



fol. 12

**REPUBBLICA DEMOCRATICA SOMALA**

**Università Nazionale Somala**

**Facoltà di chimica Industriale**

**TESI DI LAUREA**

**ATTIVITÀ PROTEOLITICA DI POLPA DI FRUTTI DI CARICA  
PAPAYA A DIFFERENTE GRADO DI MATURAZIONE**

**IL LAUREANDO**

SAID OSMAN MAHAME D

**IL RELATORE**

Prof: A. Di Donato

Prof: C. Passera

**CO-RELATORE**

Dr: Abdullahi Mah'ed H ussen

Anno Accademico 1981 — 82

MOGADISCIO



**REPUBBLICA DEMOCRATICA SOMALA**

*Università Nazionale Somala*

*Facoltà di chimica Industriale*

**TESI DI LAUREA**

ATTIVITÀ PROTEOLITICA DI POLPA DI FRUTTI DI CARICA  
PAPA YA A DIFFERENTE GRADO DI MATURAZIONE

**IL LAUREANDO**

SAID OSMAN MAHAME D

**IL RELATORE**

Prof: A. Di Donato

Prof: C. Passera

  
CO-RELATORE

Dr: Abdullahi Mah'ed H ussen

Anno Accademico 1981 - 82

MOGADISCIO

## I N D I C E

1).	Introduzione .....	Pagina	1.
1.1	Aspetti botanici e colturali della papaia .....	"	1.
1.2	La papaia come pianta medicinale .....	"	6.
1.3	Importanza Economica .....	"	6.
1.4	Aspetti e medicinale .....	"	7.
1.5	Composizione del frutto .....	"	7.
1.5.1	Zuccheri .....	"	7.
1.5.2	Acidi e Basi Organici .....	"	11.
1.5.3	Componenti Volatili .....	"	12.
1.5.4	Pigmenti .....	"	13.
1.5.5	Enzimi proteolitici .....	"	14.
1.5.5a	Papaina .....	"	14.
1.5.5b	Chimopapaina .....	"	17.
1.5.5c	Papaia peptidasi .....	"	18.
1.5.5d	Paragone tra le varie proteasi sulfidriliche .....	"	18.
2.	Scopi della tesi .....	"	24.
3.	Materiali e metodi .....	"	24.
3.1	Determinazione contenuto Clorofilla .	"	25.
3.2	Estrazione degli enzimi proteoli- tici dalla polpa .....	"	25.
3.3	Chomatografia covalente su Tiopropil-Sepharosio (TPS) .....	"	26.

3.4	Saggio di attività proteolitica .....	Pg	28.
3.5	Determinazione delle proteine .....	"	31.
3.6	Gel filtrazione .....	"	33.
3.6a	Gel filtrazione su Sephadex G-25 .....	"	33.
3.6b	Gel filtrazione su Sephadex G-75 .....	"	34.
3.7	Elettroforesi su gel di poli- acrilammide .....	"	35.
3.7a	Preparazione del soluzione Stock .....	"	35.
3.7b	Tampone elettroforesi .....	"	36.
3.7c	Soluzione di lavoro .....	"	36.
3.7d	Preparazione dei gels .....	"	37.
3.7e	Caricamento dei campioni .....	"	38.
3.7f	Condizioni di elettroforesi .....	"	38.
3.7g	Colorazione e fissazione dei gels .....	"	38.
3.7h	Decolorazione dei gels .....	"	39.
4.	Risultati .....	"	40.
5.	Discussione .....	"	44.
6.	Bibliografia .....	"	57.

\*\*\*\*\*

1. INTRODUZIONE

1.1 ASPETTI BOTANICI E CULTURALI DELLA PAPAIA

La papaia (*Carica papaya* L.) è una pianta tropicale che cresce tra le latitudini di 32° Nord e Sud. Appartiene alla famiglia delle Caricaceae, una piccola famiglia di quattro generi.

La specie *Carica papaya*, che è di gran lunga la più importante, è strettamente tropicale per il clima caldo di queste regioni. È una pianta dicotiledone, dall'aspetto estere arborescente, con un tronco robusto, alto, privo di ramificazioni, con vasta chioma. Il tronco, che può raggiungere 8 - 10 metri, è di consistenza carnosa, coriaceo-fibrosa, cavo internamente, liscio esternamente e visibilmente marcato dalle cicatrici delle foglie. La fronda è costituita da numerose grandi foglie, con il lembo lungo circa 70 - 75cm, profondamente eptapalmato-lobate, portate da un picciolo robusto, cavo internamente, lungo quanto e più della foglia.

La papaia è originaria del Messico del Sud e Costa Rica. Fu portata dagli Spagnoli a Manila circa a metà del XVI<sup>o</sup> secolo e raggiunse Malacca poco dopo. Da cui fu introdotta in India.

Viene segnalata la presenza in Zanzibar nel XVIII secolo e in Uganda nel 1874 (3). L'indroduzione della papaia nelle Hawaii viene attribuita di solito a Don Marin, uno dei primi colonizzatori Spagnoli ed anche orticoltore, che portò i semi dalle Isole Marquesas varie volte tra il 1300 e il 1823.

Pianta di breve vita, ha nei primi 2 - 3 anni, un accrescimento assai rapido, che si fa più lento nei successivi. Benchè non siano rarissimi gli esemplari ermafroditi, abitualmente la papaia è pianta dioica. I fiori appaiono all'ascella di ogni foglia.

I fiori maschili sono portati da un racemo pendente, lungo un metro circa. I femminili, solitari o in brevissimi corimbi di pochi fiori, sono molto più grandi dei maschili.

Il frutto è una grossa bacca, che per forma e dimensioni assomiglia ad un popone. La buccia è sottile e delicata, la polpa abbondante, generalmente tenera, di colore giallo arancio; internamente ha una vasta cavità vuota che, in relazione alla forma del frutto, è sferica od ellittica, od anche stellata. Sulla polpa sono inseriti numerosissimi piccoli semi neri, sferici od ovali, rivestiti di un arillo mucilaginoso.

Tutte le parti della pianta e particolarmente le foglie ed il frutto immaturo, se incisi, emettono un succo lattiginoso caratteristico.

Singolarmente sensibile alle basse temperature, la pianta non sopporta minime prossime allo zero e resta poco produttiva. Le alte temperature e la forte e prolungata insolazione non le sono contrarie in linea assoluta; tuttavia conviene alla pianta che l'umidità atmosferica non sia troppo scarsa.

Rispetto al terreno si può affermare che, ad eccezione di quelli che abbiano gravi difetti di costituzione, la papaia può prosperare in tutti i terreni, purchè siano di buona permeabilità ed aereazione.

Nelle Isole Hawaii, che sono il territorio ove la papaia ha le sue più importanti coltivazioni, si coltiva fino a 1200 metri di altitudine. La papaia si produce normalmente per seme; la riproduzione è particolarmente facile e delle cure razionali, anche elementari, ne assicurano il migliore e più precoce successo.

L'innesto fu da prima praticato da Fairchild e Simmonds, in Florida, sopra semenzali di 20 - 25 cm di altezza, con getti laterali di diametro analogo, ottenuti da semenzali di razze note per il loro pregio;

ma fu poi osservato che le piante avevano un difettoso e tardivo sviluppo e successivamente manifestavano caratteri degenerativi.

La talpa ha lasciato concepire qualche maggiore speranza, tuttavia W.T. Pope, che ha ottenuto una buona percentuale di attecchimento, informa che occorrono da due a cinque mesi, prima che le radici siano in condizione di sopportare il trapianto.

Il seme va lavato ed asciugato: puo' conservare, per qualche anno, il potere germinativo se è ben custodito; ma sempre l'energia germinativa è tanto maggiore, quanto più presto si semina.

Il seme buono puo' germogliare entro 2 - 3 settimane ma puo' anche ritardare 4 - 6 settimane. Verso i due mesi di età, le piantine sono alte circa 20 - 25 cm e sono atte al collocamento a dimora. La pianta ben custodita inizia la fioritura fra il 4 e 5 mese, così che, secondo il clima e il terreno, si comincerà a raccogliere fra il 10 e il 12<sup>o</sup> mese dalla semina.

La papaia ha breve vita; la produttività precoce è assai intensa. Nel primo e nel secondo anno di produzione si puo' far calcolo su 50 - 60 frutti all'anno e se la coltura è ben condotta si puo' ottenere altrettanto o quasi al terzo anno; ma dal terzo anno in poi la produzione è in diminuzione.

La pianta vive facilmente 10 - 15 anni, ma la produzione è scarsa, i frutti sono piccoli e la raccolta è difficile.

Alle persone non abituate la papaia non riesce subito gradita; ma l'assuefazione è facile ed il frutto diviene poi graditissimo, tanto che nei paesi di produzione viene facilmente consumata tutto l'anno.

La grandezza dei frutti va da meno di mezzo chilogrammo fino a 9 - 10 kg, a seconda delle razze e dei luoghi di produzione.

La caricaceae sono formate da 4 generi: Carica, Jacaratia, Jarilla e Cyclimorpha. Ci sono solo 6 specie nel genere Jacaratia e una specie nel genere Jarilla (4). Nella letteratura di un tempo, il genere Jacaratia non veniva spesso distinto dal genere Carica: per esempio, Jacaratia Mexicana era classificata come Carica Mexicana (5).

La mancanza di un accordo nella classificazione tassonomica delle Caricaceae e gli eccessivi sinonimi suggeriscono uno studio chemio-tassonomico che usasse come parametro di distinzione il BITC (Benzil-isotiocianato) (6,4).

La determinazione quantitativa del BITC nei semi di tutti e quattro i generi indica che i generi Carica, Jarilla e Cyclimorpha avevano alti livelli di

BITC, mentre Jacaratia aveva solo delle tracce. L'abnorme differenza nella concentrazione del BITC ( 1 : 6000 ) puo essere usata come parametro chimico per la differenziazione del genere Jacaratia dagli altri tre generi.

1.2 La papaia come pianta medicinale:- Il <sup>l</sup>va~~o~~re della papaia come pianta medicinale è stato recensito dal Quisumbing (7) e dal Chopra (8). Viene riferito che la pianta possiede proprietà vermifughe, abortiva ed emmenagoga. L'alcaloide carpaina, che si diceva presente nella papaia, era supposto che agisce come cardiotonico, amebicida e diuretico.

1.3 Importanza economica:- La papaia è divenuta uno dei maggiori prodotti di esportazione delle Hawaii. Nel 1977, duemila acri hanno prodotto 65.768.000 libbre di papaia, che furono vendute fresche ai mercati. Circa 9,6 milioni di libbre della papaia raccolta furono trasformati in puree, in tavolette zuccherate, in fette inscatolate e in pezzi congelati (9). In USA la maggior parte del frutto fresco viene consumata quando esso è maturo. Altrove, in alcuni paesi del Sud-Est Asiatico e in special modo nelle Filippine, il frutto è consumato come verdura mentre è ancora allo stato verde.

La papaia è un prodotto commerciale anche dell'Australia che nel 1974 ha prodotto 5 milioni di libbre di papaia fresca e 1,4 milioni di libbre di prodotto trasformato (10). In Sud-Africa, per l'anno 1970, la produzione di papaia era valutata in 1,5 milioni dollari (11).

1.4 Aspetti nutrizionali e medicinali - La papaia è stata descritta come un'eccellente fonte di provitamina A e di Ac. Ascorbico (12).

In tabella I si riporta la composizione nutritiva della papaia var. Solo (Hawaii). Il contenuto minerale della papaia fu analizzato con spettrofotometro a raggi x ed i risultati sono riportati in tabella II come risulta, la papaia può considerarsi una fonte povera di Ca, P, Fe.

1.5 Composizione del frutto:- Come appare in tabella I la porzione edibile della papaia è composta principalmente di acqua (86,80%), e di carboidrati (12,18%), che assieme fanno il 98,98% del frutto.

1.5.1 Zuccheri:- I principali carboidrati nella papaia sono gli zuccheri, essendo l'amido poco o per nulla presente (Chan e al. 1978a). I solidi totali solubili nel puree di papaia variano tra i valori di 11,5 e 13,5 brix (13).

Tabella I      Composizione nutritiva di polpa di  
papaia var Solo, per 100gm di porzione edibile.

---

Umidità	86,80%
Energia alimentare	46 calorie
Proteina	0,36 gm.
Grasso	0,06 gm.
Carboidrati totali	12,18 gm.
Fibra	0,58 gm.
Ceneri	0,57 gm.
Ca	29,9 mg.
P	11,6 mg.
Fe	0,19 mg.
Vitamina A	10,9 g.
Tiamina	0,027 mg.
Riboflavina	0,043 mg.
Niacina	0,33 mg.
Acido Ascorbico	84,00 mg.

---

da : (12).

Tabella II      Analisi minerale di polpa di  
papaia.

Elemento	mg/100gm peso fresco
P	9,9
K	178,5
Ca	9,45
Mg	40,71
Mn	0,0299
Fe	0,1909
B	0,1610
Cu	0,0276
Zn	0,1173
Al	0,0598
Mo	0,0025
Sn	0,0043
Na	3,0889
Ba	Nessun contenuto

da : Chan e al., dati no pubblicati

La composizione degli zuccheri nella papaia è stata riportata da molti lavori. I lavori riportati per il saccarosio contrastano e variano notevolmente. King e al. (14) e Pratt e Del Rosario (15) riportano che il saccarosio compendeva 1,2 - 1,3% degli zuccheri totali. Pope (16) e Thompson (17) riportarono che il saccarosio era tra 0 - 13,2% di tutti gli zuccheri. Stahl (18) riportava che il saccarosio era tra 0-4,4% mentre Jones e Kubota (19) riportarono il saccarosio come il 18% degli zuccheri totali. Chen (20) usando un metodo di estrazione con alcool caldo riportò che il 60% degli zuccheri era saccarosio. Dollar e al. (21) riportarono che il saccarosio non era talvolta presente durante la maturazione post-raccolta.

La discrepanza tra i valori riportati fu spiegato da Chan e Kwok (22) essere causata da un enzima invertasi presente nella papaia. Inattivando l'enzima col riscaldamento, con microonde prima di estrarre gli zuccheri essi determinarono che la composizione degli zuccheri della papaia matura era 48,3% di saccarosio, 29,9% di glucosio e 21,9% di fruttosio. Piccole quantità di sedoepulosio nella papaia sono state riportate da Ogata e al. (23).

