Thesis Title Rapid Methods for Production of Purified Cysteine Protease and Chitinase from Papaya Latex

Author Mr. Sarote Nitsawang

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Hataichanoke Niamsup	Chairperson
Dr. Bundit Leelasart	Member
Dr. Pairoje Kijjanapanich	Member

ABSTRACT

Thai *Carica papaya* latex possessed of proteolytic activity and protein of 13.9±2.7 u/mg protein and 41.2±13.7 mg protein/g latex, respectively.

The analysis of protein in the latex by cathodic gel electrophoresis, enzyme activity, N-terminal amino acid sequence and molecular weight, showed that it composed of five major proteins including papain, chitinase (GIEKII), chymopapain (YPQSID), glycyl endopeptidase (LPESVD) and caricain (LPENVD) of which constituents were 5.29±2.62%, 21.90±5.87%, 20.09±5.30%, 40.69±11.04% and 12.53±4.06%, respectively.

Papain, chitinase, chymopapain, glycyl endopeptidase and caricain could be fast and easily purified from papaya latex by rapid method using an aqueous two-phase system, a two-step salt precipitation and chromatography. The purification of papain by aqueous two-phase extraction of 8% PEG6000-15% ammonium sulfate

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

containing 40 mg protein/ml, pH 5 provided higher yield of protease activity and higher purity in comparison with a two-step salt precipitation. Chitinase and glycyl endopeptidase were purified by using 20 and 13% sodium chloride, respectively. Chymopapain, glycyl endopeptidase and caricain were isolated by Mono S cation exchanger column. Caricain could be purified by precipitation using 85% saturated ammonium sulfate. Papaya latex of 30 g yielded purified papain, chitinase, chymopapain, glycyl endopeptidase and caricain of 58, 100, 12, 241.3 and 147 mg of solid, respectively.

Molecular weight of purified cysteine proteases and chitinase were determined by electrospray mass spectrophotometer and found that papain and chitinase were of 23466 and 26540 daltons respectively. Glycyl endopeptidase presented two isoforms were 23335 and 23365 daltons, respectively. Four isoforms of caricain were 23212 23326 23419 and 23612 daltons, respectively.

The specific activity of four cysteine proteases towards four substrates revealed that casein and Boc-Ala-Ala-Gly-pNA were the best substrates for papain and glycyl endopeptidase respectively, whereas BAEE and BAPNA were the best substrate for chymopapain

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ วิธีที่รวดเร็วสำหรับการผลิตซีสเทอีนโปรติเอสและไคติเนสบริสุทธิ์จากยางมะละกอ

ผู้เขียน นายสาโรจน์ นิดย์แสวง

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. หทัยชนก เนียมทรัพย์	ประธานกรรมการ
ดร. บัณฑิต ลีละศาสตร์	กรรมการ
ดร. ไพโรจน์ กิจจนะพานิช	กรรมการ

บทคัดย่อ

น้ำยางมะละกอสายพันธุ์ไทยมีโปรติโอไลติกแอคติวิตีและโปรตีนโดยเฉลี่ยเท่ากับ 13.9±2.7 ยูนิตต่อโปรตีนหนึ่งมิลลิกรัม และ 41.2±13.7 มิลลิกรัมโปรตีนต่อน้ำยางมะละกอหนึ่งกรัม ตามลำดับ

