

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE INHIBIDORES DE PAPAÍNA PROVENIENTES DE SEMILLAS DE AMARANTO (*Amaranthus caudatus*) Y FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*)

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PAPAINE INHIBITORS FROM AMARANTO (*Amaranthus caudatus*) AND FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) SEEDS

Tannya Elizabeth Ruiz-Tapia¹, Gonzalo Rafael Jácome-Camacho¹, Marco Vinicio Sinche-Serra¹,
Juan Patricio Castillo-Domínguez^{1*}, Francesc Xavier Avilés-Puigvert², Martha Hernández-de la Torre³

¹Escuela Politécnica Nacional, Laboratorio de Investigaciones Aplicadas, Ladrón de Guevara E11-253, P.O. Box 17-01-2759, Quito, Ecuador. (patricio.castillo@epn.edu.ec). ²Universidad Autónoma de Barcelona, Unidad de Ingeniería de Proteínas y Proteómica, 08193 Bellaterra, Barcelona, España. (FrancescXavier.Aviles@uab.cat). ³Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Victoria 631, Barrio Universitario, Casilla 160-C-Correo 3. Concepción, Chile. (marhernandez@udec.cl).

RESUMEN

Los inhibidores de proteasas vegetales con frecuencia son proteínas de baja masa molar, presentes en tejidos de almacenamiento y aéreos de las plantas. Su expresión se induce en respuesta al daño por insectos y microorganismos patógenos y el contenido de estos inhibidores puede ser alto en órganos de cereales y leguminosas. Bajo la premisa de que la combinación de técnicas de purificación de proteínas de baja y alta resolución permite incrementar la actividad específica de inhibidores de proteasas presentes en tejidos vegetales, el objetivo de este estudio fue aislar, purificar y caracterizar bioquímicamente inhibidores de papaína a partir de semillas de amaranto (*Amaranthus caudatus*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*). El diseño experimental fue completamente al azar para seleccionar las técnicas de baja resolución que incrementan significativamente ($p \leq 0.05$) el grado de purificación de los extractos tratados. En todos los estudios se hicieron tres repeticiones y las mediciones se realizaron por triplicado. A partir de harinas de semillas de amaranto y frijol se obtuvieron extractos proteicos crudos que después se ultrafiltraron en membranas de 10 kDa. Las fracciones de baja masa molar se purificaron por cromatografía de afinidad en papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL. El extracto crudo de amaranto presentó actividad inhibitoria de 1.177 ± 0.067 mU mL⁻¹ y el de frijol 1.556 ± 0.542 mU·mL⁻¹. Los extractos con purificación parcial de amaranto y frijol se purificaron por cromatografía de afinidad en papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL, hasta 137.5 y 79.1 veces, respectivamente. La

ABSTRACT

Plant protease inhibitors are often low molar mass proteins and are present in plant storage and aerial tissues. Their expression is induced in response to damage by insects and pathogenic microorganisms, and the content of these inhibitors can be high in cereal and legume organs. Under the premise that the combination of low and high resolution protein purification techniques allows increasing the specific activity of protease inhibitors present in plant tissues, the objective of this study was to isolate, purify, and biochemically characterize papain inhibitors from amaranth (*Amaranthus caudatus*) and bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. Completely randomized experimental designs were used to select low resolution techniques that significantly increase ($p \leq 0.05$) the purification degree of the treated extracts. In all studies, three replicates were made, and measurements were performed in triplicate. Crude protein extracts were obtained from amaranth and bean seed flours, which were then ultrafiltered in 10 kDa membranes. Low molar mass fractions were purified by affinity chromatography in papain-glyoxyl-sepharose 6B-CL. The crude amaranth extract presented inhibitory activity of 1.177 ± 0.067 mU mL⁻¹, and the bean extract presented an inhibitory activity of 1.556 ± 0.542 mU·mL⁻¹. The amaranth and bean extracts with partial purification were purified by affinity chromatography in papain-glioxyl-sepharose 6B-CL, up to 137.5 and 79.1 times, respectively. The estimated molar mass was 7.50 kDa for the amaranth inhibitor, and 8.20 kDa for the bean inhibitor. The amaranth inhibitor showed competitive inhibition with $0.872 \mu\text{M}$ K_i , while the bean inhibitor was non-competitive with $0.058 \mu\text{M}$ K_i . This demonstrates the presence of cysteine protease inhibitors in amaranth and bean seeds.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: julio, 2019. Aprobado: marzo, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 747-761. 2020.

masa molar estimada fue 7.50 kDa para el inhibidor de amaranto y 8.20 kDa para el de frijol. El inhibidor de amaranto mostró inhibición competitiva con K_i de $0.872 \mu\text{M}$, mientras que la del frijol fue no competitiva y con K_i de $0.058 \mu\text{M}$. Esto evidencia la presencia de inhibidores de cisteína proteasas en las semillas de amaranto y frijol.

Palabras clave: *Amaranthus caudatus*, *Phaseolus vulgaris*, cromatografía de afinidad, inhibidores proteicos, cisteína proteasas, papaína.