1.5.2 Acidi e basi organiche:- Tra i frutti, la pap-  
aia è notevolmente povera in acidi, e la parte edibile  
ha un pH compreso tra 4,5 e 6,0 (24).

I dati acquisiti per vari anni presso USDA-AR-SEA,  
Hawai Fruit Laboratory mostrano che la var. Solo  
della papaia ha un pH tra 5 e 5,5. Chan e al. (25)  
estrassero e purificarono gli acidi di papaia col  
metodo a scambio ionico. Gli acidi determinati  
quantitativamente con GLC ( Gas-Liquido cromatografia )  
erano Ac. malico, citrico e  $\alpha$ -chetoglutamico ed er-  
ano rispettivamente: 0,464; 0,525; e 0,042 meq per  
100 gm di peso umido. L'acidità totale titolabile de-  
lla papaia era 1,54 meq per 100gm, oppure 0,099% di  
acidità calcolata come Ac. citrico. Il puree aveva  
0,279 meq di acido ascorbico per 100gm (49,2mg per  
100gm) che, assieme al malico, citrico e  $\alpha$ -chetoglu-  
tarico, dava 1,31meq per 100gm e contribuiva per 1,8%  
all'acidità totale titolabile. Il restante 1% (0,11meq  
per 100 gm) fu attribuito ad Ac. galatturonica e ad  
acidi volatili non identificabili.

I risultati mostrano che la papaia è significa-  
tivamente bassa in acidi organici e questo forse re-  
nde conto del suo sapore piacevolmente dolce.

1.5.3 Componenti Volatili :- I componenti volatili

del sapore della papaia sono stati riportati da Katague e Kirch (26), Tang (27), Chan e al. (28) e Flath e Forrey (29).

La maggior parte degli riferimenti riportava la presenza di BITC e del suo precursore glucosinolato (30,31,27,32.). Katague e Kirch (26) hanno riferito della presenza di serie omologhe di alcoli normali primari da C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> e dei loro isoalcoli primari da C<sub>3</sub> a C<sub>5</sub>, con i corrispettivi esteri acetati.

Flath e Forrey (29) concentrarono i componenti volatili dei frutti di papaia, con diversi e differenti metodi.

I concentrati furono esaminati mediante spettrometria di massa e cromatografia, e furono identificati 106 componenti. Linalolo era il maggior componente, con piccole quantità di BITC. Erano presenti minori quantità di Ac. butirrico, esanoico ed ottanoico e il loro corrispettivi esteri metilici. Altri componenti erano il fenilacetone nitrile e l'ossido di linalolo.

Le relative proporzioni dei principali componenti: Linalolo, ossido di linalolo e BITC sembrarono dipendere dal metodo di concentrazione dei componenti volatili.

1.5.4 Pigmenti:- Il colore della polpa di papaia matura è dovuto ai suoi carotenoidi. Yamamoto(33) isolo e identifico i carotenoidi di entrambi i tipi di papaia: a polpa gialla ed a polpa rossa. La maggior differenza tra le due varietà era la completa assenza di licopene nel tipo a polpa gialla. Le relative composizioni in carotenoidi di entrambi i tipi di polpa sono riportate in tabella III.

Tabella III Composizione percentuale di pigmenti in papaia.

Pigmenti	Polpa gialla	polpa rossa
<del>α</del> -Carotene α'	4,8	4,8
<del>β</del> -Carotene β	24,8	5,9
Monoeossido di Criptoxantina	15,6	4,4
Criptoxantina	38,9	19,2
Licopene	0,0	63,5
Miscuglio insoluto	15,9	2,2

Handwritten calculations and annotations:

- For yellow pulp: 4,8 + 24,8 = 29,6
- For red pulp: 4,8 + 5,9 = 10,7
- For red pulp: 10,7 + 63,5 = 74,2
- For yellow pulp: 15,6 + 38,9 = 54,5
- For yellow pulp: 54,5 + 15,9 = 70,4
- The value 63,5 for lycopene in red pulp is circled.
- A bracket groups the last three rows (Monoeossido di Criptoxantina, Criptoxantina, and Licopene) with a value of 23,6.

da : (33).

Il contenuto totale in carotenoidi fu 3,7 mg/100g e 4,2 mg/100g per i tipi a polpa gialla ed a polpa rossa rispettivamente.

*Contenuto*  
*Polpa rossa - contenuto di pigmenti per*  
*la polpa di papaia.*

Da questi risultati i frutti a polpa rossa dovrebbero avere approssimativamente una volta e mezzo l'attività in provitamina A del tipo a polpa gialla.

1.5.5 Enzimi proteolitici:-

1.5.5a. Papaina (3.4.22.2) :- La papaina è uno dei più importanti in enzimi proteolitici usati nella industria alimentare, cosmetica, della concia e delle droghe. Il lattice di papaia viene estratto dai frutti verdi tagliando la superficie con una sottile lama. Il lattice è seccato al sole o ad una temperatura inferiore a 70°F..A causa della laboriosità e della richiesta di lavoro, la produzione di papaina grezza è dominata dai paesi tropicali con abbondante manodopera a basso costo. La papaina commerciale varia, per qualità, da lattice seccato e grezzo senza ulteriore purificazione fino ad un prodotto denominato come "alta qualità" dai produttori. Tutte queste differenti qualità di papaina contengono benzilglucosinolato un precursore naturale del tioglucoside nel lattice di papaia (34).

Gli isotiocianati formati da idrolisi del benzilisotiociano sono stati dimostrati inibire la attività della papaina (35). La papaina grezza contiene almeno due tipi di enzimi proteolitici; papaina e chimopapaina (36).

La papaina viene abitualmente purificata dal lattice di papaia col metodo di Kimmel e Smith (37). Ciò implica la estrazione del lattice, la rimozione del materiale insolubile a pH 9, la precipitazione dello ammonio solfato e la ricristallizzazione. La proteina cristallina che ne deriva contiene tre tipi di papaina: papaina attiva, papaina attivabile e papaina non attivabile.

Nella papaina attiva, il sito attivo della cisteina-25 ha un gruppo sulfidrico (38). D'altronde, la papaina attivabile può essere convertita in papaina attiva con la riduzione con tioli e altri agenti riducenti. Klein e Kirsch (39) dimostrarono che nella papaina attivabile, il gruppo tiolo è in doppio legame con un'altra cisteina. Un meccanismo di attivazione della "propapaina" attraverso un interscambio molecolare tiolo-disulfide è stato proposto da Broklehurst e al. (40).

La separazione della papaina attiva dalle molecole non attive può essere convenientemente compiuta con cromatografia per affinità (41,42,43).

Queste colonne cromatografiche ritengono specificatamente la papaina con gruppo sulfidrico libero.

Una gran parte della letteratura è dedicata a capire la struttura e i meccanismi di reazione della

papaina. Per un'approfondita conoscenza di questi aspetti, si può consultare un resoconto dettagliato fatto da Dreuth e al. (44,45). Previamente si può dire che la molecola della papaina consiste di 212 aminoacidi con tre ponti disolfuro (44,45).

Nella fig. (1) è riportata la sequenza aminoacidica della papaina. La struttura tridimensionale (fig. 2, 3) basata su modelli a diffrazione a raggi x, mostra che la molecola della proteina ha due lobi. Il lobo L ha il suo midollo idrofobico circondato da 3  $\alpha$ -eliche il lobo R nell'altra parte ha 2 eliche e una struttura a foglio pieghevole. La regione del sito attivo è localizzata in una scarpatura lunga 20 Å tra i due lobi (45). Nella fig. (4) è riportata la sequenza degli aminoacidi vicino alla cisteina essenziale in alcuni enzimi proteolitici -SH.

Quando una soluzione di lattice di papaya è messa in una soluzione 0,45 di solfato ammonio saturo, la papaina precipita e la chimopapaina rimane nel surnatante (36). La chimopapaina assomiglia alla papaina per la sua capacità di idrolizzare una gran varietà di peptidi e di derivati di aminoacidi. Come la papaina, la ficina e la bromelina, essa ha la proprietà sulfidril-proteasi.

1.5.5b. Chimopapaina:- La chimopapaina presenta al 27% nell'estratto solubile del lattice di papaia (46), è stata isolata da questa fonte da Jansen e Balls (47). L'enzima purificato da Jansen e Balls è in realtà una miscela di due componenti denominati rispettivamente chimopapaina A e B.

Il loro peso molecolare è di circa 35,000 ed il loro punto isoelettrico è a pH 10,0 e 10,4 rispettivamente. La chimopapaina, come la papaina, ha la proprietà di una proteasi sulfidrilica. La sua attività catalitica massima è rilevabile in presenza di vari agenti riducenti (cisteina, glutamina, ditiotreitolo) e agenti chelanti ed è inoltre inibita da reagenti che hanno una spiccata tendenza a reagire con gruppi sulfidrilici liberi.

Proprietà biologiche della chimopapaina: Gli studi fino ad ora condotti mostrano che la chimopapaina è molto simile alla papaina nella sua capacità di idrolizzare i legami peptidici, mostrando una spiccata tendenza alla idrolisi di derivati dell'arginina. In ogni caso la velocità di idrolisi dei vari legami è più lenta di quella della papaina.

1.5.5c. Papaya Peptidasi:- Questa proteasi tiolica differisce dalla papaina e dalla chimopapaina sia per composizione in aminoacidi che per attività verso substrati proteici (46).

Sembra che sia da escludere che la papaya peptidasi sia un prodotto di degradazione della papaina o della chimopapaina (46), ma l'enzima non è mai stato caratterizzato a sufficienza.

1.5.5d. Paragone tra le varie proteasi sulfidriliche:-

E' particolarmente interessante notare che esistono notevoli somiglianze tra varie proteasi sulfidriliche sia vegetali ( papaina, chimopapaina, ficina, bromelina) e microbiche come ad esempio la proteasi da *stafilococco*. La fig.(4) mostra i dati di sequenza ottenuti per le regioni del sito attivo di queste varie molecole proteiche.

Come si vede in tutte è presente un residuo cataliticamente attivo di cisteina in posizione di sequenza 25 ed ancora rimane conservato il residuo di glicina in posizione 23, suggerendo un particolare avvolgimento tridimensionale del sito attivo in cui solo un aminoacido a catena laterale piccola come la glicina può trovare alloggiamento. Una ulteriore similitudine si può trovare nella posizione di sequenza 19 dove tutte

le proteasi, ad eccezione della chimopapaina, mostrano un residuo di glutammina. La sua funzione non è ancora nota ma è possibile che faccia parte del sito attivo degli enzimi citati (vedi fig. 2,3).

Un fatto molto sorprendente nella analisi della struttura delle proteasi sulfidriliche effettuato in paragone con le proteasi seriniche ( chimotripsina e subtilisina) è che esse hanno delle caratteristiche comuni. Innanzitutto tutte queste proteasi posseggono un residuo di glicina a 2 residui di distanza a sinistra del residuo catalitico di cisteina o di serina. Ancora più sorprendente è l'arrangiamento spaziale dei gruppi responsabili della scissione del substrato. Nelle proteasi seriniche tale arrangiamento è

OH.....Im.....Asp dove Im è un anello Imidazolico ed i puntini indicano legame ad idrogeno tra i gruppi.

Nella papaina (vedi fig;2) esiste invece il raggruppamento SH.....Im.....Asn, si può quindi suggerire per le proteasi sulfidriliche un meccanismo di azione a relay di carica simile a quello ben noto per la proteasi seriniche.

È sorprendente quindi questo aspetto di evoluzione divergente-convergente che ha portato due distinte classi di enzimi a dotarsi dello stesso sistema di scissione del substrato attuato secondo modalità

simili ("relay di carica") ma attraverso due nucleofili diversi l'-SH per le proteasi sulfidriliche e per l'-OH di quelle seriniche.

Fig. (1) Sequenza degli aminoacidi della papaina

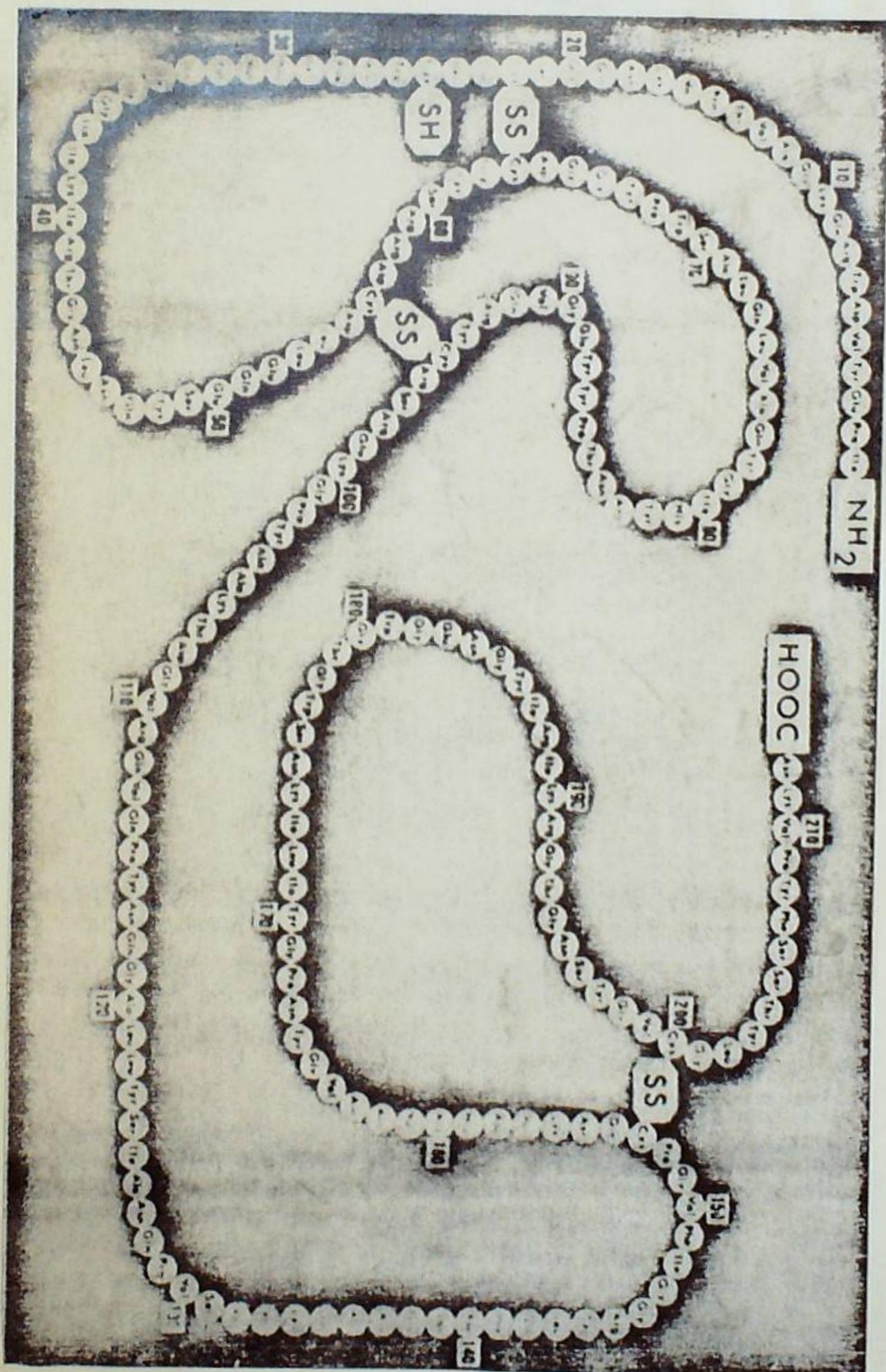


Fig. (2) Struttura tridimensionale della papaina

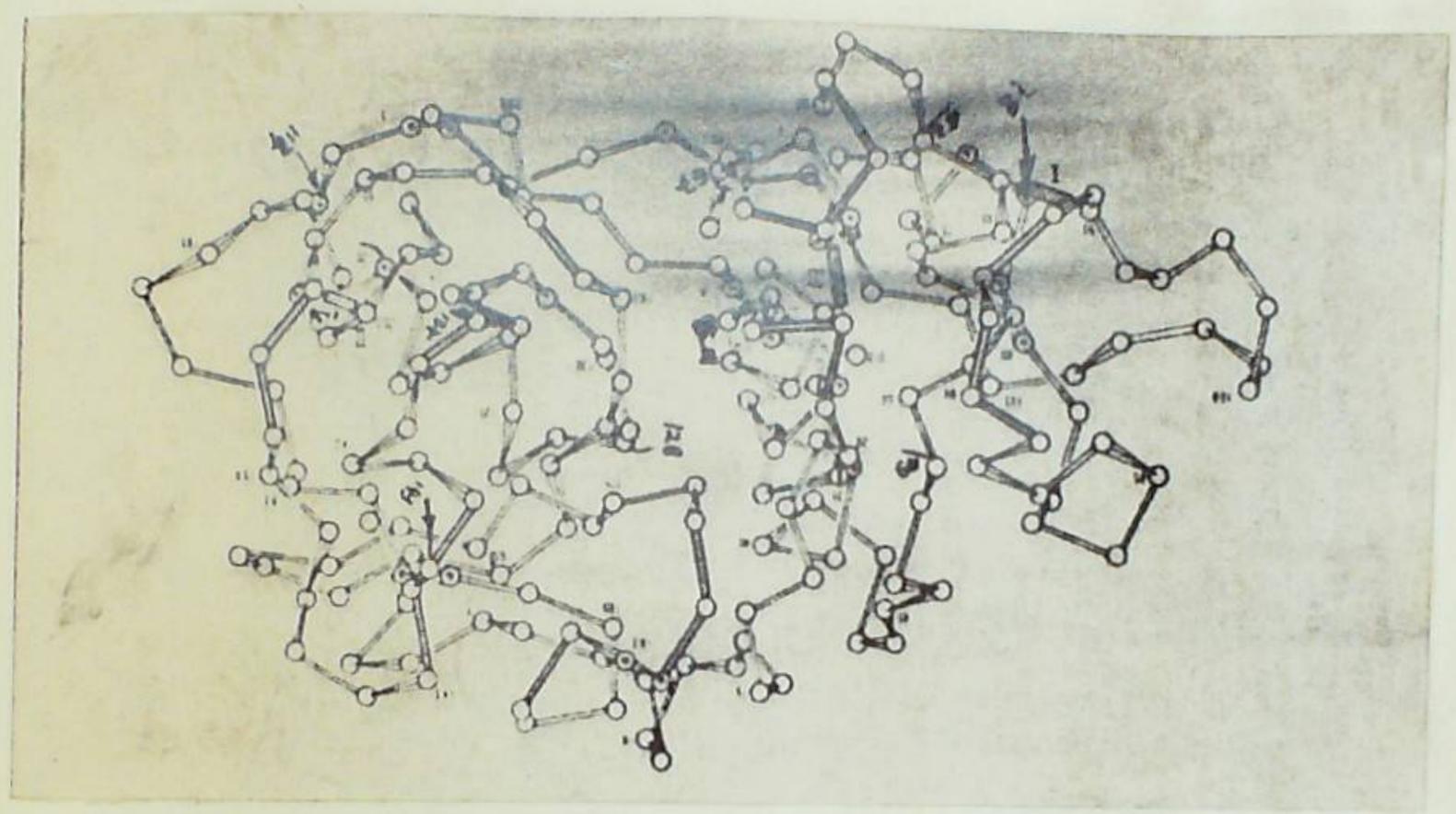


Fig. (3) Struttura del sito attivo della papaina.

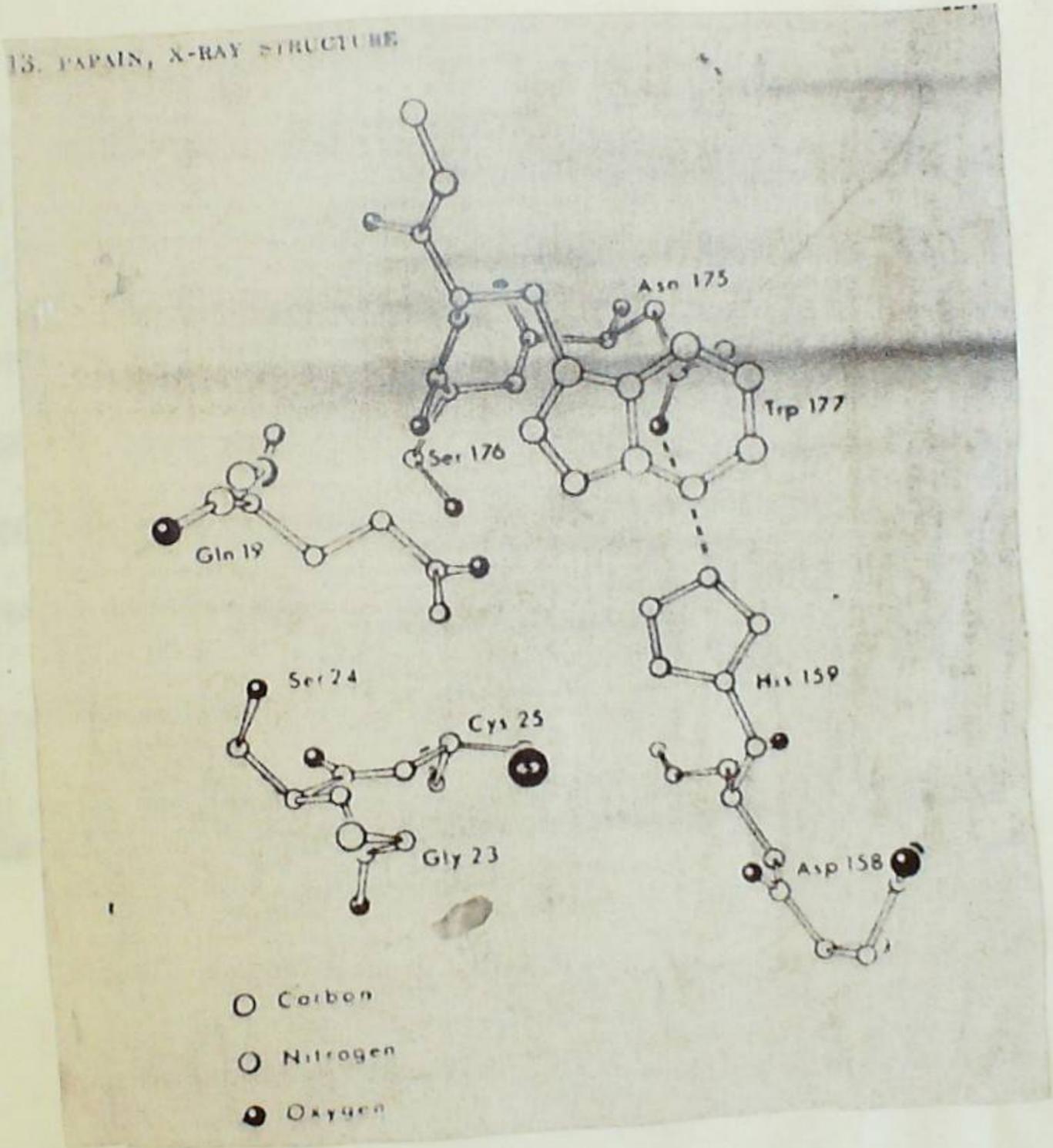
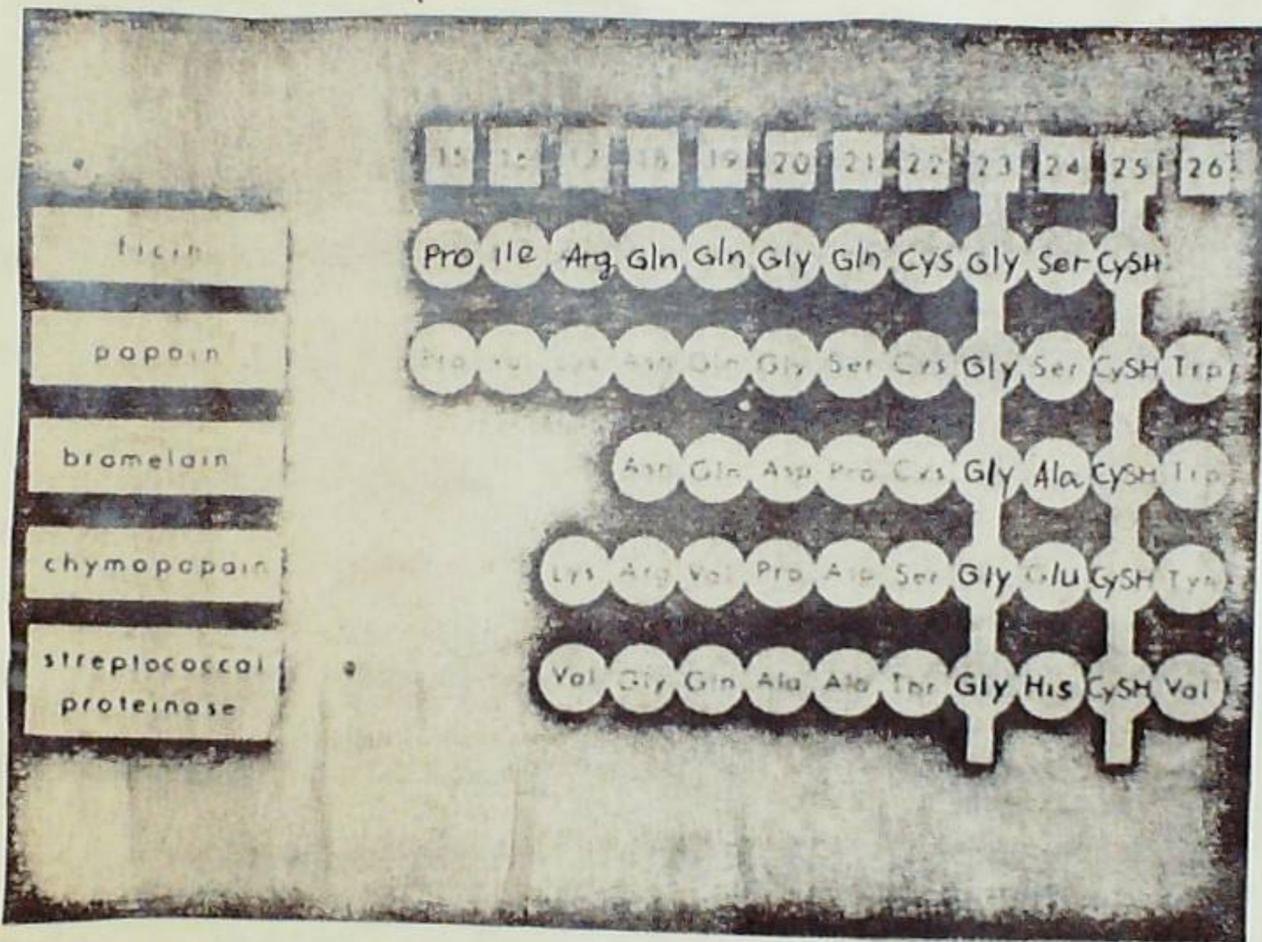


Fig. (4) Sequenza degli amminoacidi vicini alla cisteina essenziale in alcuni enzimi proteolitici -SH.



2.

SCOPO DELLA TESI

*suppl. enzimi proteolitici di papaia*

La maggior parte degli studi sulla ~~papaia e~~ chimopapaia sono stati condotti su estratti da lattice secco, che è di facile raccolto e trasporto (37).

Solo recentemente è stato descritto un metodo di separazione <sup>di questi enzimi</sup> da lattice fresco, <sup>mentre</sup> nulla è stato riportato su polpa di papaia ( )

Le necessità di <sup>certe</sup> conoscere ~~le~~ caratteristiche de-

la papaia coltivata in Somalia, disponibile in abbondanza in ogni periodo dell'anno, ma soprattutto l'importanza industriale degli enzimi proteolitici (48,49,50,51), che da essa si ricavano, ci hanno indotto a:

1. Verificare se l'attività degli enzimi proteolitici della polpa è direttamente correlato con il grado di sviluppo del frutto stesso;
2. Trovare un sistema veloce di purificazione degli enzimi proteolitici.
3. Confrontare l'attività degli enzimi suddetti estratti dal lattice ~~da~~ <sup>con</sup> quelli estratti dalla polpa del frutto.

3. Materiali e metodi:- I frutti di Carica papaya a differente stadio di sviluppo sono stati forniti dalla azienda agricola di Afgoi (Colo<sup>dr</sup> Maurizio Nazzari).

