 ± 70,32
Longitud fruto (cm)	12,783 ± 2,28	9,417 ± 1,95*	12,917 ± 2,56	10,367 ± 2,77
ratio ₁ (Peso/Longitud)	11,68	8,63*	10,49	14,45*
Índice Semillas (N° semillas/100g fruto)	79 - 110	107- 111	79 - 107	60 - 136
Peso de semilla (g)	0,0483 ± 0,0048	0,0405 ± 0,0093	0,0467 ± 0,0022	0,0406 ± 0,0022
Índice Látex (g látex/100g fruto)	0,39 - 0,71	0,77 - 1,39*	0,40 - 0,91	0,35 - 0,59
ratio ₂ (Peso fruto/Peso látex)	5,811 x 10 ⁻³	11,366 x 10 ⁻³	7,884 x 10 ⁻³	5,253 x 10 ⁻³
Peso fruto & Longitud fruto				
Coef. Correlación (r)	0,93	0,81	0,96	0,95
N°Semilla & Peso fruto				
Coef. Correlación (r)	0,96	0,90	0,95	0,97
N°Semilla & Longitud fruto				
Coef. Correlación (r)	0,96	0,90	0,95	0,97
PesoSemilla & N°Semilla				
Coef. Correlación (r)	0,96	0,92	0,97	0,97
Peso fruto & Peso látex				
Coef. Correlación (r)	0,94	0,86	0,93	0,92

* p<0,05

papaya (9,83 nkat.mg⁻¹proteína vs 6,14 nkat.mg⁻¹proteína). En el látex guardado con NaOH 0,3M y semipurificado la AEE fue 6,14 nkat.mg⁻¹proteína en mito y 4,31 nkat.mg⁻¹proteína en papaya, y en el látex guardado en

buffer acetato pH 7,5 y semipurificada la AEE fue 16,95 nkat.mg⁻¹proteína en la papaina de “mito” vs 9,20 nkat.mg⁻¹proteína en la papaina de papaya. Los datos se muestran en la figura 2, tabla 2 y 3.

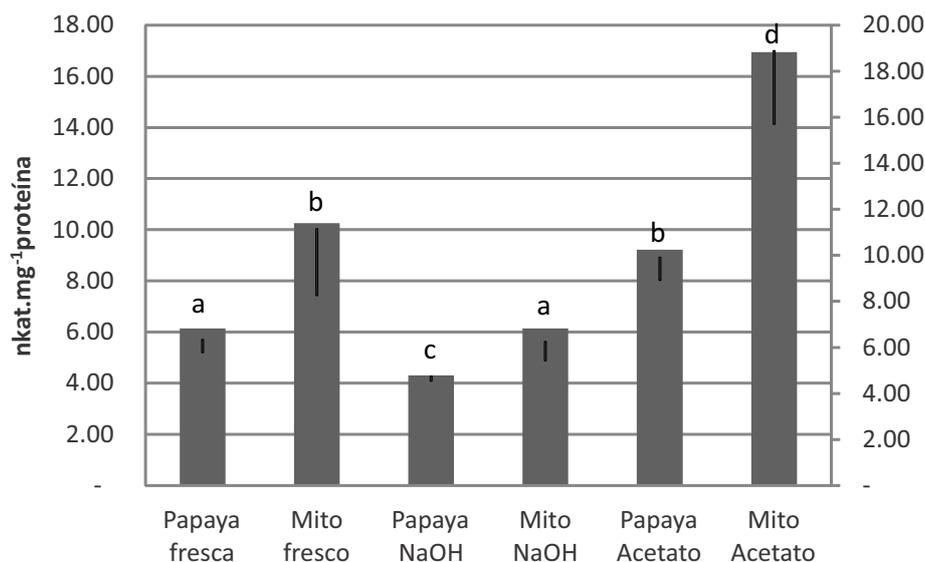


Figura 2. Actividad Enzimática Específica de Papaina (AEE) en el látex de *Carica papaya* y *Vasconcellea candicans* (nkat.mg⁻¹Proteína), en estado fresco y almacenadas con NaOH 0,3 M y buffer acetato a pH 7,5.

