

EXTRACCIÓN EN SISTEMA ACUOSO BIFÁSICO Y PURIFICACIÓN POR INTERCAMBIO IÓNICO DEL COMPLEJO PROTEOLÍTICO DE *Pileus mexicanus*

Karina Alarcón- Domínguez, Ma. Isabel Cortés-Vázquez, Roberto Briones-Martínez
Km. 8.5 Carr. Fed. Yautepec-Jojutla, C. P. 62730, Yautepec, Morelos. Tel. 015557296000 ext.82518,
rbriones@ipn.mx

Palabras clave: cuaguayote, mexicaína, extracción acuosa bifásica

Introducción. Estudios bioquímicos del látex de *cuaguayote* (*Pileus mexicanus* Syn. *Jacaratia mexicana*) permitieron el descubrimiento de la *mexicaína* (proteasa cisteínica, con alta actividad y estable a la oxidación), la cual inicialmente fue considerada como monomórfica [1]. Estudios recientes [2] demostraron la presencia en el látex de cinco proteasas: P-I, P-II, P-III, P-IV y P-V; de las cuales P-IV es el componente más abundante, razón por la cual se continuó denominando como *mexicaína*. Debido a que esos estudios se enfocaron solo a P-IV, queda por dilucidarse el aislamiento y caracterización de las otras cuatro proteasas minoritarias. Por lo anterior en el presente trabajo se informan los resultados en el ensayo de métodos de aislamiento de los componentes del complejo proteolítico del *cuaguayote* (CPC) mediante extracción acuosa bifásica, precipitación con sales y cromatografía de intercambio catiónico.

Metodología. El látex fresco de frutos de *cuaguayote* en estado inmaduro (Yyocingo, Gro.), acondicionado y liofilizado, se sometió a dos estrategias de separación: (i) por extracción acuosa bifásica (EAB), con 12% PEG - 15% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [3], comparativamente con el método de extracción por precipitación por sales (EPS), que emplea $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 45%; y, (ii) mediante cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sephadex C-50) con de regulador de fosfatos pH 7 y gradiente de NaCl entre 0.2 -1.6M. Se determinó la actividad caseinolítica de las fracciones obtenidas y se caracterizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS. Las líneas del gel son: (1) látex-Cis; (2) SN de látex-Cis; (3) pp. de EPS; (4) fase superior de EAB; (5) fase inferior de EAB; (6) SN - 2ª pp. de EPS; (7) SN - pp. - EPS en NaCl 10%; pp. - EPS - NaCl 10%.

Resultados y discusión. En la EAB se logró la separación del componente que corresponde al CPC (fase inferior de la mezcla bifásica) en una baja concentración relativa (Fig. 1). Por intercambio catiónico se separaron fracciones con diferentes niveles de actividad y concentración, en respuesta al gradiente de NaCl ensayado (Fig. 2).

Conclusiones. El método de precipitación con sales, permitió obtener un componente enriquecido, con mayor purificación aparente, del complejo proteolítico del látex del cuaguayote. La separación por intercambio catiónico

permitted separar varios componentes con diferente actividad y concentración.

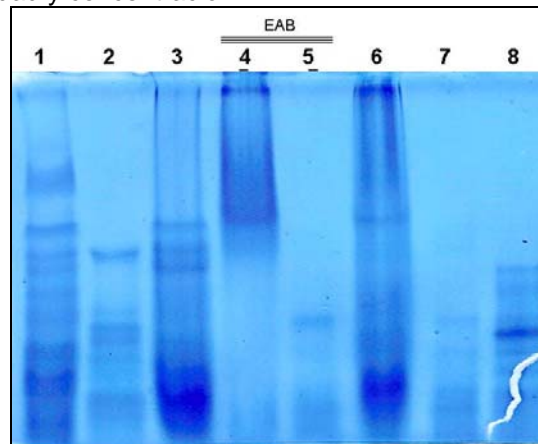


Fig. 1 Perfil electroforético de las fracciones separadas por EAB y EPS del CPC. Ver sección de métodos.

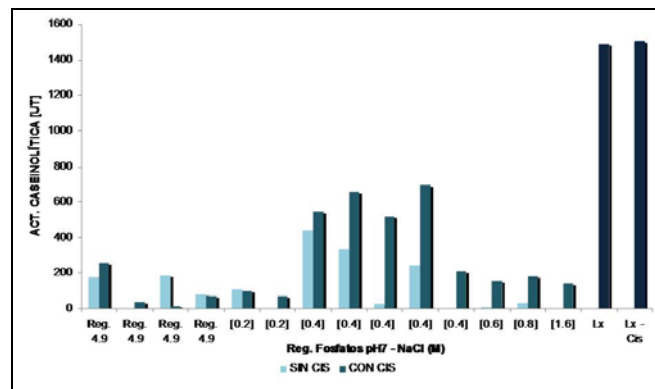


Fig. 2 Actividad caseinolítica en Unidades de tirosina (UT), de las fracciones aisladas y purificadas. UT: mg/mL/min. Lx: látex.

Agradecimiento. Proy. SIP20090357. SIBE y EDI-IPN.

Bibliografía.

- 1.- Castañeda- Agulló, M, Gavarón, F, Balcazar, M. (1942) On new protease from *pileus mexicanus*. *Science*. Vol 96:365-36.
- 2.- Oliver-S., C, González-R. L, Gavira, J, Soriano-G., M, García-R. J. (2004). Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of mexicaín. *Arcion Biological Crystallization*. 60:2058-2060.
- 3.- Sarote, N, Rajni, H.-K, Pawine, K (2006). Purification of papain from carica papaya latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. *Enzyme Microb. Tech.* 39: 1103-1107.