INTRODUCCIÓN

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos en una secuencia dada de aminoácidos. Según el grupo catalítico del sitio activo y su mecanismo de catálisis, se clasifican en cinco grupos: serino, cisteína, metalo, aspartato y glutamato proteasas (Lecaille *et al.*, 2012; Siklos *et al.*, 2015). Las serino y cisteína proteasas se han estudiado desde hace varias décadas porque participan en procesos de propagación de enfermedades y sus inhibidores se reconocen como alternativas terapéuticas para el tratamiento del cáncer, malaria, hepatitis, herpes, infecciones parasitarias, y Alzheimer (Rosenberg *et al.*, 2014; Lencastre *et al.*, 2015; Del Moral *et al.*, 2015; Hellinger and Gruber, 2019).

Los inhibidores de proteasas (IPs) de naturaleza proteínica tienen masas molares bajas y regulan la actividad de las enzimas proteolíticas. Los IPs pueden formar complejos estables con proteasas blanco de procesos patogénicos, para bloquear, alterar o evitar el acceso al centro activo de la enzima. Estas biomoléculas tienen distribución amplia en la naturaleza, en especial en leguminosas, cereales, tubérculos y algunas frutas (Laskowski *et al.*, 2003; Molesini *et al.*, 2017).

Las semillas de ciertos cereales y leguminosas tienen un alto contenido proteínico que se acumula en la fase de desarrollo de la semilla (Cruz *et al.*, 2013) e incluye enzimas, lectinas e inhibidores de proteasas (Wong *et al.*, 2010). A partir de tejidos de papa (*Solanum tuberosum*), aguacate (*Persea americana*), zanahoria (*Daucus carota*), trigo (*Triticum spp*), maíz (*Zea mays*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), otros cereales y leguminosas, se han aislado y caracterizado inhibidores de cisteína proteasas de tipo cistatinas (Liang *et al.*, 1991; Oliveira *et al.*, 2003; Gruber *et al.*, 2007; Kaur and Sohal, 2016; Szewinska *et al.*, 2016).

Key words: *Amaranthus caudatus*, *Phaseolus vulgaris*, affinity chromatography, protein inhibitors, cysteine proteases, papain.

INTRODUCTION

Proteases are enzymes that catalyze the hydrolysis of peptide bonds in a given amino acid sequence. According to the catalytic group of the active site, and its catalysis mechanism, they are classified into five groups: serine, cysteine, metallo, aspartate and glutamate proteases (Lecaille *et al.*, 2012; Siklos *et al.*, 2015). Serine and cysteine proteases were studied for several decades because they participate in disease propagation processes, and their inhibitors are recognized as therapeutic alternatives for the treatment of cancer, malaria, hepatitis, herpes, parasitic infections, and Alzheimer's disease (Rosenberg *et al.*, 2014; Lencastre *et al.*, 2015; Del Moral *et al.*, 2015; Hellinger and Gruber, 2019). Protease inhibitors (IPs) of proteinic nature have low molar masses and regulate the activity of proteolytic enzymes. IPs can form stable complexes with proteases that are targets of pathogenic processes, to block, alter or prevent access to the enzyme's active center. These biomolecules are widely distributed in nature, especially in legumes, cereals, tubers, and some fruits (Laskowski *et al.*, 2003; Molesini *et al.*, 2017).

The seeds of certain cereals and legumes have a high protein content that accumulates in the development phase of the seed (Cruz *et al.*, 2013), and includes enzymes, lectins, and protease inhibitors (Wong *et al.*, 2010). Cystatin-type cysteine protease inhibitors were isolated and characterized from tissues of potato (*Solanum tuberosum*), avocado (*Persea americana*), carrot (*Daucus carota*), wheat (*Triticum spp*), corn (*Zea mays*), sugarcane (*Saccharum officinarum*), other cereals, and legumes (Liang *et al.*, 1991; Oliveira *et al.*, 2003; Gruber *et al.*, 2007; Kaur and Sohal, 2016; Szewinska *et al.*, 2016).

Plant protease inhibitors have a major role in endogenous defense systems; they regulate the balance of proteolytic activity and participate in exogenous defense. Also, their expression is induced in response to damage, caused by insects and pathogenic microorganisms (Haq *et al.*, 2004). The applications of IPs for food and therapeutic purposes are very varied and are studied for their bioinsecticide activity. *In vitro* studies indicate that these genes could be used in the control of devastating pests of crops

Los inhibidores de proteasas de plantas tienen una función primordial en los sistemas de defensa endógenos, regulan el balance de la actividad proteolítica y participan en la defensa exógena. Además, su expresión se induce en respuesta al daño causado por insectos y microorganismos patógenos (Haq *et al.*, 2004). Las aplicaciones de los IPs con fines alimenticios y terapéuticos son muy variadas y se estudian por su actividad bioinsecticida. Estudios *in vitro* indican que estos genes podrían utilizarse en el control de plagas devastadoras de cultivos de importancia agrícola (Kaur and Sohal, 2016; Samiksha *et al.*, 2019). También, su actividad reguladora inhibe hongos patógenos que causan enfermedades en cultivo de importancia económica (Eprintseva *et al.*, 2015). El amplio espectro de uso de estas moléculas en la salud, la biotecnología, la alimentación y la agricultura despertó el interés de la comunidad científica en varios países, y se propone aislar nuevos IPs de amplio espectro de uso para autoabastecer mercados locales y sustituir importaciones (Jamal *et al.*, 2013).

Los IPs deben ser potentes y selectivos en la unión a una proteasa particular para considerarse herramientas biológicas eficaces. La purificación es por el uso combinado de técnicas separativas que permitan eliminar las proteínas no deseadas presentes en los extractos acuosos mediante el aprovechamiento de sus propiedades físicas y químicas, pero sin alterar su actividad biológica. Entre los métodos de purificación, la cromatografía de afinidad aprovecha la capacidad de unión específica de los IPs a las enzimas que inhiben (Oliveira *et al.*, 2007).

En este estudio se diseñó un procedimiento integral para detectar, aislar, purificar y caracterizar bioquímicamente inhibidores de papaína a partir de extractos proteínicos de semillas de amaranto (*Amaranthus caudatus*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*), a través de un sistema que emplea cromatografía de afinidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos químicos

Para la investigación se utilizaron reactivos Sigma Aldrich (EUA): acetato de para-nitrofenilo (p-NPA), borohidruro de sodio, sepharosa 6B-CL y L-cisteína; Fluka Chemie (Suiza): papaína; BDH Laboratory (Inglaterra): 1-propanol; y Promega (EUA): sulfato de amonio.

with agricultural importance (Kaur and Sohal, 2016; Samiksha *et al.*, 2019). Moreover, their regulatory activity inhibits pathogenic fungi that cause disease in economically important crops (Eprintseva *et al.*, 2015). The wide use spectrum of these molecules in health, biotechnology, food and agriculture has raised the interest of the scientific community in several countries, and it is proposed to isolate new broad-spectrum IPs for self-supplying local markets and import substitution (Jamal *et al.*, 2013).

IPs must be powerful and selective in binding to a particular protease to be considered effective biological tools. Purification is given by the combined use of separation techniques that allow the removal of unwanted proteins, present in the aqueous extracts, by exploiting their physical and chemical properties, but without altering their biological activity. Among the purification methods, affinity chromatography takes advantage of the specific binding capacity of IPs to the enzymes they inhibit (Oliveira *et al.*, 2007).

In this study, a comprehensive procedure was designed to detect, isolate, purify and biochemically characterize papain inhibitors from protein extracts of amaranth (*Amaranthus caudatus*) and bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds, through a system using affinity chromatography.

MATERIALS AND METHODS

Chemical reagents

For this research, the following reagents were used: para-nitrophenyl acetate (p-NPA), sodium borohydride, sepharose 6B-CL, and L-cysteine from Sigma Aldrich (USA); papain from Fluka Chemie (Switzerland); 1-propanol from BDH Laboratory (England); and ammonium sulfate from Promega (USA).

Plant material

The bean and amaranth varieties evaluated were I-481-Rojo del Valle, and I Alegria, produced and certified by the National Autonomous Institute of Agricultural Research of Ecuador.

Obtaining of protein extracts

Amaranth and bean seeds (25 g) were ground to a fine flour (particle size ≤ 1 mm), and pre-degreased with 1-propanol (Promega, USA) in a 1:4 ratio (solid: liquid), according to

Material vegetal

Las variedades de frijol y amaranto evaluadas fueron I-481-Rojo del valle e I-Alegría, producidas y certificadas por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador.

Obtención de extractos proteicos

Las semillas de amaranto y frijol (25 g) se molieron hasta obtener una harina fina (tamaño de partícula ≤ 1 mm) y un desengrasado previo con 1-propanol (Promega, EUA) en una relación 1:4 (sólido: líquido), según el método desarrollado en la Planta Piloto del Instituto de Investigación Tecnológica de la Escuela Politécnica Nacional (1999). Para la preparación de extractos proteicos se utilizó el procedimiento desarrollado en el Laboratorio de Investigaciones Aplicadas de la Escuela Politécnica Nacional (2011) a partir de experiencias en la extracción de inhibidores marinos descritos por Delfin *et al.* (1994) y la fundamentación teórica correspondiente (Chávez *et al.*, 1990), con modificaciones. Las harinas se suspendieron y agitaron, por separado, con amortiguador fosfato 50 mM, pH 6 (relación 1:5), se utilizó fosfato monobásico de sodio (Sigma- Aldrich, EUA). La suspensión obtenida se centrifugó 30 min a $835 \times g$, y el sobrenadante se ultrafiltró en membranas de 50 kDa. En los extractos crudos, que correspondieron a las fracciones con masas molares menores a 50 kDa, se determinó la actividad inhibidora (AI) sobre papaína. La concentración de proteínas [P] se estimó con la medición de la absorbancia a 280 nm, en un espectrofotómetro Hitachi UV-Visible, modelo U-1900 (Japón).

Determinación de actividad inhibidora sobre papaína

La actividad enzimática de papaína se determinó con acetato frente al sustrato para-nitrofenilo (p-NPA), suministrado por Sigma-Aldrich (EUA). En una cubeta de cuarzo se mezclaron 2000 μ L de amortiguador fosfato 50 mM, pH 6, que contenía EDTA 50 mM (grado analítico, Loba Chemie, India) y L-cisteína 20 mM (Sigma-Aldrich, EUA); 200 μ L de la solución de papaína (7 mg mL⁻¹ en amortiguador fosfato 50 mM, pH 6.0), procedente de Fluka Chemie (Suiza); y 200 μ L de p-NPA (8 mg mL⁻¹). Para los estudios de inhibición se sustituyeron 600 μ L del amortiguador por extracto inhibidor, se añadieron a 200 μ L de papaína y después 200 μ L de p-NPA. En ambos casos se midió la absorbancia a 348 nm, cada 15 s durante 3 min. La AI se calculó como la diferencia entre la actividad enzimática sin inhibidor y la medida en presencia del mismo y se expresó en mU mL⁻¹ de extracto acuoso. La unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de papaína necesaria para hidrolizar 1 mmol de p-NPA en las condiciones de ensayo (Earlanger *et al.*, 1961).

the method developed in the Pilot Plant at the Instituto de Investigación Tecnológica under the Escuela Politécnica Nacional (1999). For the preparation of protein extracts, the procedure developed at Laboratorio de Investigaciones Aplicadas under the Escuela Politécnica Nacional (2011) was applied, based on experiences in the extraction of marine inhibitors described by Delfin *et al.* (1994), and the corresponding theoretical foundation (Chávez *et al.*, 1990), with modifications. Flours were suspended and stirred, separately, with phosphate buffer 50 mM, pH 6 (1:5 ratio); monobasic sodium phosphate (Sigma- Aldrich, USA) was used. The resulting suspension was centrifuged for 30 min at $835 \times g$, and the supernatant was ultrafiltered in 50 kDa membranes. In the crude extracts, which corresponded to the fractions with molar masses lower than 50 kDa, the inhibitory activity (AI) on papain was determined. The protein concentration [P] was estimated by measuring the absorbance at 280 nm, in a Hitachi UV-Visible spectrophotometer, model U-1900 (Japan).

Determination of inhibitory activity on papain

The enzymatic activity of papain was determined against para-nitrophenyl acetate (p-NPA), as substrate, supplied by Sigma-Aldrich (USA). In a quartz cuvette, 2000 μ L of 50 mM phosphate buffer, pH 6.0, containing 50 mM EDTA (analytical grade, Loba Chemie, India) and 20 mM L-cysteine (Sigma-Aldrich, USA); 200 μ L of the papain solution (7 mg mL⁻¹ in 50 mM phosphate buffer, pH 6.0), supplied by Fluka Chemie (Switzerland); and 200 μ L of p-NPA (8 mg mL⁻¹), were mixed. For the inhibition studies, 600 μ L of the buffer were replaced with inhibitor extract, added to 200 μ L of papain, and then 200 μ L of p-NPA. In both cases, absorbance was measured at 348 nm, every 15 s for 3 min. AI was calculated as the difference between the enzyme activity without inhibitor and the one measured in the presence of the inhibitor, and was expressed in mU mL⁻¹ of aqueous extract. The enzyme activity unit (U) was defined as the amount of papain needed to hydrolyze 1 mmol of p-NPA under the test conditions (Earlanger *et al.*, 1961).

With the values of protein concentration and AI, the specific inhibitory activity (AIE) was determined as the ratio of AI to the protein concentration of each sample. In all stages, the degree of purification (GP) was determined.

Partial purification of amaranth and bean protein extracts

Completely randomized designs were used to select the partial purification techniques for each type of crude extract. There were three purification processes: 1) a heat treatment at 60 °C, for 30 min, and centrifugation for 45 min at $2800 \times g$ (WIFUG centrifuge, model 2 000 E, England); 2) the extracts were ultrafiltered in AMICON (Sigma-Aldrich, USA)

Con los valores de concentración de proteínas y AI se determinó la actividad inhibidora específica (AIE), como la relación de la AI sobre la concentración de proteína de cada muestra. En todas las etapas se determinó el grado de purificación (GP).

Purificación parcial de extractos proteicos de amaranto y frijol

Para seleccionar las técnicas de purificación parcial de cada tipo de extracto crudo se utilizaron diseños completamente al azar. Los procesos de purificación fueron tres: 1) un tratamiento calórico a 60 °C, por 30 min, y centrifugación por 45 min a 2800 × *g* (centrífuga WIFUG, modelo 2 000 E, Inglaterra); 2) los extractos se ultrafiltraron en equipo de ultrafiltración AMICON (Sigma-Aldrich, EUA) y se usaron membranas de 10 kDa; 3) una precipitación (entre 30 y 60% de saturación) con sulfato de amonio (Promega, EUA), en la que el precipitado, suspendido en un mínimo volumen de tampón fosfato, se centrifugó en las condiciones antes indicadas y se desalinizó en tubos Millipore AMICON Ultra, para ultrafiltración. Las técnicas que no aumentaron (Tukey, $p \leq 0.05$) la actividad inhibidora específica con respecto a los extractos crudos, se descartaron. Los extractos semipurificados mediante las técnicas seleccionadas, aplicadas de forma consecutiva, pasaron a la etapa de purificación selectiva.

Purificación selectiva de los inhibidores de papaína por cromatografía de afinidad

La purificación se desarrolló en un sistema de cromatografía, Pharmacia, modelo LKB – FRAC 100 (Suecia). El soporte de glioxil-sepharosa 6B-CL (Sigma-Aldrich, EUA) se preparó según Guisán *et al.* (1988) y se suspendió en solución amortiguadora borato 0.1 M, pH 8.0 (ácido bórico, grado analítico, procedente de Riedel-de-Haën; Alemania). Luego se añadieron 12 mg de papaína mL⁻¹ de soporte y el sistema estuvo 2 h en agitación magnética a 4 °C. Para una reducción química de la matriz papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL, se añadieron 5 mg de borohidruro de sodio (Sigma-Aldrich, EUA) por cada mL de soporte (Cutíño *et al.*, 2014).

El soporte de papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL se empacó en una columna de vidrio y se equilibró con amortiguador fosfato 50 mM, pH 6.0. Luego, cada extracto semipurificado se aplicó a esta columna de afinidad. Una elución ácida se realizó con KCl-HCl, 1 M (cloruro de potasio, Merck, y ácido clorhídrico, 37% de pureza (J. T. Baker) ambos de grado analítico, Alemania). La velocidad de flujo fue 0.50 mL·min⁻¹ y se recolectaron fracciones de 3 mL. En cada fracción se determinó la concentración de proteínas y la AI sobre papaína. Las fracciones con mayor AI sobre papaína, de cada extracto, se agruparon en lotes por separado para su respectiva caracterización bioquímica.

ultrafiltration equipment, and 10 kDa membranes were used; 3) a precipitation (between 30 and 60% saturation) with ammonium sulfate (Promega, USA), in which the precipitate, suspended in a minimum volume of phosphate buffer, was centrifuged under the conditions indicated above and desalted in Millipore AMICON Ultra tubes for ultrafiltration. The techniques that did not increase (Tukey, $p \leq 0.05$) the specific inhibitory activity with respect to the crude extract were discarded. The semi-purified extracts by means of the selected techniques applied in a consecutive way, went to the selective purification stage.

Selective purification of papain inhibitors by affinity chromatography

The purification was developed in a Pharmacia chromatography system, model LKB - FRAC 100 (Sweden). The glyoxyl-sepharose support 6B-CL (Sigma-Aldrich, USA) was prepared according to Guisán *et al.* (1988), and was suspended in 0.1 M borate buffer solution, pH 8.0 (boric acid, analytical grade, from Riedel-de-Haën, Germany). Then, 12 mg mL⁻¹ of papain were added as support, and the system was subjected to magnetic agitation for 2 h at 4 °C. For a chemical reduction of the papain-glyoxyl-sepharose 6B-CL matrix, 5 mg of sodium borohydride (Sigma-Aldrich, USA) were added for each mL of support (Cutíño *et al.*, 2014).

The papain-glyoxyl-sepharose 6B-CL support was packed in a glass column, and equilibrated with 50 mM phosphate buffer, pH 6.0. Each semi-purified extract was then loaded to the mentioned affinity column. An acid elution was carried out with KCl-HCl, 1 M (potassium chloride from Merck and hydrochloric acid from J. T. Baker, 37% purity; both analytical grade, Germany). The flow rate was 0.50 mL·min⁻¹, and fractions of 3 mL were collected. In each fraction, the concentration of proteins and AI on papain were determined. The fractions with higher AI on papain, from each extract, were grouped in separate pools for their respective biochemical characterization.

Analysis of the fractions purified by SDS-PAGE

Pools B (amaranth) and E (bean) (Figures 1 and 2), which showed higher papain inhibition, were analyzed by electrophoresis (SDS-PAGE)

in polyacrylamide gels (Electrophoresis-grade acrylamide and bisacrylamide, Bio-Rad, USA) and sodium dodecyl sulfate (electrophoresis grade, Sigma-Aldrich, USA), with a 5% concentrator gel, and a 16% acrylamide resolution gel, at room temperature, and under reducing conditions with β mercaptoethanol (electrophoresis grade, Merck, Germany), in the presence of Bromophenol Brilliant Blue (electrophoresis grade, Sigma-Aldrich, USA), according to the modified Laemmli

Análisis de las fracciones purificadas por SDS-PAGE

Los lotes B (amaranto) y E (frijol) (Figuras 1 y 2), que presentaron mayor inhibición de papaína, se analizaron mediante electroforesis (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida (Acrilamida y Bisacrilamida grado electroforesis, Bio-Rad, EUA) y dodecil sulfato de sodio (grado electroforesis, Sigma-Aldrich, EUA), con un gel concentrador al 5% y un gel de resolución al 16% de acrilamida, a temperatura ambiente y en condiciones reductoras con β -mercaptoetanol (grado electroforesis, Merck, Alemania), de acuerdo con el método de Laemmli modificado (Laemmli, 1970; Schagger y Von Jagow, 1987). La tinción de los geles se realizó con Coomassie (Azul brillante de Coomassie, grado electroforesis, Merck, Alemania; y Azul brillante de bromofenol, grado electroforesis, Sigma-Aldrich, EUA). Para la electroforesis se utilizaron cámaras y fuentes provenientes de Thermo Electron Corporation, EC 250-90 (EUA).

Caracterización cinética de los inhibidores de papaína

Para determinar el tipo de inhibición de los inhibidores provenientes de amaranto y frijol se midió la actividad enzimática de papaína en presencia y ausencia de extractos inhibidores a diferentes concentraciones de sustrato (p-NPA, entre 3 y 12 mg mL⁻¹).

method (Laemmli, 1970; Schagger and Von Jagow, 1987). The gels staining was made with Coomassie solution (Coomassie Brilliant Blue, electrophoresis grade, Merck, Germany). Chambers and power supplies from Thermo Electron Corporation, EC 250-90 (USA) were used for the electrophoresis.

Kinetic characterization of papain inhibitors

To determine the inhibition type of the inhibitors coming from amaranth and bean, the enzymatic activity of papain was measured in the presence and absence of inhibiting extracts at different concentrations of substrate (p-NPA, between 3 and 12 mg mL⁻¹).

The Michaelis-Menten constant (Km), the maximum speed (Vmax), and the inhibition constant (Ki) (Nelson and Cox, 2013) were calculated.

Statistical analysis

This analysis was carried out with Statgraphics Centurion XVII.II software (StatPoint Technologies, Inc.). The t-Student test was used for the comparisons of two samples. Data from the purification techniques were analyzed with unifactorial ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$). The results of the statistical analysis are shown in the tables.

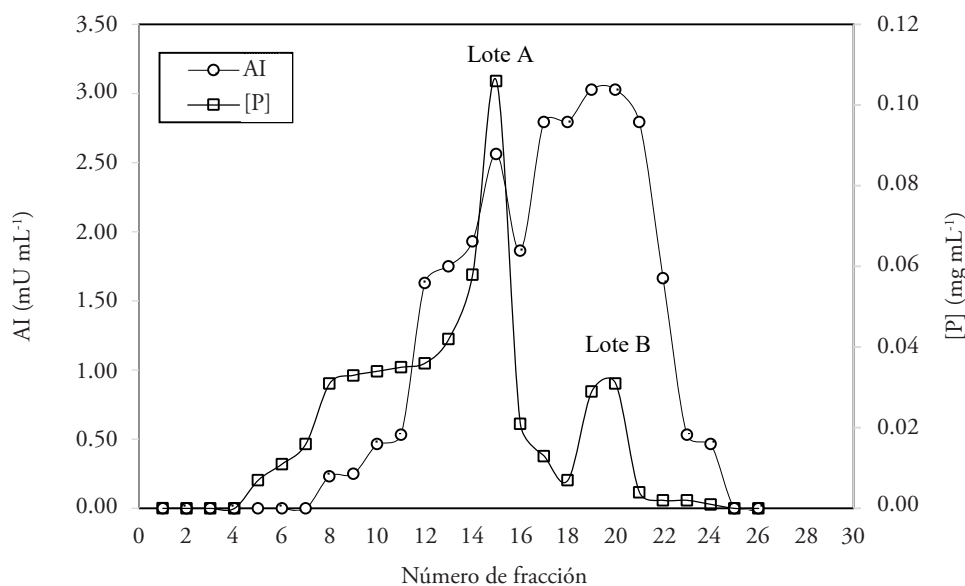


Figura 1. Perfil de elución de cromatografía en papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL para inhibidores provenientes de semillas de amaranto.

Figure 1. Chromatography elution profile in papain-glyoxyl-sepharose 6B-CL for inhibitors from amaranth seeds.

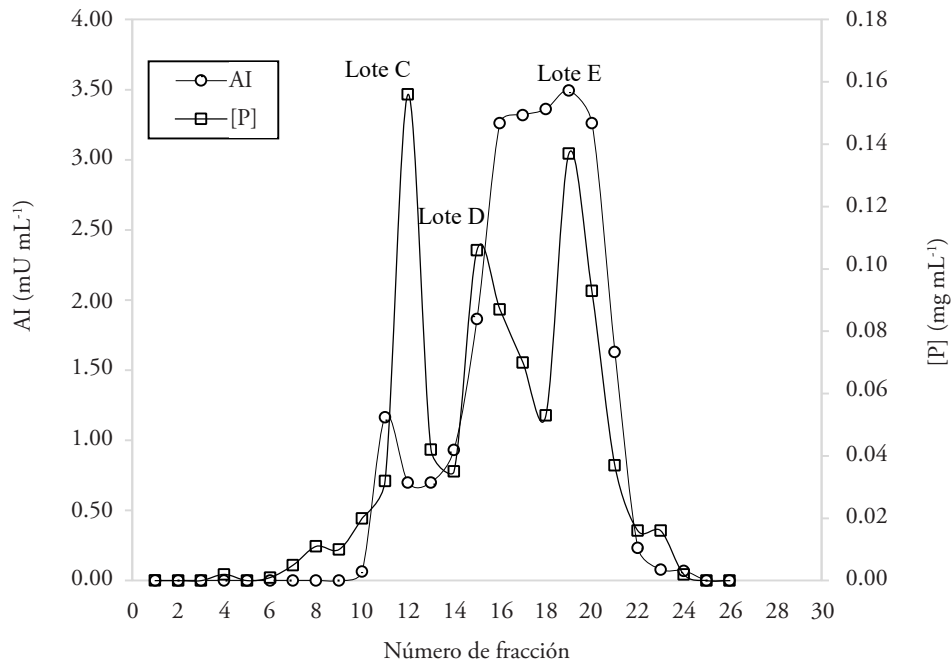


Figura 2. Perfil de elución de cromatografía en papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL para inhibidores provenientes de semillas de frijol.