การวิเคราะห์น้ำยางมะละกอด้วยคาโทดิกเจลอิเลคโทรฟอริซีส การหาเอนไซม์แอคติวิตีลำดับกรดอะมิโน และน้ำหนักโมเลกุล พบว่าในน้ำยางมะละกอประกอบด้วยโปรตีนหลัก 5 ชนิด ได้แก่ ปาเปน ไคติเนส (GIEKII) ไคโมปาเปน (YPQSID) ไกลซิล เอนโดเปปทิเดส (LPESVD) และคาริเดน (LPENVD) ในปริมาณ 5.29±2.62%, 21.90±5.87%, 20.09±5.30%, 40.69±11.04% และ 12.53±4.06% ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปาเปน ไคติเนส ไคโมปาเปน ไกลซิลเอนโดเปปทิเดส และคาริเคน สามารถทำบริสุทธิ์จากน้ำยางมะละกอได้ด้วยวิธีที่รวดเร็วโดยใช้เทคนิคระบบน้ำสองวัฏภาค การตกตะกอนและโครมาโทกราฟี การทำบริสุทธิ์ปาเปนโดยระบบน้ำสองวัฏภาคที่ประกอบด้วย 8% PEG6000-15% แอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่มีพีเอชเท่ากับ 5 เป็นวิธีการที่ง่ายสำหรับการแยกปาเปนจากน้ำยางมะละกอให้มีโปรตีเอสแอคติวิตีสูงและความบริสุทธิ์ที่ดีกว่าการตกตะกอนปาเปนด้วยเกลือ การทำบริสุทธิ์ไคติเนสและไกลซิลเอนโดเปปทิเดสสามารถทำได้ด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ ปริมาณ 20 และ 13% ตามลำดับ ไคโมปาเปน ไกลซิลเอนโดเปปทิเดสและคาริเคนถูกแยกออกจากกันด้วย คอลัมน์ (Mono S) แบบแลกเปลี่ยนประจุบวก นอกจากนี้ คาริเคนสามารถทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 85% การทำบริสุทธิ์ซีสเทอีน โปรติเอสและไคติเนสจากน้ำยางมะละกอ 30 กรัมสามารถเตรียม ปาเปน ไคติเนส ไคโมปาเปน ไกลซิลเอนโดเปปทิเดส และคาริเคน ได้เท่ากับ 58 100 12 241.3 และ 147 มิลลิกรัม ตามลำดับ

การหาน้ำหนักโมเลกุลของซีสเทอีนโปรติเอสและไคติเนสบริสุทธิ์ด้วยอิเลคโทรสเปรย์แมสสเปกโทรมิเตอร์ พบว่า ปาเปนและไคติเนสมีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 23466 และ 26540 ดาลตัน ตามลำดับ ไกลซิล เอนโดเปปทิเดส มี 2 รูปแบบ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 23335 และ 23365 ดาลตัน ตามลำดับ คาริเคน มี 4 รูปแบบ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่า 23212 23326 23419 และ 23612 ดาลตัน ตามลำดับ

แอคติวิตีของซีสเทอีน โปรติเอส 4 ชนิดต่อสับสเตรท 4 ชนิด พบว่า เคซีน และ Boc-Ala-Ala-Gly-pNA เป็นสับสเตรทที่ดีสำหรับ ปาเปน และไกลซิลเอนโดเปปทิเดส ตามลำดับ ในขณะที่ BAEE และ BAPNA เป็นสับสเตรทที่ดีสำหรับ ไคโมปาเปน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

TABLE OF CONTENTS

Title	page
Acknowledgement	iii
Abstract (in English)	iv
Abstract (in Thai)	vi
Table of contents	viii
List of tables	xv
List of illustrations	xvii
Abbreviations and symbols	xxiv
Chapter 1 Introduction	
1.1 Principle, theory and rational	1
1.2 Papaya latex	3
1.3 Cysteine proteases in papaya latex	4
1.3.1 Properties and characterization of cysteine proteases	7
1.3.2 Utilization of cysteine proteases	12
1.4 Purification of protein	18
1.4.1 Precipitation	18
1.4.1.1 Precipitation with salts	18
1.4.1.2 Precipitation with organic solvent	18