Tabla 2. Actividad enzimática específica (AEE) de papaina del látex de *Carica papaya* y *Vasconcellea candicans*, expresada en nkat.mg⁻¹proteína. (*)

Muestra (*)	Actividad Enzimática (nkat/mL)	Actividad específica (nkat /mg Proteína)	Eficiencia (%) con respecto a la muestra fresca	ratio
Frescas (Extracto crudo)				
<i>C. papaya</i>	28,24	6,14	100	1,00
<i>V. candicans</i> (mito)	42,69	9,83	160	1,60
Guardadas con NaOH 0,3N y purificadas parcialmente				
<i>C. papaya</i>	48,05	4,31	70	1,00
<i>V. candican</i> (mito)	65,41	6,14	143	1,43
Guardadas con Buffer Acetato, pH 7,5 y purificadas parcialmente				
<i>C. papaya</i>	58,25	9,20	150	1,00
<i>V. candicans</i> (mito)	84,62	16,95	184	1,84

(*) (Las comparaciones de eficiencia y ratio son entre las muestras en cada proceso)

Tabla 3. Prueba de Tukey de las medias de la actividad enzimática específica de los tratamientos de la tabla 2.

	Papaya fresca	Mito fresco	Papaya NaOH	Mito NaOH	Papaya Acetato	Mito Acetato
	PF	MF	POH	MOH	PA	MA
PF		-4.12	1.83	0.00	-3.08	-10.81
MF			5.95	4.12	1.05	-6.68
POH				-1.83	-4.91	-12.64
MOH					-3.07	-10.80
PA						-7.73
MA						

HSD = 2,3, $\alpha=0,05$.

DISCUSIÓN

Vasconcellea candicans antiguamente *C. candicans* rehabilitado por Badillo (2000, 2001) es una especie dioica con sexos separados de las lomas y puede vivir bajo deficiencia de agua. Tiene frutos comestibles del cual se puede extraer látex que es utilizado en forma empírica en la curación de algunas enfermedades. Esta especie está considerada por ley como especie en situación de Peligro Crítico (CR), según D.S. N° 043-2006-AG, que aprueba la categorización de especies amenazadas de flora silvestre.

Análisis biométrico de los frutos de *Vasconcellea*

Al analizar la longitud de los frutos de “mito”, de los diferentes lugares de procedencia se encontró que estos fluctuaron entre 7,47 cm (lomas de Quebrada Verde, Pachacamac) hasta 15,48 cm (lomas de Chamaure en Santo Domingo de Olleros) y en promedio se encontraron entre un rango de 9,42 a 12,92 cm, los cuales concuerdan con el tamaño de los frutos que se producen en la Reserva Nacional de Lachay – Huaura, los que en promedio se registran entre 8,0 a 13,0 cm (MVMT 2007), teniendo mayor tamaño que la especie ecuatoriana *V. cundinamarcensis* V.M. Badillo, cuyas longitudes fluctúan entre 7 a 10 cm, según lo reportado por Vidal *et al.* (2009).

El análisis de los pesos de los frutos de “mito” de los diferentes lugares de procedencia nos indica que estos fluctúan entre 66,84 g (lomas de Quebrada Verde, Pachacamac) y 220,14 g (lomas El Mital, San Bartolomé), no encontrándose diferencia con los reportados para la Reserva Nacional de Lachay – Huaura (41 a 203 g), ni con los reportados para *V. cundinamarcensis* (61,6–216,3 g), *V. stipulata* V.M. Badillo (52,8 – 179,6 g) (Scheldeman *et al.* 2003). Sin embargo el ratio entre ambas magnitudes (peso/longitud) fue menor para los frutos de loma de Quebrada Verde (8,63) y mayor para las lomas El Mital, San Bartolomé (14,45).

El análisis del índice de semillas no mostró diferencias significativamente entre los frutos de las lomas estudiadas, ni con los reportados para *V. cundinamarcensis* (54,9 – 137,8), pero si mostró diferencias significativas ($p<0,05$) con *V. stipulata* (33,6 – 113,9) (Scheldeman *et al.* 2003), y las calculadas para la Reserva Nacional de Lachay – Huaura (94-182). Al correlacionar el número semillas vs. peso del fruto, el número de semillas vs. longitud del fruto, peso semillas vs. número de semilla, estas son positiva en todos los casos ($r=0,90$ a $r=0,97$, $p<0,05$).

Las diferencias obtenidas en el peso, longitud y número de semillas se puede explicar porque todos los frutos no tenían la misma edad

fisiológica a la hora de su recolección, encontrándose algunos de ellos en edad de crecimiento y otros en etapa de maduración, además de los efectos climáticos de cada loma en los meses de recolección, como lo demuestra Vidal *et al.* (2009) para la *V. cundinamarzensis* (del sur de Ecuador), que la edad y las estaciones influyen en el número de frutos por planta y las características de los mismos.

Extracción del látex

El índice de látex (0,77 -1,39) y el ratio entre el peso de fruto/peso de látex ($11,366 \times 10^{-3}$), encontrado en los frutos de las lomas de Quebrada Verde fueron significativamente ($p < 0,05$) más altos que los encontrados en los frutos de las otras lomas del estudio. El ratio encontrado nos indica que la cantidad de látex obtenido por cada 100 g de fruto fue más alto para los frutos de menor peso (lomas de Quebrada Verde) y menor ($5,253 \times 10^{-3}$) para los frutos de mayor peso (lomas El Mital) (Tabla 1).

Las diferencias en la producción de látex encontradas entre los frutos estudiados también es reflejo de la edad del fruto y factor ambiental, así lo demuestra Vidal *et al.* (2009), en su estudio sobre *V. cundinamarzensis* ya que encuentra diferencias significativas en la obtención de látex de los frutos de esta especie, siendo el otoño la estación donde se registró la menor proporción de frutos verdes aptos para obtención de látex, y al mismo tiempo, la mayor proporción de frutos pequeños, es decir, en esa estación los frutos están en crecimiento, por lo que para esta especie es una época inadecuada para la obtención de látex, siendo la primavera la mejor época.

Determinación de la actividad enzimática

La AEE de la papaína encontrada en el látex de papaya y mito fueron analizadas encontrándose que en estado fresco, la AEE de papaína en *V. candicans* fue de 9,83 nkat.mg⁻¹ proteína, mientras que en el látex de *C. papaya*

(papaya) fue de 6,14 nkat.mg⁻¹ proteína, lo que representa 1,6 veces mayor en “mito”, estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Viñamagua *et al.* (2006) y Kyndt *et al.* (2007) quienes obtuvieron mayor actividad enzimática de papaína en las papayas silvestres del género *Vasconcellea* que con respecto a la papaya comercial (8,9 – 12,98 nkat.mg⁻¹ proteína vs 6,5 nkat.mg⁻¹ proteína, respectivamente).

En las muestras que fueron almacenadas por tres meses con NaOH 0,3M, y semipurificadas, se observó que en el látex de “mito”, la papaína perdió 38% de su AEE, mientras que en el látex de papaya fue de 30%, comparados con sus respectivas muestras frescas. Probablemente debido a que no se hizo un buen almacenamiento de las muestras de “mito”, afectándose los grupos SH de las cisteínas que al oxidarse afectan la actividad enzimática; otra explicación sería que no hubo una buena separación de la papaína de las otras enzimas presente en el látex, que debieron precipitar a pH 9,0 (Quino *et al.* 2010; Deva-kate *et al.* 2009; Sloth *et al.* 2008).

En las muestras de “mito” y papaya guardadas en buffer acetato pH 7,5 semipurificadas, se observó que la AEE de papaína para ambas está por encima de los valores obtenidos en estado fresco, así, el látex de papaya incrementó en 50% y para el látex del “mito” el incremento de la AEE de papaína fue de 72%. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Monti *et al.* (2000) y Pinazo *et al.* (2006), quienes al realizar estudios para purificar la papaína, ven que esta va incrementando su actividad conforme su purificación avanza.

Sin embargo, el ratio de la AEE de papaína en cada tratamiento fue diferente, obteniéndose un ratio = 1,6 para el látex fresco de “mito”, un ratio = 1,43 para el látex almacenado en NaOH 0,3M y un ratio = 1,84 para el látex guardado en buffer acetato a pH 7,5, lo cual nos indica que con buffer acetato se preserva mejor la

actividad de la papaína. Debemos de recalcar que la semipurificación realizadas en las muestra mejoró la actividad específica de la papaína.

El estudio tiene como limitante el hecho de que *V. candicans* es una especie de estación, por lo que sólo se pueden obtener frutos una vez al año. Además, postulamos que, así como los datos biométricos presentan variabilidad según el lugar de procedencia, también la actividad de la enzima podría tener un rango más amplio de variabilidad, por lo que nuestros resultados abren el camino para investigar más sobre los potenciales de la especie *V. candicans*, uno de ellos, su alta actividad de papaína, aunque se requieren de estudios adicionales para saber más sobre sus proteasas en general.

Creemos que este es uno de los caminos para contrarrestar la amenaza de su extinción, dado que la población cada vez más utiliza sus tierras naturales por presión de otros cultivos que económicamente les rinden más, desconociendo el potencial de esta especie, la cual podrían ampliar su cultivo.