Figure 2. Chromatography elution profile in papain-glyoxyl-sepharose 6B-CL for inhibitors from bean seeds.

La constante de Michaelis-Menten (K_m), la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y la constante de inhibición (K_i) (Nelson y Cox, 2013) se calcularon.

Análisis estadístico

Este análisis se efectuó con el software Statgraphics Centurion XVII.II (StatPoint Technologies, Inc.). La prueba t-Student se utilizó para las comparaciones de dos muestras. Los datos de las técnicas de purificación se analizaron con ANDEVA unifactorial y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los resultados del análisis estadístico están en los cuadros.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inhibición de papaína con los extractos crudos

El preparado obtenido a partir de frijol presentó una concentración mayor de proteínas que el de amaranto (Cuadro 1).

La actividad enzimática de papaína fue 3.961 ± 0.216 mU mL⁻¹. El extracto crudo de amaranto presentó una inhibición de 29% y el de frijol 39%. La actividad inhibitora específica del extracto crudo de

RESULTS AND DISCUSSION

Papain inhibition with crude extracts

The preparation obtained from bean had a higher concentration of proteins than the amaranth one (Table 1).

The enzymatic activity of papain was 3.961 ± 0.216 mU mL⁻¹. Crude amaranth extract showed an inhibition of 29%, and bean extract 39%. Specific inhibitory activity of crude amaranth extract was 0.297 ± 0.072 mU mg⁻¹, and 0.259 ± 0.115 mU mg⁻¹ for the bean extract.

Hellinger and Gruber (2019) reported the presence of cysteine protease inhibitors in seeds of angiosperms and gymnosperms families. Papain inhibitors were isolated from seeds of grasses, legumes, and some cereals; they also were found in other plant tissues, although in lower concentrations (Hines *et al.*, 1992; Valdés-Rodríguez *et al.*, 1993; Oliveira *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2015).

Hernández *et al.* (2014) investigated protease inhibition with protein extracts from Latin American seeds and found inhibition on papain by bean

Cuadro 1. Concentración de proteínas y actividad inhibidora de los extractos crudos de amaranto y frijol.**Table 1. Protein concentration and inhibitory activity of amaranth and bean crude extracts.**

Extracto crudo	Concentración de proteínas (mg mL ⁻¹)	Actividad inhibidora (mU mL ⁻¹)
Amaranto	4.14 ± 1.09 a	1.177 ± 0.057 a
Frijol	7.54 ± 1.47 b	1.556 ± 0.542 a

$\bar{X} \pm \sigma$ (n=3).

Medias con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (t-Student; p≤0.05).

♦ Means with different letter in columns are statistically different (t-Student; p≤0.05).

amaranto fue 0.297±0.072 mU mg⁻¹ y la del de frijol 0.259±0.115 mU mg⁻¹.

Hellinger and Gruber (2019) reportaron la presencia de inhibidores de cisteíno proteasas en semillas de familias de angiospermas y gimnospermas. Inhibidores de papaína se aislaron de semillas de gramíneas, leguminosas y algunos cereales; también se han encontrado en otros tejidos vegetales, aunque en concentraciones menores (Hines *et al.*, 1992; Valdés-Rodríguez *et al.*, 1993; Oliveira *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2015).

Hernández *et al.* (2014) investigaron la inhibición de proteasas con extractos proteicos de semillas latinoamericanas y encontraron inhibición sobre papaína por los extractos de frijol (11.8±3.5 mU mg⁻¹ proteínas) y de amaranto (9.2±1.3 mU mg⁻¹ proteínas). En esos estudios se utilizaron las mismas harinas de amaranto y frijol y la AIE detectada fue mayor; estas diferencias se justifican porque en las pruebas enzimáticas se usó otra metodología: sustrato L-piroglutamyl-L-fenilalanil-L-leucinil-p-nitroanilida y microtécnicas para la detección de nuevos IPs.

Purificación parcial de los extractos crudos

La ultrafiltración permitió separar las proteínas de altas masas molares y refinar el extracto crudo obtenido de semillas de amaranto (Cuadro 2).

La disminución del grado de purificación ocasionada por el tratamiento calórico muestra la labilidad térmica de las moléculas proteicas de interés en el extracto y la no conveniencia de su aplicación. El mayor grado de pureza se alcanzó al precipitar los extractos proteicos de amaranto con sulfato de amonio.

extracts (11.8±3.5 mU mg⁻¹ protein), and amaranth (9.2±1.3 mU mg⁻¹ protein). In those studies, the same amaranth and bean flours were used and the AIE detected was higher. These differences are justified since, in the enzymatic tests, another methodology was used: L-piroglutamyl-L-phenylalanil-L-leucinil-p-nitroanilide as substrate, and microtechniques for the detection of new IPs.

Partial purification of crude extracts

Ultrafiltration allowed to separate the proteins of high molar masses and to refine the crude extract obtained from amaranth seeds (Table 2).

The decrease in the purification degree, caused by the heat treatment, shows the thermal lability of the protein molecules of interest in the extract and the unsuitability of its application. The highest degree of purity was achieved by precipitating the amaranth protein extracts with ammonium sulfate. During this purification process, there was a global loss of 73% of proteins.