I frutti sono stati raccolti tutti, generalmente, da una stessa pianta. Arrivati in laboratorio essi sono stati conservati in armadio frigorifero a 4°C fino al momento dell'uso.

3.1 Determinazione del contenuto di clorofilla:-

Quantità opportuna di buccia (0,2 - 0,5gm) sono state macinate in mortaio con sabbia di quarzo che era stata in precedenza lavata con HCl diluito (25%) e poi con acqua distillata fino a neutralità. I pigmenti sono stati estratti dai tessuti macinati con acetone all'80%. Le soluzioni, così ottenute, sono state filtrate su carta da filtro e quindi lette con spettrofotometro Perkin-Elmer mod. 124, alle lunghezze d'onda di 645 e 663nm. Per il calcolo delle quantità di clorofilla totale, clorofilla a e b si è usato il nomogramma di Kirk fig. (5).

3.2 Estrazione degli enzimi proteolitici dalla polpa:-

All'inizio di ogni procedimento i frutti sono stati accuratamente lavati prima con acqua di fonte e poi con acqua distillata. Dopo aver rimosso la buccia e i semi del frutto, la polpa è stata pesata. Per l'estrazione degli enzimi, aliquote di 100gm di polpa sono state omogenizzate in frullatore insieme con tampone Tris-HCl 0,1M, pH 8,0 contenente EDTA 1mM e NaCl 0,1M.

?

Il rapporto polpa: tamponer era 1:4 ( peso/volume).  
 L'omogenato è stato messo in becker raffreddato con ghiaccio. Dopo circa 1 ora, l'omogenato è stato centrifugato alla massima velocità possibile ( circa 6000 rpm ) per almeno 15 min.

Il surnatante è stato raccolto e allicuato, generalmente di 30 ml, di soluzione sono state usate per la caratterizzazione degli enzimi proteolitici.

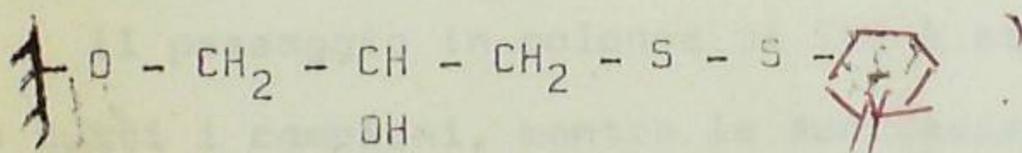
3.3 Cromatografia covalente su tiopropil-sapharosio (TPS):-

*per la separazione con la purificazione per via di unione*  
 Il tiopropil-Sapharosio è una matrice polimerica

*potrebbe  
 essere usato anche  
 il tiopropil  
 sapharosio*

inerte di Sepharosio che contiene il gruppo 2-tio-  
 piridilico, sotto forma di disolfuro.

Il legame tra il Sepharosio e il gruppo tiopiridilico è covalente:



Come si vede dalla formula il residuo 2-idrossipropilico funziona da " spacer" idrofilico diminuendo l'interferenza sterica della matrice con le reazioni di scambio di disolfuri al ponte s-s terminale.

Il ligando tiopropilico è attaccato alla matrice di Sepharosio con un legame estereo, stabile quando le condizioni di impiego sono controllate.



~~Aliquote di estratti di polpa (circa 30 ml)~~

Le colonnine di TPS sono state generalmente caricate con aliquote di 30 ml di estratti di polpa.

Il filtrato di ogni colonna è stato fatto passare attraverso una cella di misura di assorbimento UV a 280<sup>mp</sup> (Uvicord S-2138 della LKB) e quindi raccolto in cilindro graduato. La colonna di TPS è stata poi lavata con tampone di estrazione fino a verificare nell'apparecchio di misura un assorbimento praticamente zero.

L'insieme del filtrato e della soluzione di lavaggio è stato chiamato "rifiutato dal TPS".

L'eluizione della colonna di TPS è stata effettuata facendo percolare circa 50 ml di tampone di estrazione, addizionato di cisteina al momento della uso. La concentrazione della cisteina nel tampone era 20 mM. L'eluizione è stata comunque interrotta quando il registratore dello Uvicord segnava assorbimento nullo. L'eluato pure raccolto in cilindro graduato, è stato denominato "Trattenuto da TPS".

.4 Saggio dell'attività proteolitica: - Su aliquote di estratti grezzi e di soluzioni di rifiutato e di trattenuto da TPS è stata determinata l'attività proteolitica.

Il metodo di determinazione dell'attività proteolitica è basato sulla misura della quantità dei prodotti a basso peso molecolare, formatosi da proteine substrato in presenza di enzimi proteolitici. I prodotti di digestione sono caratterizzati da bassa solubilità in acido tricloroacetico (TCA).

~~La metodologia descritta in questa tesi è quella riportata da Arnon per il saggio della papaina (52).~~

I reagenti impiegati nel saggio sono i seguenti:

1). Tampone Tris-HCl 0.05 M, pH 8.0.

2). Agente attivante. ~~L'agente attivante è costituito da cisteina 0.05 M + EDTA 0.02 M in tampone Tris-HCl a pH 8.0. La soluzione è stata preparata ogni volta pochi minuti prima del saggio.~~

*Vol*

3). Caseina. Un grammo di caseina Hammersten sospesa in 100 ml di tampone Tris-HCl a pH 8.0 è riscaldata per 15 min, in acqua bollente. Questa soluzione denominata "caseina 1%" è stabile a 4 c per almeno una settimana;

4). Acido tricloroacetico al 5%. La determinazione

dell'attività proteolitica è stata condotta nel

~~seguito modo. Aliquote di 0,1 - 0,2 ml di soluzione da saggiare sono state poste in provette da centrifuga a fondo conico insieme con 0,2 ml di soluzione~~

~~attivante, costituita da cisteina 0.05 M + EDTA 0.02 M in tampone Tris-HCl a pH 8.0. La soluzione attivante è stata preparata pochi minuti prima del saggio.~~

*secondo il metodo*

Il volume delle soluzioni è stato poi portato ad 1 ml con tampona Tris-HCl; Dopo avere atteso 5 min a temperatura ambiente, <sup>è stata aggiunta soluzione</sup> 1 ml di "caseina" 1%, portata a 37 C prima del saggio. ~~è stata aggiunta ad ogni provetta.~~ Le provette sono state poi poste in bagno termostato <sup>o</sup> a 37°C per 5 min.

Alla fine del periodo di incubazione le provette sono state <sup>rapidamente</sup> poste in ghiaccio e la reazione interrotta per aggiunta di 3 ml di TCA al 5%, freddo. Le provette sono state lasciate in ghiaccio per almeno 1 ora. Il precipitato, costituito da proteine indecomposte ( caseina ), è stato rimosso per centrifugazione a ~~3000 - 4000~~ <sup>5000</sup> rpm per 15 min e gettato.

La concentrazione dei prodotti della proteolisi presenti nel surnatante è stata determinata allo spettrofotometro misurando l'assorbimento a 280nm. Tutte le letture sono state corrette sottraendo il valore della assorbimento di soluzioni in cui non era presente il campione da saggiare ( bianco ).

Definizione della unità di attività enzimatica:-

Per confrontare l'attività proteolitica degli estratti è stata definita l'unità di attività enzimatica; <sup>o quella</sup> Una unità di attività che provoca, nelle condizione sopra descritte, l'aumento di 1 unità

di assorbanza a 280 nm per 10 min di digestione.  
 Secondo tale definizione il numero di unità per ml di campione può essere calcolato secondo la formula:

$$U/ml = \frac{\epsilon_{A_{280}}^{10min}}{V_1} \cdot V_2$$

dove  $V_1$  = volume del campione,  $V_2$  = volume di soluzione del saggio, e  $\epsilon_{A_{280}}^{10min}$  la variazione di assorbanza.

5. Determinazione delle Proteine: - La determinazione delle proteine è stata effettuata con il metodo di Lowry ed al. (53), *impiegando al posto di etanolo il solo, cioè il bicarbonato di sodio*. Il metodo richiede la preparazione delle seguenti

soluzioni:

Soluzione A:  $Na_2CO_3$  al 20% in NaOH 1N;

Soluzione B:  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  allo 0,5% in soluzione di tartrato di sodio e potassio allo 1%. Per la buona preparazione della soluzione B si deve sciogliere prima il tartrato e poi il solfato di rame.

Soluzione E: reattivo di Folin-Ciocalteu commerciale (Merk) diluito 1:2 con acqua distillata per renderlo circa 1N in acido.

Soluzione C: 50ml di soluzione A + 1 ml di soluzione B

*in pratica  
 tabella E  
 per la E  
 con TCA al 10%  
 e successivamente  
 idrolizzabili  
 in NaOH 1N*

*ms*

(da preparare fresca prima dell'uso)

Standardizzazione del metodo: Circa 3 mg di BSA (bovine serum Albumine) sono stati disciolti in 3ml di acqua distillata. Dopo aver registrato lo spettro di assorbimento della soluzione da 320 a 250nm, azzerando a 320nm, si è determinata la concentrazione della proteina (BSA) dal suo valore di assorbimento a 280nm ( $E_{280}^{1\%} = 6$ ). Questa soluzione è stata usata come soluzione madre per la costruzione della retta di taratura del metodo.

Procedimento: Aliquote di soluzione di estratto di latticella polpa, di trattenuto e di rifiutato da TPS fino a 0,4 ml o diluite, in alcuni casi, nel rapporto 1:10 con acqua distillata, sono state poste in provette, portate ad un ml con acqua, e addizionate di 2 ml di soluzione C. Dopo aver atteso 5 min a temperatura ambiente, nelle provette sono state introdotti 0,2 ml di soluzione E. Infine, trascorsi 30min, si è letto l'assorbimento a 750 nm contro acqua. Per ogni serie di saggi sono stati effettuati in parallelo due saggi in bianco nei quali era assente il campione di proteine.

La quantità di proteina, espressa in  $\mu\text{g}$ , è stata ricavata dal diagramma di taratura (fig. 6),

nel quale era riportato il valore di  $A_{750}$  ( $A_{750}$  del campione -  $A_{750}$  del bianco) in funzione di quantità note di BSA.

6 Gel filtrazione:- le resine utilizzate sono state Sephadex G-75 superfine e Sephadex G-25. Esse sono state lasciate rigonfiare in acqua distillata a temperatura ambiente per una notte. Il rapporto resina: acqua era 1:10 (peso:volume). L'attivazione delle resine è stata effettuata mediante trattamento. *con*

La cromatografia è stata compiuta ad una velocità di 3 ml/h nel caso della colonna di Sephadex G-75, di 20 ml/h nel caso della Sephadex G-25.

3.6a Gel filtrazione su Sephadex G-25 :- Il campione "Trattenuto da TPS" contiene, oltre agli enzimi proteolitici, trattenuti dalla matrice di affinità, lo ione 2-Tiopiridone, rilasciato dalla colonna di Tiopropil-Sepharosio dopo l'aggiunta del tampone addizionato di cisteina. Per eliminare questo componente a basso peso molecolare e la cisteina, utilizzata per eluire al colonna di TPS, si è ricorsi alla filtrazione su Sephadex G-25. I campioni di trattenuto da TPS sono stati quindi, prima della cromatografia, concentrati a piccolo volume mediante impiego di membrane filtranti,

Millipore (aventi peso molecolare di esclusione di 10.000) e suzione delle soluzioni con pompa peristaltica. Aliquote di 1 - 2 ml sono state caricate su colonna di Sephadex G-25 (3 x 20), in precedenza equilibrata in acido acetico 0,1N. L'eluato è stato raccolto in frazioni di 3 ml con collettore di frazioni della LKB (mod 2070); il passaggio su colonna è stato effettuato alla velocità di 20ml/h.

Dell'eluato è stato misurato l'assorbimento a 280 nm mediante Uvicord e i valori di assorbimento registrati con registratore LKB (mod. 2138).

Il picco corrispondente al materiale ad alto peso molecolare è stato raccolto per essere utilizzato nella successiva cromatografia su Sephadex G-75.

3.6b. Gel filtrazione su Sephadex G-75: - Il materiale raccolto dalla colonna di Sephadex G-25 è stato portato a secchezza in un essiccatore contenente  $P_2O_5$ , sotto vuoto. I campioni, ripresi con circa 0,5-1 ml di tampone Na-acetato 0,02 M, PH 5,0, sono stati caricati su una colonna di sephadex G-75 ( $V_{tot}$  = circa 50 ml), equilibrata ed eluita con lo stesso tampone. Sono state raccolte frazioni di 2,5 ml, il cui assorbimento è stato letto a 280 nm con spettrofotometro Perkin-Elmer.

3,7 Elettroforesi su gel di poliacrilammide:-

L'estratto grezzo, il trattenuto e il rifiutato da TPS sono stati sottoposti a gel elettroforesi su poliacrilammide. Gli estratti, dopo concentrazione, sono stati mescolati con glicerina nel rapporto: 2:1 ( V/V ) e addizionati con alcune gocce di bromo-fenolo bleu allo 0,01%. Aliquote di 10 - 20  $\mu$ l, corrispondenti a circa 200  $\mu$ g di proteina sono stati introdotti nei tubicini di elettroforesi.

3,7a Preparazione delle soluzioni Stock:- Il polimero

ottenuto dalla polimerizzazione dell'acrilammide è trasparente e presenta dei pori piccolissimi così che durante la corsa elettroforetica esso agisce come setaccio per le proteine, contribuendo alla separazione delle singole frazioni in base alle dimensioni molecolari.

I gel sono stati preparati a partire dalle seguenti soluzioni Stock:

A). pH = 8,9

48 ml di HCl 1N

36,9 g di Tris-HCl

0,46 ml di TEMED

H<sub>2</sub>O fino a 100 ml

B). pH = 6,9

48 ml di HCl 1N

5,7g di Tris-HCl

0,46 ml di TEMED

H<sub>2</sub>O fino a 100 ml.

C). 40 gm di acrilammide  
0,0 gm di BIS-acrilammide  
H<sub>2</sub>O fino a 100 ml

D). 40 gm di acrilammide  
0,0 gm di BIS-a/ammide  
15 mg di K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>  
H<sub>2</sub>O fino a 100 ml

E). 10 gm di acrilammide  
2,5 gm di BIS-a/ammide  
H<sub>2</sub>O fino a 100 ml.