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Title	page
1.4.1.3 Precipitation with non-denaturing polymers	19
1.4.2 Aqueous two-phase partitioning	19
1.4.3 Separation bases on structure	26
1.4.3.1 Separation on the basis of charge	26
1.4.3.2 Purification based on hydrophobicity	28
1.4.3.3 Metal chelate chromatography	30
1.4.3.4 Covalent chromatography	32
1.4.3.5 Affinity chromatography	33
1.5 Purification of cysteine proteases from papaya latex	35
1.5.1 Papain purification	42
1.5.2 Chymopapain purification	45
1.5.3 Glycyl endopeptidase purification	47
1.5.4 Caricain purification	48
1.6 Objective of the study	49
Chapter 2 Materials and Methods	
2.1 Materials	50
2.1.1 Chemicals	50
2.1.2 Materials	53
2.1.3 Instruments	53
2.1.4 Source of papaya latex	54

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Title	page
2.2 Methods	54
2.2.1 Latex collection	54
2.2.2 Determination of cysteine proteases in papaya latex	54
2.2.2.1 Proteolytic activity	54
2.2.2.2 Protein determination	55
2.2.2.3 Cathodic polyacrylamide gel electrophoresis	56
2.2.2.4 *In situ* proteolytic activity examination	58
2.2.3 Purification of papain by a two-step salt precipitation	58
2.2.4 Purification of papain by an aqueous two-phase extraction	59
2.2.4.1 Effect of pH	60
2.2.4.2 Effect of protein concentration	60
2.2.4.3 Effect of polyethylene glycol concentration	60
2.2.4.4 Effect of ammonium sulfate	61
2.2.4.5 Optimum purification method	61
2.2.4.6 Removing of PEG from top phase	61
2.2.4.7 Determination of PEG	62
2.2.5 Purification of cysteine proteases and chitinase from papaya latex	62
2.2.6 Purification of chitinase from papaya latex	63
2.2.6.1 Assay of chitinolytic activity	64
2.2.6.2 Assay of lysozyme activity	65
2.2.7 Purification of glycyl endopeptidase from papaya latex	66

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Title **page**

2.2.8 Purification of caricain from papaya latex 66

2.2.9 Purification of glycyl endopeptidase, chymopapain and caricain from papaya latex 67

2.2.9 Analysis and determination of purified cysteine proteases and chitinase 69

2.2.10.1 N-terminal amino acid sequence of purified cysteine proteases and chitinase 69

2.2.10.2 Molecular weight determination of cysteine proteases and chitinase by ESI-MS 69

2.2.10.3 Analysis of purified papain by fast protein liquid chromatography 69

2.2.10.4 Amidase activity assay of cysteine proteinases using BAPNA 70

2.2.10.5 Amidase activity assay of cysteine proteases using Boc-Ala-Ala-Gly-pNA 71

2.2.10.6 Esterase activity assay of cysteine proteinases using BAEE 72

2.2.10.7 Kinetic parameters on hydrolysis of Boc-Ala-Ala-Gly-pNA 72

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Title	page
Chapter 3 Results	
3.1 Composition of cysteine proteinases in papaya latex	74
3.1.1 Protein and Proteolytic activity	75
3.1.2 Composition of cysteine proteinases and chitinase in papaya latex	76
3.2 Purification of papain by a two-step salt precipitation	79
3.3 Purification of papain by an aqueous two-phase extraction	85
3.3.1 Effect of protein concentration	85
3.3.2 Effect of pH	87
3.3.3 Effect of polyethylene glycol	89
3.3.4 Effect of ammonium sulfate	90
3.3.5 Separation of papain by suitable aqueous two-phase extraction	92
3.4 Purification of chitinase from papaya latex	93
3.4.1 Effect of pH and temperature on chitinase using chitin substrate	95
3.4.2 Effect of pH and temperature on chitinase using *Micrococcus lysodeikticus* substrate	97
3.5 Purification of glycyl endopeptidase by precipitation	99
3.6 Purification of caricain by precipitation	101
3.7 Purification of chymopapain, glycyl endopeptidase and caricain using cation chromatography	102
3.8 Purified cysteine proteinases and chtinase	104
3.8.1 substrate specificity	104