AGRADECIMIENTOS

In memoria a Augusto Mendoza. A Nelly Canto Benites por la ayuda en la recolección de las muestras de "Mito" de las diferentes lomas estudiadas. A Oscar P. Nolasco C, por su colaboración en el procesamiento de algunos análisis. A Carolina Martínez Elizondo por su colaboración en la traducción de inglés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Badillo, V.M. 2000. *Carica L. vs. Vasconcella St. Hill. (Caricaceae) con la rehabilitación de este último*. Ernstia, 10: 74-79.
- Badillo, V.M. 2001. Nota correctiva *Vasconcella* St. Hill. y no *Vasconcella* (Caricaceae), Ernstia, 11: 75-76.
- Cuya, M.O. 1992. *Carica candicans* (mito) Una papaya de zonas áridas que urge revalorar. Boletín de Lima, 14(82): 75-80.
- Devakate, R.V.; Patil, V.V.; Waje, S.S. & Thorat, B. N. 2009. Purification and drying of bromelain. Separation and Purification Technology, 64: 259-264.
- Kyndt, T.; Van Damme, E.J.M.; Van Beeumen, J. & Gheysen, G. 2007. Purification and characterization of the cysteine proteinases in the latex of *Vasconcella* spp. Federation of European Biochemical Societies Journal, 274:451-462.
- Monti, R.; Basilio C.A.; Trevisan, H.C. & Contiero, J. 2000. Purification of papain from fresh latex of *Carica papaya*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 43: 501-507.
- MVMT (Municipalidad Villa María del Triunfo). 2007. *Vida en la Lomas Costeras*. <http://77villamarialima.galeon.com/productos1765260.html>. (Consulta 15/05/2016).
- Nakasone, H.Y. & Paull, R.E. 1998. *Tropical fruits*. In: *Crop Production Science in Horticulture Series N 7* CAB International, Wallingford, UK. pp.173-207.
- NRC (National Research Council). 1989. *Lost Crops of the Incas. Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation*. National Academy Press. Washington D.C., USA. 415 pp.
- Neidlema, S.L. 1991. Enzymes in the food industry a backward glance. Food Technology, 45: 88-91.
- Nitsawang, S.; Hatti-Kaul, R. & Kanasawuda, P. 2006. Purification of papain from *Carica papaya* latex: aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. Enzyme and Microbial

- Technology, 39: 1103-1107.
- Ortiz, A.; Madrigal, L.; Fernández, R. & Cooke, R. 1980. The storage and drying characteristics of papaya (*Carica papaya* L.) latex. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31: 510-514.
- Pinazo, M.O.; Gutiérrez, S.P.; Quequezana, B.M. & Arenas, Ch.A. 2005. Extracción de la papaína de *Carica papaya* var. Arequipensis. *Véritas*, 9:128-134.
- Quino, F.M.J.; Yácono, L.J.C. & Zelada, Ch.M. 2010. Purificación de papaína a partir de látex seco: Un estudio piloto. *Ingeniería Industrial*, 28:177-193.
- Scheldeman, X.; Motoche, R.; Parcemon, J. & Van Damme, V. 2003. Potential of highland papayas (*Vasconcellea* spp.) in southern Ecuador. *Lyonia*, 5: 73-80.
- SSCASE 01.001 (Sigma Quality Control Test SSCASE01.001). 1999. Enzymatic Assay of Protease. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-protease-casein-as-a-substrate.html> (Revisado 15/03/2010).
- Sloth, J.; Bach, P.; Jensen, A.D. & Kiil, S. 2008. Evaluation method for the drying performance of enzyme containing formulations. *Biochemical Engineering Journal*, 40:121-129.
- Thomas, M.P.; Topham, C.M.; Kowlessur, D.; Mellor, G.W.; Thomas, E.W.; Whitford, D. & Brocklehurst, K. 1994. Structure of chymopapain M the late-eluted chymopapain deduced by comparative modelling techniques and active-centre characteristics determined by pH-dependent kinetics of catalysis and reactions with time-dependent inhibitors: the Cys-25/His-159 ion-pair is insufficient for catalytic competence in both chymopapain M and papain. *Biochemical Journal*, 300:805-820.
- Viñamagua, C.M.; Sánchez, P.R. & Tene, Á.V.T. 2006. *Cuantificación del contenido de papaína y su actividad enzimática en seis especies del género Vasconcellea, nativas del sur del Ecuador*. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador.
- Vidal, L.V.; Finot, V.L.; Mora, K. & Venegas, F.A. 2009. Características Físico-Químicas del látex de Papayuelo (*V. cundinamarcensis* Badillo, Caricaceae). *Información Tecnológica*, 20:93-103.

Received July 24, 2016.
Accepted August 20, 2016.