F). 4 gm di riboflavina  
H<sub>2</sub>O fino a 100 ml

H). 0,14 gm di (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>  
H<sub>2</sub>O fino a 100 ml.

3,7b Tampone per elettroforesi pH = 8,3:-

Il tampone era costituito da:

6gm di Tris-HCl + 26,8 gm di glicina + H<sub>2</sub>O fino a  
100 ml. Per l'uso, il tampone era diluito 5 volte.

3,7c Soluzioni di lavoro:- Le soluzioni erano cost-

ituite dal gel di corsa e dal gel di spaziatore.

Il gel di corsa (a pori piccoli) è stata ottenuta  
mescolando le soluzioni nei rapporti:

A). : 1

B). : 1,7

D). : 0,3

H<sub>2</sub>O: : 1

La soluzione complessiva è stata poi mescolata con  
la soluzione H nel rapporto 1:1

Il gel spaziatore ( caratterizzato da pori larghi) è stato preparato mescolando le soluzioni B, E, F e  $H_2O$  nei rapporti di 1:2:1:4.

d Preparazione dei gels:-

Gel di corsa: La soluzione del gel di corsa è stata preparata in un flaconcino con tappo a tenuta.

Subito dopo si elimina l'aria dalla soluzione mediante pompa da vuoto.

I tubicini da elettroforesi sono stati riempiti con la soluzione del gel di corsa per una altezza di 9 cm. Le dimensioni dei tubicini di vetro erano:  $\phi = 0,5$  h = 13 cm. Si è poi proceduto a stratificare sopra il polimero con acqua, avendo cura di non mescolare i due liquidi. Dopo tale operazione si è lasciato polimerizzare per 1 ora ( polimerizzazione chimica). A polimerizzazione avvenuta, si è tolta l'acqua.

Gel spaziatore: Uno strato di 0,5 cm di gel spaziatore (pori larghi) è stato poi depositato nei tubicini si è stratificato con acqua e quindi si è lasciato polimerizzare con lampada fluorescente per 15 min ( polimerizzazione fotochimica). Trascorso il tempo stabilito per la polimerizzazione, si è tolta l'acqua e depositato il campione di proteina.

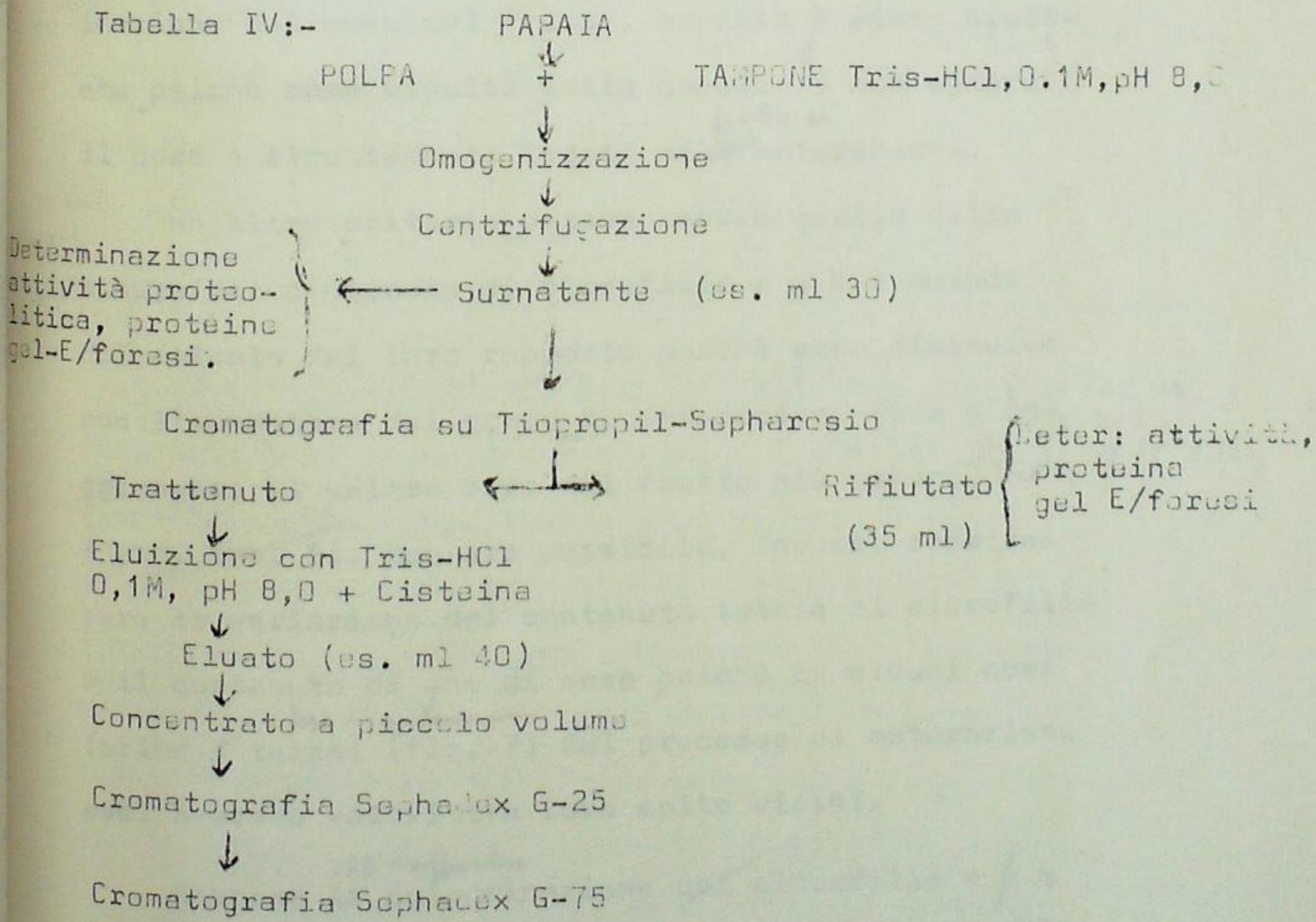
3.7e Caricamento del campione: - Il campione è stato messo sopra il gel dopo essere stato mescolato con glicerina (o saccarosio al 20%) nel rapporto 2:1 e addizionate di alcuni  $\mu$ l di soluzione di blue di bromofenolo allo 0,01%. La quantità di campione introdotta nei tubicini sono state quelle già riportate (200  $\mu$ g; 10 - 20  $\mu$ l). A questo punto, i tubicini sono stati posti nella *cella elettroforetica* ed iniziata l'elettroforesi.

3.7f Condizioni dell'elettroforesi: - La camera superiore e quella inferiore della cella elettroforetica sono state riempite con tampone Tris-HCl-glicina (pH 8,3), diluito 5 volte. L'elettroforesi è stata condotta imponendo una corrente di 8 mA/tubo ed è stata prolungata fino all'uscita del blue di bromofenolo dai tubi (4h). A fine corsa, i gels sono stati estratti dai tubicini mediante apposita siringa riempita di acqua.

3.7g Colorazione e fissazione dei gels: - I gels sono stati posti per 45 min in una soluzione all'1% di nero d'amido in  $\text{CH}_3\text{COOH}$  all'7%. Tale soluzione serviva contemporaneamente a colorare e a fissare la proteina.

3.7h Decolorazione dei Gels:- Dopo lavaggio con acqua, i gels sono stati posti in soluzione di ac. acetico al 7%, agitando ogni tanto ed avendo cura di cambiare la soluzione fino a decolorazione dei gels. Nella tabella IV sono stati riassunte le operazioni a cui è stata sottoposta la polpa di frutto.

Tabella IV:-



Schema tipico di estrazione e di separazione di enzimi proteolitici da polpa di frutto papaia,

#### RISULTATI

4. Sebbene la continua fioritura faccia sì che  
sull'albero di papaia si trovino frutti a variabile  
grado di maturazione, il primo problema da risolvere  
per studiare l'attività proteolitica è stato quello  
della scelta del criterio di valutazione del grado  
di maturazione.

Un primo criterio poteva essere quello della deter-  
minazione del peso del frutto, ma esso è stato scart-  
ato poichè ~~come~~ risulta dalla <sup>1</sup>tabella V non sempre  
il peso è strettamente legato alla <sup>modo di</sup>maturazione.

Un altro criterio poteva essere quello della  
misura del contenuto di clorofilla a e b e quindi  
del calcolo del loro rapporto poichè esso diminuiva  
con l'aumentare del grado di maturazione fino a ra-  
ggiungere il valore zero nel frutto più maturo (Tab. 1)  
(ved. tab. 5). Non era possibile, invece, conside-  
rare la variazione del contenuto totale di clorofilla  
o il contenuto di una di esse poichè in alcuni casi  
(prima e terza) <sup>fase di maturazione</sup>(fig. 7) del processo di maturazione  
essi avevano valori tra loro molto vicini.

<sup>il rapporto</sup> Sebbene la determinazione ~~dei~~ clorofilla a / b  
sia valida, la misura dei solidi solubili (BRIX)  
mediante rifrattometro è stato <sup>come criterio di</sup>tuttavia preferita, <sup>maturazione</sup>  
perchè meno laboriosa e più rapida di quella

dei pigmenti fotosintetici. Il valore del brix aumentava dal frutto più acerbo dal valore 4,2 al valore 12 del frutto completamente maturo (tab. ~~1~~).

Tab. ~~1~~: Peso (g) del frutto e volume (ml) di omogenato di 100g di polpa di frutto di papia a differente grado di maturazione. Il numero 1 indica il frutto più acerbo.

Grado di maturazione	1	2	3	4
Peso del frutto	286	613	983	407
Volume dell'omogenato	67	74	77	59
<i>Chlorophyll</i> <i>Total</i> Rapporto clorofilla				
a/b	3,0	2,7	0,7	0,0
Brix	4,2	6,0	8,9	12

Il contenuto di proteina nell'estratto grezzo di polpa, come anche nel trattenuto e rifiutato da Tiopropil-Sepharosio, raggiungeva il valore massimo in corrispondenza dello stato di maturazione 3° e diminuiva nel 4° (Tab. ~~VI~~ <sup>2</sup>). La quantità di proteina nel trattenuto era in media il 28% dei corrispondenti campioni grezzi, mentre il recupero della proteina era in media il 91% dell'estratto grezzo. (Tab. 2)

L'attività proteolitica nell'estratto grezzo espressa come unità di attività per 100gm di polpa, raggiungeva il valore massimo nel terzo stato di

maturazione, analogamente a quanto si verificava per il contenuto di proteina (Tab. <sup>3</sup> VII). L'incremento di attività era il 125% del valore riscontrato nel frutto ~~più acerbo~~ -  
più acerbo, anche nella polpa di frutto completamente maturo si verificava un incremento dell'attività proteolitica ma essa era solo il 20%. *Si quella del frutto più acerbo*

Nel trattenuto e nel rifiutato da TPS l'andamento dell'attività in funzione della maturazione era identico a quello del grezzo. Inoltre, la somma delle attività del trattenuto e del rifiutato era, in generale, equivalente a quello dell'estratto grezzo.

L'attività del trattenuto era in media per tutte le fasi di sviluppo intorno al 76%, dell'attività recuperata (Tab. <sup>3</sup> VII).

L'attività proteolitica <sup>specifica</sup> dell'estratto grezzo di polpa, ~~espressa in mgX di proteina (attività specifica)~~, aveva invece il valore massimo in corrispondenza del frutto più acerbo. Nei restanti stati di maturazione l'attività specifica assumeva valori più bassi e costanti (Tab. <sup>4</sup> VI-I).

Il passaggio degli estratti grezzi su colonna di Tiopropil-Sepharosio provocava un incremento d'attività degli enzimi proteolitici nel trattenuto di circa 170% dei valori del grezzo. *(v. p. 4)*

9

Incrementa di attività, anche se di minore entità (100%) sono stati trovati anche nei trattenuti di lattici (54) nelle stessi frutti, (VIII)

Nel rifiutato nel quale si riscontrava pure attività proteolitica, l'attività specifica assumeva valori tre volte inferiori a quella dei rispettivi grezzi. (Tab. VII)

La separazione dei componenti del trattenuto da TPS, ottenuto da polpa di papaia acerba e matura mediante cromatografia su Sephadex G-25 indicava la presenza in entrambi di tre componenti, di cui uno in quantità elevata (fig. VIII).

La cromatografia su Sephadex G-75 mostrava invece rapporti diversi tra i componenti dei due trattenuti. Il maggiore componente nel caso del trattenuto di frutto maturo era quello indicato con il numero 3. Nel caso invece del trattenuto di polpa acerba prevaleva il componente numero 2, (Fig. VIII).

L'elettroforesi su gel di poliacerilammide di estratti grezzi, trattenuti e rifiutati, riportati nella fig. X, mostrava la presenza di tre bande negli estratti grezzi e nei rifiutati, ed una sola banda nei trattenuti. La banda dei trattenuti coincideva con quella della papaina commerciale.

Ref. in 10/25/000  
Rus. in 10/25/000  
(A+B)

*→ Un aumento del contenuto di enzimi proteolitici  
o una loro attivazione concomitante  
con l'aumento di proteina*

5. DISCUSSIONE:- I risultati presentati in questa ~~tesi~~ <sup>lezione</sup> dimostrano che l'attività proteolitica di estratti grezzi di polpa di papaia cresce fino alla fase antecedente la maturazione completa. A maturazione completa, l'attività è tuttavia superiore a quella riscontrata per la polpa di frutto più acerbo.

Un risultato analogo è stato ottenuto nello studio dell'attività proteolitica di lattice di papaia ~~uguale~~ <sup>non</sup>. Il lattice era estratto dagli stessi frutti da noi utilizzati, (54).

Cambiamenti dell'attività proteinasica in lattice di papaia sono stati osservati anche per papaia, var. ~~Solo~~ (55).

L'attività specifica degli enzimi proteolitici (~~Tab. Iab.~~ <sup>Tab. VI</sup>), al contrario, assumeva valori costanti con l'aumentare del grado di maturazione di frutto. Tutti i valori erano inferiori <sup>o uguali</sup> a quelli del frutto più acerbo (Tab. VII). <sup>L'incremento del contenuto di proteina nella polpa e il valore costante della</sup> ~~attività specifica, dalla 2<sup>o</sup> fase di maturazione in poi suggeriscono che la sintesi e la demolizione delle proteasi avvengono con la stessa velocità delle proteasi non -SH.~~

*La differenza il poco di maturazione si ha nella  
attività degli enzimi proteolitici o una loro  
attivazione concomitante con l'aumento di  
proteina*

I componenti del lattice di papaia sono quattro (37): papaina, chimopapaina, papaia peptidasi e un componente sconosciuto, di cui si sa molto poco. Questi enzimi sono rispettivamente il 5-27-18 e 14% della proteina solubile (37). È stato pure riportato che la papaina e la chimopapaina da lattice secco sono sotto tre stati: attivo, attivabile e non attivabile (56). Lo stato attivabile per essere reso attivo mediante riduzione con cisteina o glutatione.