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Title	page
3.8.2 Kinetic parameter of hydrolysis on Boc-Ala-Ala-Gly-pNA	105
3.8.3 Molecular weight determination	108
3.8.3.1 Molecular weight of papain	108
3.8.3.2 Molecular weight of chitinase	109
3.8.3.3 Molecular weight of glycyl endopeptidase	110
3.8.3.4 Molecular weight of caricain	111
3.8.4 N-terminal analysis of amino acid sequence	112
Chapter 4 Discussion and Conclusions	
4.1 Papaya latex and its component	115
4.2 Papaya latex for purification of cysteine proteinases	117
4.3 Two-step salt precipitation of papain	117
4.4 Aqueous two-phase extraction for papain purification	119
4.5 Comparison of a two-step precipitation and aqueous two-phase extraction for papain purification	121
4.6 Chitinase preparation	122
4.7 Purification of glycyl endopeptidase	125
4.8 Separation of chymopapain	126
4.9 Separation of caricain	127
4.10 comparison of purified cysteine proteinases on various substrate	128
4.11 Conclusions	129

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Title	page
References	132
Appendix	149
Vitae	153

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

LIST OF TABLES

Table	Page
1.1 Characteristics and properties of cysteine protease from papaya latex.	9
1.2 Covalent and affinity supports used in the context of the purification of the papaya proteases titrating 1 mol of essential thiol group per mol.	41
3.1 The relative content of cysteine proteases and chitinase in papaya latex from ten samples.	78
3.2 Purification of papain from papaya latex by a two–step precipitation at various protein concentrations.	82
3.3 Relative content of precipitated papains obtained from the two–step precipitation of crude papaya latex at various protein concentrations.	83
3.4 The effect of protein concentration on papain purification by extraction with 12% PEG-15% $(NH_4)_2SO_4$.	86
3.5 The effect of pH on papain separation from 40 mg/ml protein in papaya latex by an aqueous two-phase extraction, 12% PEG-15% $(NH_4)_2SO_4$.	88

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table **Page**

3.6 The effect of polyethylene glycol composition on papain separation from 40 mg/ml protein in papaya latex (pH 5) by an aqueous two-phase extraction. 89

3.7 The effect of ammonium sulfate on papain separation from papaya latex containing 40 mg/ml protein at pH 5 by an aqueous two-phase extraction. 91

3.8 Purification of chitinase from 30 g of papaya latex. 94

3.9 Proteolytic activity yield of purification of papain, chymopapain, glycyl endopeptidase and caricain from papaya latex by an aqueous two-phase extraction and salt fractionation. 100

3.10 Specific activity of purified cysteine proteases on various substrates. 105

3.11 Kinetic parameters for the hydrolysis of Boc-Ala-Ala-Gly-pNA by purified cysteine proteases from papaya latex. 108

3.12 The identification of purified proteins by N-terminal amino acid sequence. 114

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

LIST OF ILLUSTRATIONS

Figure **Page**

1.1 Amino acid sequences of papain, chymopapain, glycyl endopeptidase and caricain from *Carica papaya* latex. 6

1.2 The electrophoretic pattern of cysteine proteases from papaya latex by Sumner *et al.* [90] (A) and by Buttle [12] (B). 7

1.3 A schematic diagram of the active site of a protease, each S subsite being capable of binding with an amino acid residue P. The catalytic site of the protease is between S_1 and S_1' and the scissible bond is indicated by the arrow. 12

1.4 Phases diagram and phase composition of the dextran/PEG system. 21

1.5 Flow sheet for the preparation of enzymes from spray-dried papaya latex. 37

1.6 Ion-exchange chromatography of papaya enzymes including papain (PAP), chymopapain (CHYMO), glycyl endopeptidase (GEP) and caricain (CAR) on SP-Sepharose Fast Flow. 38

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved