



RESUMEN

Se realizaron estudios de aislamiento de las proteasas contenidas en el látex de cuaguayote (*Jacaratia mexicana* A. D.C.) ensayando, comparativamente, métodos cromatográficos de separación por exclusión de tamaños moleculares e intercambio iónico, con el método de extracción bifásica acuosa utilizando un sistema constituido por polietilén glicol y sulfato de amonio. En la fase inicial de la investigación se determinó que el látex de cuaguayote proveniente de plantas en estado silvestre mostró, comparativamente con el látex de plantas semicultivadas, una mayor actividad proteolítica sobre caseína y un patrón de especies proteínicas con una mayor diversidad de componentes, al menos ocho, con masas moleculares ampliamente distribuidas en toda la gama de movilidades relativas. Con base en estos resultados, se seleccionó el látex de cuaguayote silvestre para realizar el presente estudio. El sistema de extracción bifásica acuosa ensayado (PEG 8000 12%, sulfato de amonio 15% y látex 15%) produjo cuatro fases en las que separó, de manera más eficiente y rápida, diferentes especies con actividad proteolítica: una fase precipitado (P), de la que se obtuvo a su vez un precipitado ligero (PL) de menor densidad; y la fase sobrenadante (S), de la que se separó un sobrenadante ligero (SL). Estas preparaciones presentaron perfiles electroforéticos similares de componentes proteínicos pero con diferentes grados de purificación. Las determinaciones de actividad proteolítica (caseinolítica), amidolítica sobre el sustrato cromogénico BAPNA, y de actividad sobre gelatina analizada mediante zimografía en gel de poliacrilamida, de las proteasas contenidas en la Fase P, demostraron el aislamiento definido de tres proteasas con masas moleculares de 22, 24 y 26 kDa aproximadamente. Se interpreta que el componente de 24 kDa correspondería a la proteasa mexicana, y que las otras dos corresponden, en principio, a nuevas especies proteolíticas que no habían sido informadas anteriormente, que requerirán de más investigación. Los resultados mostraron la utilidad y amplias perspectivas de la EBA en el aislamiento y purificación rápida, en mayores concentraciones, de las proteasas del látex de cuaguayote, facilitando con esto la potencial realización de estudios de caracterización bioquímica y estructural subsecuentes más completos.



ABSTRACT

Isolation studies were carried out on the proteases from the latex of cuaguayote (*Jacaratia mexicana* A. D.C.), several chromatography methods were assayed, i.e. molecular weight exclusion and ion exchange, and compared with aqueous two phase extraction method based on the use of polyethylene glycol (PEG) and ammonium sulphate. At the initial steps of this work, it was observed a greater proteolytic activity on casein and a more diverse pattern of protein species for the latex from wild plants of *cuaguayote*, with at least eight components which had molecular masses widely distributed over the studied range of relative mobilities, as compared to those found in the latex from semi cultured plants. Based on this results, it was selected the latex from wild cuaguayote for this work. The assayed aqueous two phase system (12% PEG 8000, 15% ammonium sulphate and 15% latex) resulted in efficient and rapid way to separate four phases with proteolytic activity: a precipitate (P), from which a light precipitate (PL) with lower density was obtained, and the supernatant phase (S), from which was separated a light supernatant (SL). All these preparations presented similar electrophoretic patterns of protein components but with different purification degrees. The proteases present in the phase P were assayed for caseinolytic and amidolytic activity, this last one was made on chromogenic substrate BAPNA, and also was proved the proteolytic activity on gelatin by means of zymography in polyacrylamide gel. The obtained results showed a clearly outlined isolation of three proteases with molecular mass of 22, 24 and 26 kDa approximately. From these results it can be inferred that the 24 kDa component may be identified as mexicain, and the other bands may correspond to new proteolytic species not reported previously, that will require further investigation. The obtained results with EBA showed the utility and ample perspectives on the isolation and rapid purification for the proteases from the latex of *cuaguayote*, to yield better concentrations and with this the achievement of more complete biochemical and structural studies.