<sup>coste</sup> I <sup>Da un'osservazione</sup> risultati ~~da noi ottenuti~~ per la polpa di papaia non ci permettono di conoscere il livello di questi stati, nè di sapere quali di questi e in quali misura contribuiscono alla diminuzione della attività proteolitica che osserva <sup>ella</sup> ~~con il procedere~~ della maturazione. Nulla è possibile dire attualmente anche per i singoli enzimi. Per l'incremento di attività proteolitica osservato nel lattice (55), <sup>Tuttavia,</sup> tuttavia è stato riportato che con la maturazione aumentano l'attività della chimopapaina e quella di una proteinasi, chiamata proteinasi D. L'attività della papaina, che era assente nel lattice di frutto acerbo, rimaneva invece costante. È probabile, ma è da dimostrare, che nella polpa di papaia gli stessi enzimi

siano responsabili dell'iniziale diminuzione di attività specifica.

Tra gli scopi di questa <sup>lezione</sup> ~~tesi~~ c'era quello di verificare se il Tiopropil-Sephariosio aveva la capacità di separare in modo efficiente le proteine caratterizzate da gruppi -SH liberi quindi gli enzimi proteolitici, da quelle non contenenti gruppi sulfidrilici. Le tabelle <sup>3</sup> VII e <sup>4</sup> VIII chiaramente dimostrano che la resina separa in modo efficace questi enzimi e che il metodo è superiore a quello classico (37). L'attività specifica del trattenuto da TPS è infatti oltre il 150% superiore a quella dell'estratto grezzo. La purificazione con il metodo classico porta pure ad un aumento di due volte dell'attività, ma questo si verifica dopo numerosi passaggi (37).

La presenza di una sola banda nell'elettroforegramma di trattenuto da TPS conferma, inoltre, *ha confermato la* bontà della tecnica di separazione di proteina -SH liberi con il Tio-Sephariosio. E' anche da mettere in evidenza che questa banda coincide con quella della papaina commerciale, Cio non esclude la presenza degli altri enzimi *proteolitici* nella stessa banda che allora si ricorra a separazione elettrofore-

tica con impiego di SDS (Sodio-Dodecilsolfato).

D

*della quale misura*

L'osservazione della Tab. VII e VIII potrebbe

tuttavia inficiare parzialmente le conclusioni su

riportate poichè il rifiutato da TPS ha attività pr-

*proteolitica nel feltro di*

oteolitica. Cioè comunque da escludere poichè è

stato riportato (15) che nella estrazione con tamponi

privi di sostanza riducenti gli enzimi -SH liberi

possono essere parzialmente ossidati dall'ossigeno

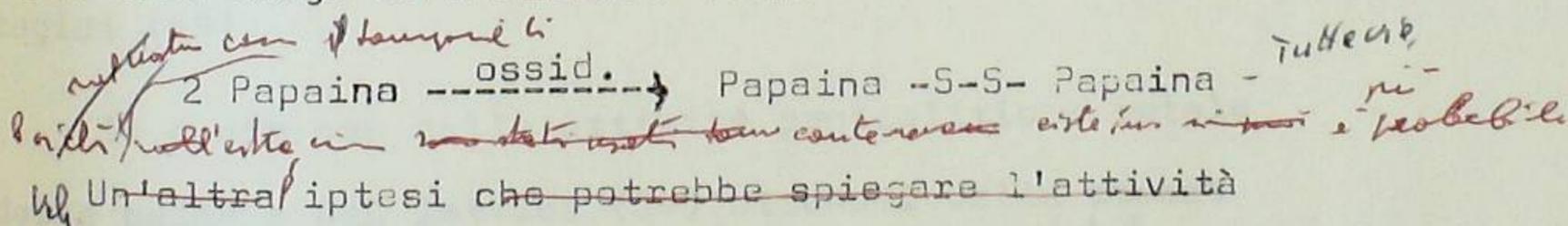
(15)

dell'aria. La conseguenza è che essi non possono es-

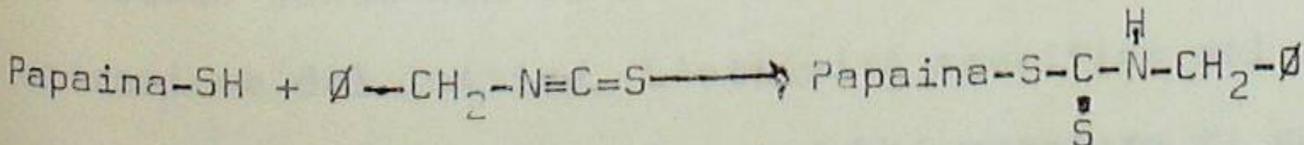
~~essere~~  
persone

sere più trattenuti dal TPS. Per es<sup>pe</sup> la papaina pot-

rebbe aver luogo la reazione (15):



nel rifiutato è quella della formazione tra gli enzimi proteolitici e il benzilisotiocianato di un complesso tipo papaina-benzilisotiocianato (57), secondo la reazione:



Il complesso, non trattenuto dalla resina, sarebbe poi attivato dalla cisteina al momento della determinazione dell'attività del rifiutato.



2

Tab. VI. <sup>2</sup> ~~VI~~ Cont<sup>o</sup>tenuto di proteina (mg/100gm di polpa) nell'estratto grezzo, nel trattenuto e nel rifiutato da Tiopropil Sepharosio di polpa di frutto di papaia a diverso grado di maturazione. Il numero 1 indica lo stato più acerbo

Grado di maturazione	1	2	3	4
Grezzo	184	391	653	311
Trattenuto	49	118	183	88
rifiutato	118	250	370	217

3

Tab. VII. <sup>3</sup> ~~VII~~ Attività proteolitica (Unità/100gm di polpa). Nello estratto grezzo, rifiutato e nel trattenuto da Tiopropil-Sepharosio di polpa di frutto di papaia a diverso grado di maturazione. Il No 1 indica lo stato più acerbo.

Grado di maturazione	1	2	3	4
Grezzo	2612	3597	3877	3110
Trattenuto	1895	2524	4500	2200
Rifiutato	619	850	1110	741

$$\begin{array}{r}
 \overline{26120} \\
 142 \\
 \hline
 1142 \\
 1136 \\
 \hline
 = 560
 \end{array}
 \quad
 \begin{array}{r}
 14.2 \\
 \hline
 184
 \end{array}$$
  

$$\begin{array}{r}
 \overline{35870} \\
 276 \\
 \hline
 = 837 \\
 828 \\
 \hline
 = 90
 \end{array}
 \quad
 \begin{array}{r}
 18.2 \\
 \hline
 391
 \end{array}$$

Tab. <sup>4</sup>VIII. Attività proteolitica (unità/mg<sup>specific</sup> di proteina) nello estratto grezzo, nel trattenuto e nel rifiutato da Fiopropil-Sepharosio di polpa frutto di papaia a diverso grado di maturazione. Il No 1 indica lo stato più acerbo.

Grado di maturazione	1	2	3	4
Grezzo	14,2	9,2	9,0	10,0
Trattenuto	38,6	30,5	24,0	25,0
Rifiutato	5,2	3,4	3,0	3,4

Tab. IX. Attività proteolitica (Unità/Frutto) di polpa e di lattice estratti nello stesso frutto.

Grado di maturazione	1	2	3	4
Polpa	7470	22049	57770	12657
Lattice	2183	3486	6566	2535

Il No 1 indica lo stato Più acerbo.

# NOTA PER IL CALCOLO DELLA CLOROFILLA

Dependence of Chlorophyll Synthesis on Protein Synthesis

203

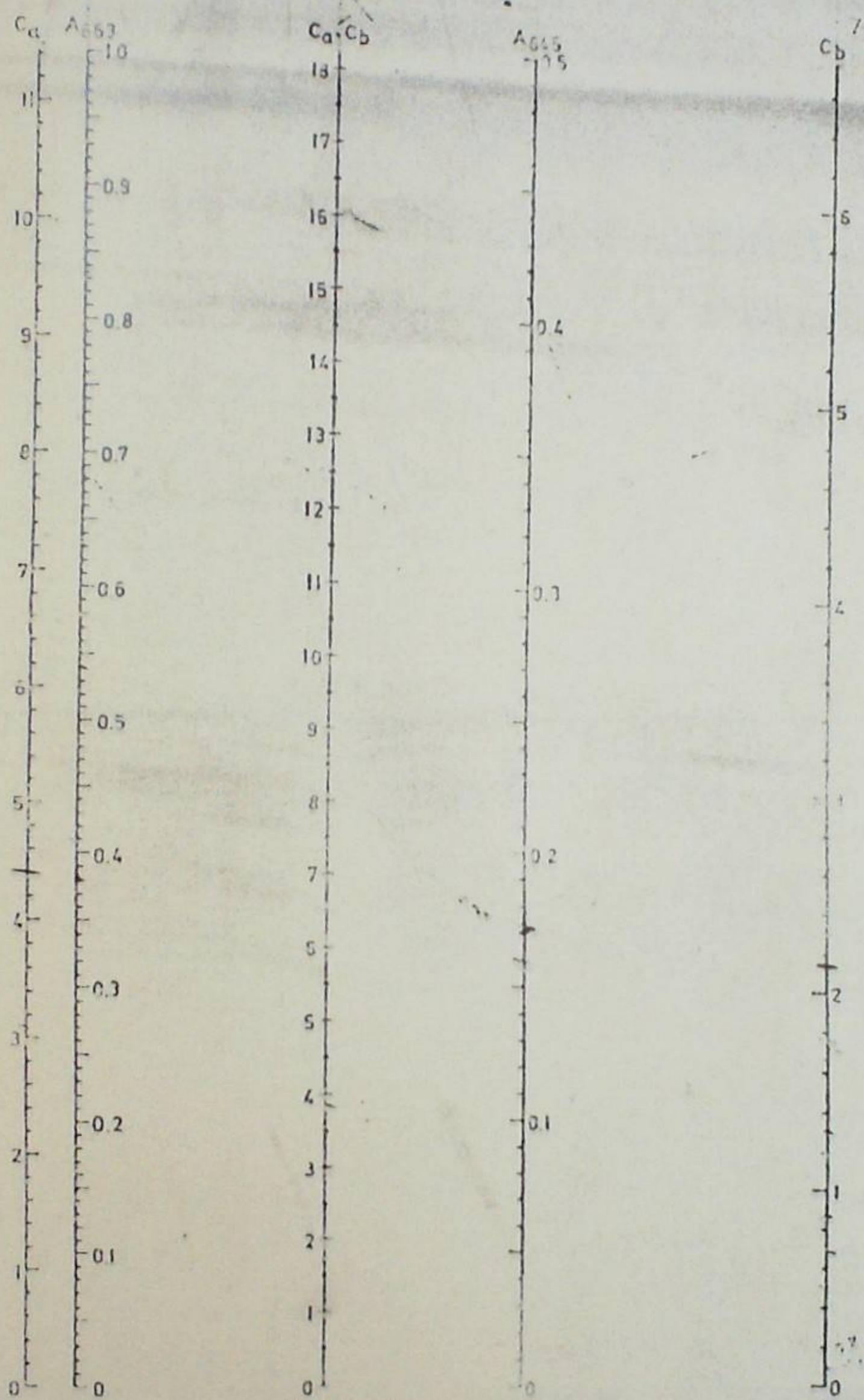
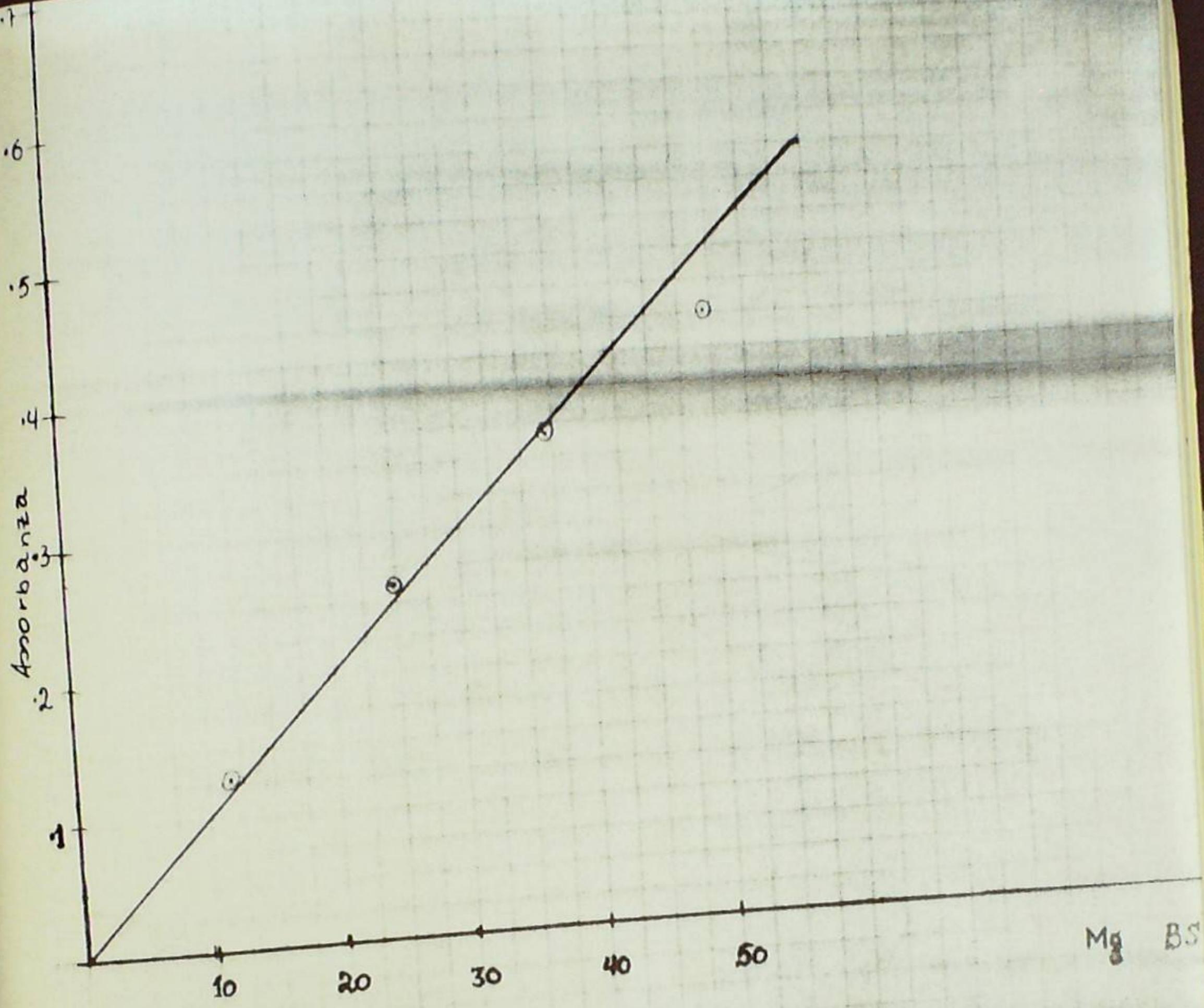


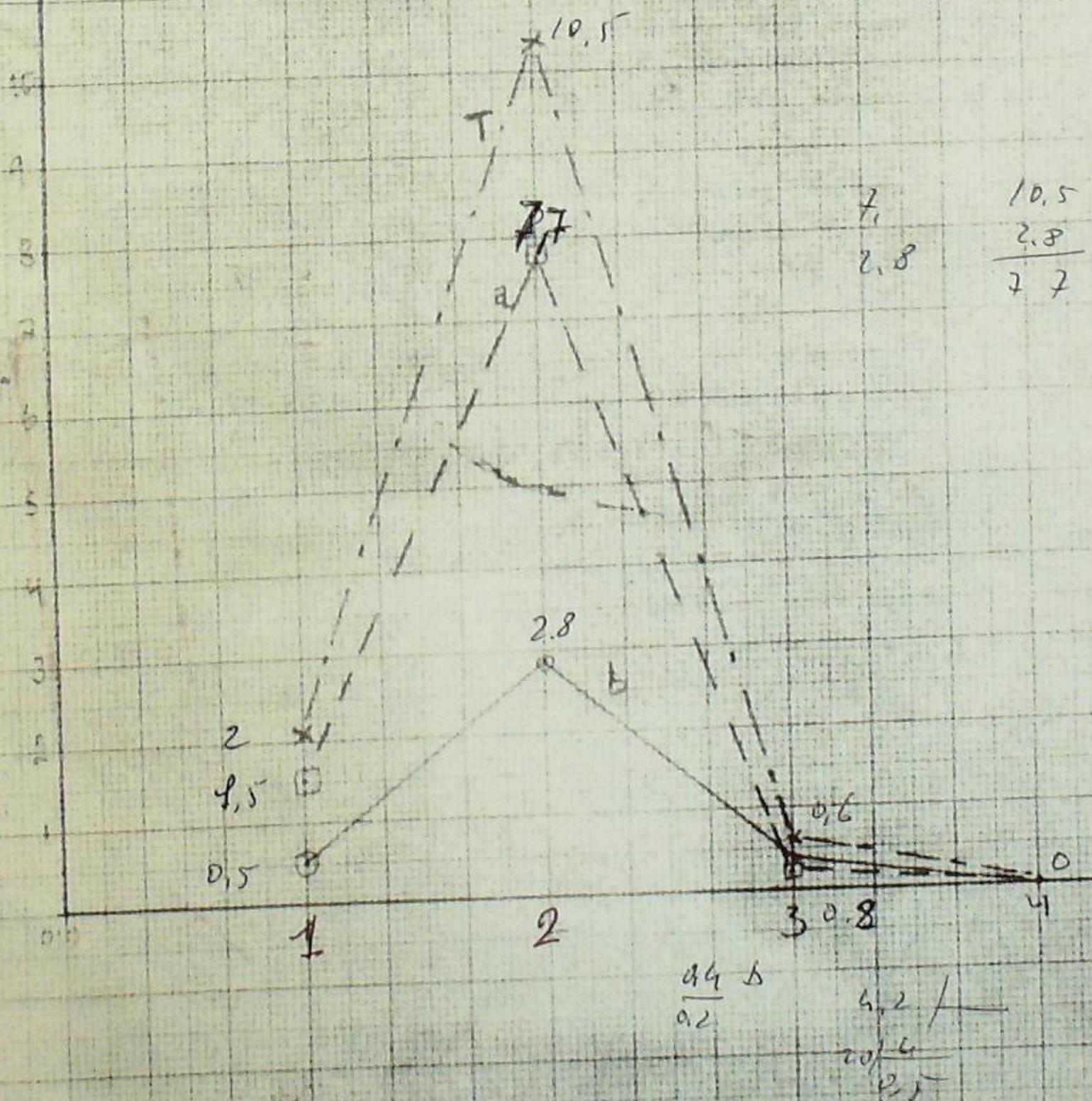
Fig. 1 (for legend see p. 202)



figs VII

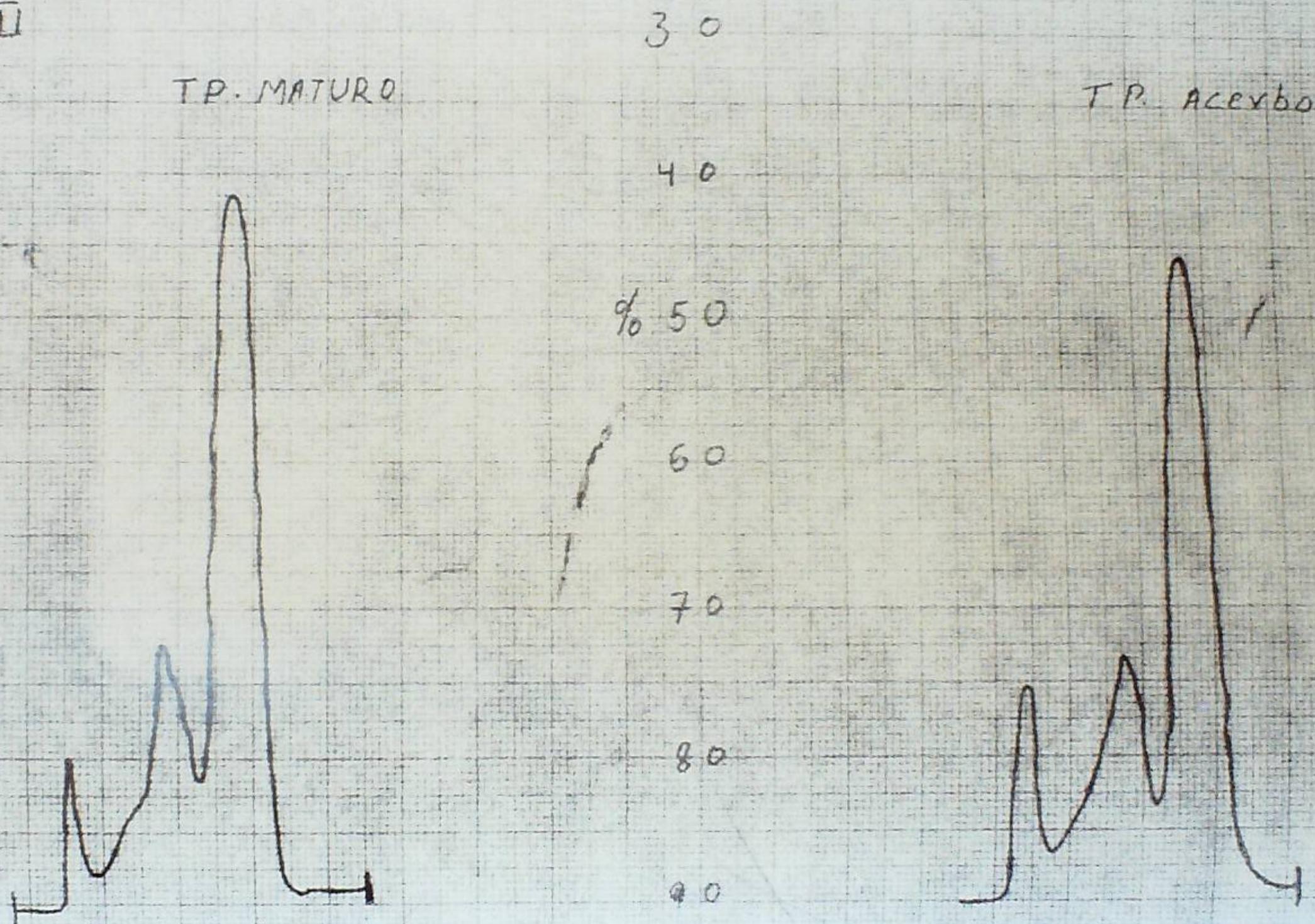
ANDAMENTI NEL CONTENUTO DI

CLOROFILLA  $a$ ,  $b$  e  $(a+b)$



Separazione dei componenti del Trattenuto da TPS  
SU G-25

fig. VIII



Gel filtrazione su sephadex G-75 di TPA-

fig. IX

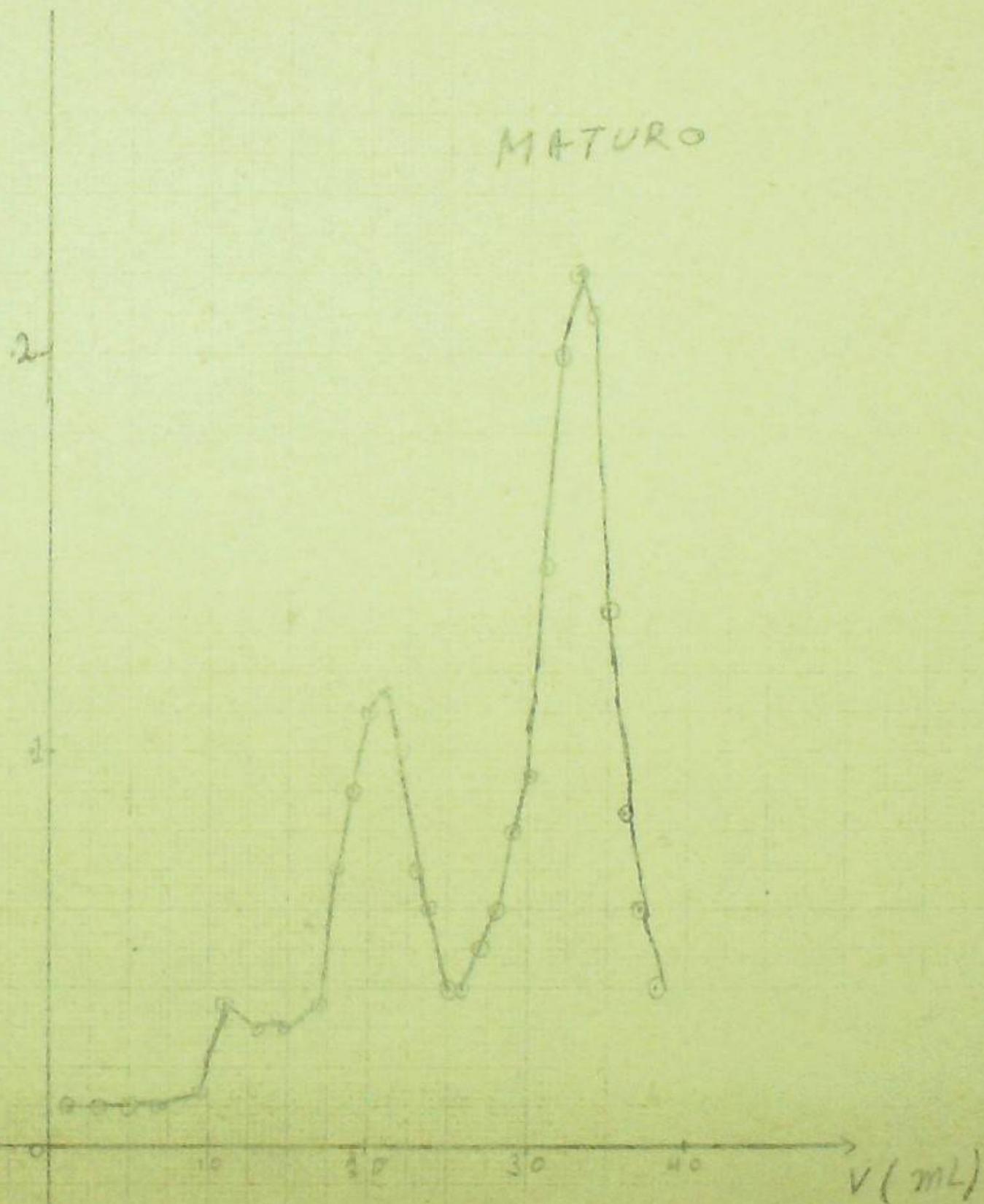
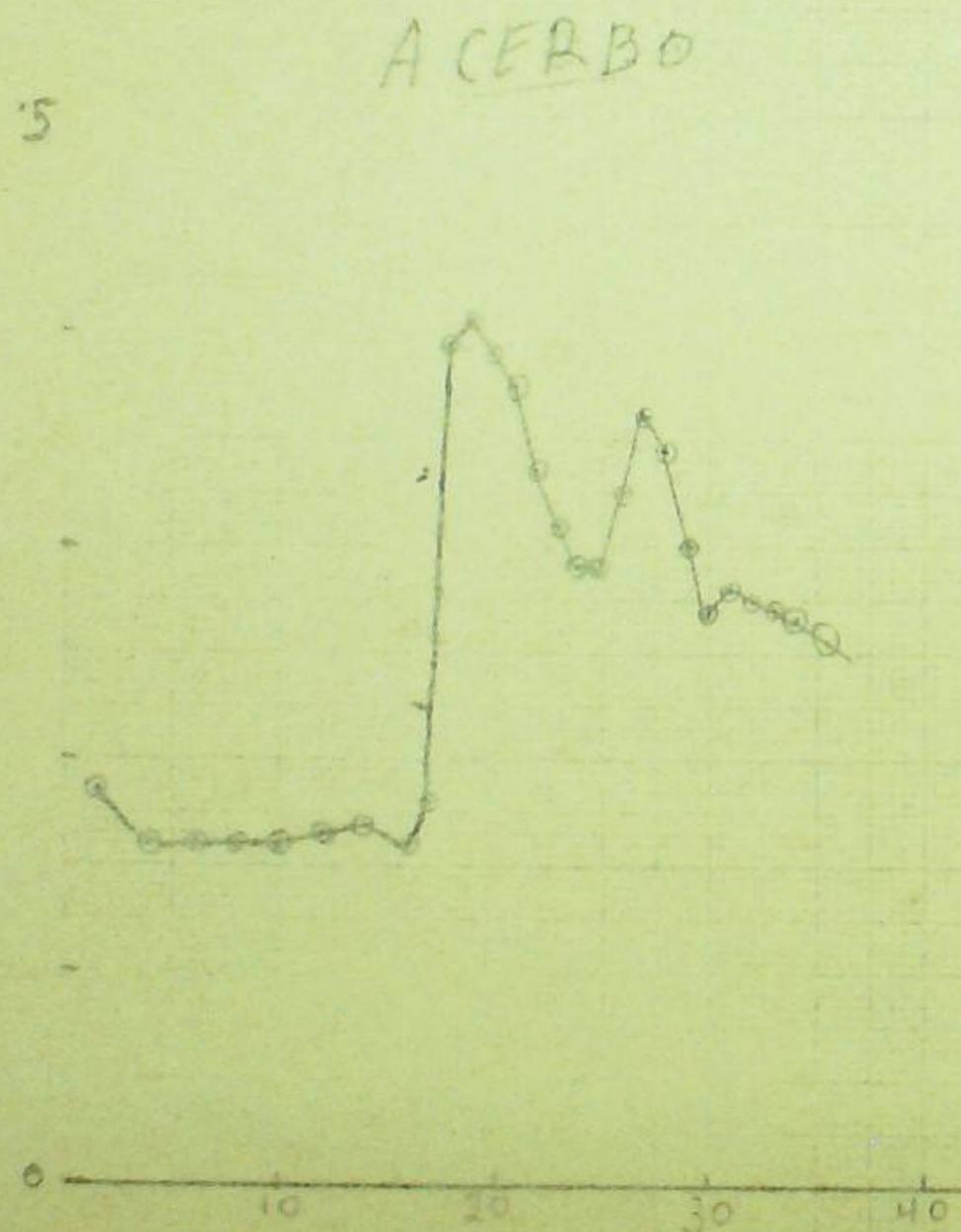
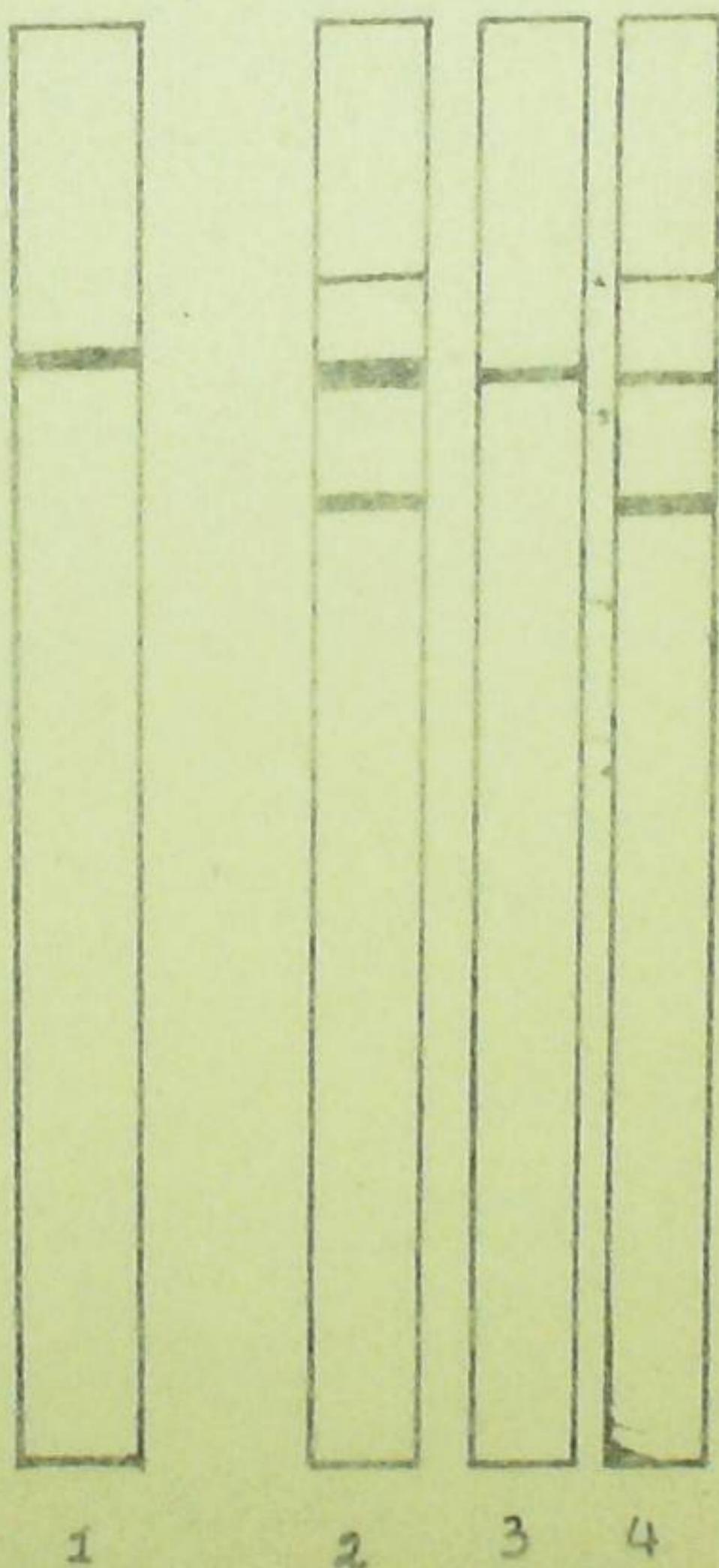


Fig :-  $\bar{X}$

Gel Elettroforesi a pH=5.0  
di papaina commerciale (1),  
di estratto guazzo (2), di  
trattenuto (3) e  
Rifiutato (4) da TPS



## B I B L I O G R A F I A

1. Chan H. T., Tang C.S. The chemistry and Biochemistry of Papaya. In: Inglett GE, Chalambous G(eds) Tropical foods: Chemistry and nutrition. Newyork; Accademic press, pp 33 - 55 (1979)
2. Heid J.L, Curl Al. Papaya products, Fruit Prd. J. Am. Food Manf. 24, 41 (1944).
3. Purselove, J.W. Tropical Crops. Dicotyledons. Vol.I, J. Wiley and Jons, Inc., N.Y. p 45 - 51 (1968).
4. Tang, C.S., and Hamilton, R.A. Photochemistry 11 (1976).
5. Williams, L.O., Fieldiana (Botany) 29 368 (1961).
6. Tang, C.S., Syed, M.M. & Hamilton R.A. Potochemistry 15, 2531 (1972).
7. Quisumbing, E. Medical Plants of Philippines, Bureau of print, Manila, P.632-637 (1951).
8. Chopra, R.N. Indigenous drugs of India. 2<sup>nd</sup> ED. p. 319 - 311, U.N. DHUR, Calcutta, (1958).
9. Souza, R.A. Private Comm. (1978).

10. Leverington, R. Private Comm. (1976).
11. Broderick, H.T. Jacobs, C.J, Swartz, H.D., and Mulder, N.J. (November, 1972) Citrus Grower and Sub-tropical fruit J. p. 5, 7, 9, 21.
12. Wenkam, N.S. and Miller, C.D. Hawaii Agric. Expt. Stn. Bull. 135, Honolulu, (1965).
13. Brekke, J.E., Cavaletto, C.G., Nakayama, T.O.M. & Suehisa, R. J. Agric. Food Chem. 24 341 (1976).
14. Chan, H.T., Jr and Kwok, S.C.M. J. food Sci. 41, 320 (1976).
15. Pratt, D.S., & Del Rosario Philippine J. Sci. 81, 59 (1913)
16. Pope, W.T. Hawaii Agric. Expt. Stn. Bull. 61, Honolulu, (1930).
17. Thomson, A.R. Hawaii Agric; Expt. STN. ANN. Report, Honolulu, (1914).
18. Stahl, A.L. Univ. Florida Agric. Expt. STN. Bull. 283 Gainesville, (1935).
19. Jones W.S. & Kuboda, H. 1940, Plant Phys. 15: 711 (1963).
20. Chen, N.K.L. Chemical changes during the post-harvest ripening of papaya fruit, M.S. Thesis, University of Hawaii Honolulu (1963).
21. Dolla, M.A., Hanaoka, M., Moy, J.H., Cinnamon, A.D., Hamill, E., Helber, D., Hsai, S.T., & Wenkam, D., In " Radioisotope & radiation applications"

Nu 347 - 17, Tid - 4500, P.86, Division of Isotopes  
Development U.S. Atomic Energy Comm.  
(1969).

22. Chan, H.T., Jr., & Kwok, S.C.M., J. Food Sci. 40: 770  
(1975).

23. Ogata, J.N., Kawano, Y., Bevenue, A., & Casarett, L.J.,  
J. Agric. Food Chem. 20: 113 (1972).

24. Pulley, J.N., & Von Loesecke, H. W., Fruit Product,  
J. 21:37 (1941).

25. Chan, H.T., Jr., Chang, T.S.K., Stafford, A.E., & Krekke,  
J.E., J. Agric. Food Chem. 19:263 (1971)

26. Katague, D.B., & Kirch, E.R., J. Pharm. Sci 54:891 (1965).

27. Tang, C.S., Paper No. 92, 160<sup>th</sup> ANN. ACS meeting  
Chicago, Illinois (Abstract) (1970)

28. Chan, H.T., Jr., Flath, R.A., Forrey, R.R., & Cavaletto  
C.G., J. Agric. food. Chem. 21:566  
(1973).

29. Flath, R.A., & Forrey, R.R., J. Agric. Food Chem. 25:103  
(1977).

30. Ettlinger, M.G., & Hoogkins, J.E. Org. Chem. 21:204  
(1956).

31. Gmelia, R., & Kjaer, A., Phto. Chem. 9:59 (1970).

32. Tang C.S., Bhothiopakes, K., & Frank, H. S., Appl. Microbiol. 23:1145 (1972)
33. Yamamoto, H. Y., Nature 201:1049 (1964) 
- 34) Tang C.S., J. Food Sci. 39:94 (1974)
- 35) Tang C.S., & Tang W.J, Biochem, Biophys. ACTA 452:510 (1976)
- 36) Kunimits, D. K., & Yasunobu, K.T., Biochem., Biophys. ACTA 139:405 (1967)
- 37) Kimmel, J. R., & Smith, E.L., J. Biol. Chem. 207:515 (1954)
- 38) Sanner, T., & Phil, A., J. Biol. Chim. 238:165 (1963)
- 39) Klein, I.B., & Kirch, J.F., J. Biol. Chim. 24:5928 (1969)
- 40) Brocklehurst, Jr., Carlsson, J., Kierotan, M.P.J. & Crock, E.M. Biochem. J. 133:573 (1973)
- 41) Blumberg, S., Schechter, I., & Berger, A., Eur. J. Biochem. 15:97 (1970)
- 42) Sluntermann, L.A.A., & Wijdenes, J. Biophys. Acta 200:593 (1970)
- 43) Burke, D.E., Lewis, S.D., & Shafer, J.A. Arch Biochem. Biophys. 164:30 (1974)
- 44) Dreuth, J., Jansonius, J.N., Koekoek, R., Sluyterman, L.A.A. & Wolthers, B.G. Phil. Trans. Roy. Soc. LOND. pg 257:231 (1970)

- 45) Dreuth, J., Jansonius, J.N., Koekoek, R., & Wolthers  
B.G. ADVS in Protein chem. 25:79 (1971)
- 46) Schack, P. Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg  
36:67 (1967)
- 47) Jansen, E.F., & Balle, A.B. Biochem. Biophys. Reser.  
Comm. 32:898 (1968)
- 48) Balland, J. Brevetto Francese No 548,606 (1921)
- 49) Van Gilse, G.E. Rev. G; Caoutchou 29:117 (1952)
- 50) Gottshall, G.Y.; & Kies, M.W., Food Res. 7:373 (1942)
- 51) Wallersteisi, L. Brevetto U.S.A. No 2077,449 (1937)
- 52) Arnon, R. & Shapiro, E. Biochem. 6:3949 (1967)
- 53) Lowry, O.H., Rosenbrough, J., Farm, A.L. & Randal, R.J.  
J. Biochem. 193:265 (1951)
- 54) Abdihafid Sh. Ali (Tesi) Attività Proteolitica di  
Lattice di Frutti di carica Papaia (1982)
- 55) Skelton, G.S. Phytochem. 8:57 (1969)
- 56) Kimmel, J.R. & Smith, E.L. Adv. Enzymol. 19:267 (1957)
- 57) Tang, C.S. Phytochem. 10:117 (1971)
- 58) Reid, E.E. Organic Chemistry of bivalent sulfur  
Vol. 5 Pg 79, Chemical Publishing, N.Y.  
(1966)

\*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\*

F I N E

NELLA PAPAYA

16 caroteni

- 1 Phyben -  $\alpha$  - caroten
- 2 Phytofluor -  $\beta$  - carotene } fluorescent
- 3  $\xi$  carotene
- 4 xanthophylls
- 7  $\beta$  - carotene
- 15  $\beta$  cryptoxanthin
- 16  $\beta$  carotene 5.6. epoxide
- 17 lutein
- 21 cryptofluor
- 24 antherone AUROCHROMO
- 25 anthroxanthin ANTHEROXANTHIN
- 28 flavoxanthin FLAVOXANTHIN
- 33 lutioxanthin LUTEOXANTHIN
- 35 neoxanthin

la papaya de PH. 23'000	5%
chromophylls (A <sub>1</sub> ) PH 35'000	27%
papers repliées	18%
composants secondaires	14%

carotene xanthine ?

CAROTE  $\alpha = 15\%$   
PROVITAMINE A  $\beta = 85\%$   
 $\gamma = 0,1\%$