Heat treatment allowed denaturing proteins in the extracts and increasing the degree of purity in the crude extracts, obtained from bean seeds (Table 3). The most efficient partial purification stage for the bean extract was the ultrafiltration with a 10 kDa membrane, in which the highest degree of purity was reached in the permeate. Around 47% of the total amount of proteins decreased after these two processing stages. The semi-purified bean extract completely lost the AI during the differentiated precipitation with ammonium sulfate, due to the denaturalization of the proteins of interest, which

Cuadro 2. Rendimientos en la purificación parcial del extracto de amaranto.**Table 2. Performance in the partial purification of amaranth extract.**

Etapa	P (mg)	AI (mU mL ⁻¹)	AIE (mU mg ⁻¹)	GP (veces)
Extracto crudo	62.12 ± 16.45	1.177 ± 0.067	0.297 ± 0.072 c	1.00
Tratamiento calórico	48.06 ± 15.89	0.821 ± 0.149	0.247 ± 0.091 c	0.83
Permeado de 10 kDa	31.01 ± 0.49	1.297 ± 0.107	0.409 ± 0.030 b	1.38
F ₃₀₋₆₀ (NH ₄) ₂ SO ₄	16.50 ± 2.50	0.862 ± 0.087	0.767 ± 0.119 a	2.58

$\bar{X} \pm \sigma$ ($n=3$).

P: cantidad de proteína; AI: actividad inhibidora de papaína; AIE: actividad inhibidora específica de papaína; GP: grado de purificación. ♦ P: protein quantity; AI: papain inhibitory activity; AIE: papain specific inhibitory activity; GP: purification degree.

Medias con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$). ♦ Means with different letter are statistically different (Tukey; $p \leq 0.05$).

Durante este proceso de purificación hubo una pérdida global de 73% de proteínas.

En los extractos crudos obtenidos desde semillas de frijol, el tratamiento con calor permitió desnaturar proteínas en los extractos y aumentar el grado de pureza (Cuadro 3). La etapa de purificación parcial más eficiente para el extracto de frijol fue la ultrafiltración con membrana de 10 kDa, en cuyo permeado se alcanzó el mayor grado de pureza. El 47% de la cantidad total de proteínas disminuyó luego de estas dos etapas de procesamiento. El extracto semipurificado de frijol perdió por completo la AI durante la precipitación diferenciada con sulfato de amonio, por desnaturalización de las proteínas de interés, lo que determinó la exclusión de esta etapa del sistema de purificación parcial.

determined the exclusion of this stage from the partial purification system.

Although both papain inhibitors are protein-based in nature, the method of separation and purification depends on the presence of other proteins in the starting plant material. Therefore, it is important to establish efficient protocols for the purification of the IPs of interest.

Selective purification of semi-purified extracts

In the chromatogram corresponding to the selective purification of amaranth extract (Figure 1), two maxima (A and B) are observed, with protein concentration values of 0.106 and 0.031 mg mL⁻¹, respectively, which showed inhibition against papain.

Cuadro 3. Rendimientos en la purificación parcial del extracto de frijol.**Table 3. Performances in the partial purification of bean extract.**

Etapa	P (mg)	AI (mU mL ⁻¹)	AIE (mU mg ⁻¹)	GP (veces)
Extracto crudo	113.10 ± 22.05	1.556 ± 0.542	0.259 ± 0.115 b	1.00
Tratamiento calórico	97.36 ± 29.39	1.987 ± 0.398	0.357 ± 0.039 c	1.38
Permeado 10 kDa	59.84 ± 6.49	1.415 ± 0.063	0.388 ± 0.027 c	1.50
F ₃₀₋₆₀ (NH ₄) ₂ SO ₄	22.22 ± 9.68	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000 a	0.00

$\bar{X} \pm \sigma$ ($n=3$).

P: cantidad de proteína; AI: actividad inhibidora de papaína; AIE: actividad inhibidora específica de papaína; GP: grado de purificación. ♦ P: protein quantity; AI: papain inhibitory activity; AIE: papain specific inhibitory activity; GP: purification degree.

Medias con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$). ♦ Means with different letter are statistically different (Tukey; $p \leq 0.05$).

Aunque ambos inhibidores de papaína son de naturaleza proteínica, el método de separación y purificación depende de la presencia de otras proteínas en el material vegetal de partida. Por lo tanto, es importante establecer protocolos eficientes para la purificación de los IPs de interés.

Purificación selectiva de los extractos semipurificados

En el cromatograma correspondiente a la purificación selectiva del extracto de amaranto (Figura 1) se observan dos máximos (A y B), con valores de concentración de proteína de 0.106 y 0.031 mg mL⁻¹, respectivamente, que mostraron inhibición frente a papaína.

Las fracciones más activas (18 a la 22) presentaron AI de 2.80 mU mL⁻¹. La fracción con mayor actividad inhibidora específica (AIE) fue la 22 (1 398.06 mU mg⁻¹). En el lote de fracciones recolectadas de la 11 a la 16 (pico A) se obtuvo una [P] de 0.13 mg mL⁻¹, con una AI de 2.796 mU mL⁻¹ y un valor de AIE de 21.509 mU mg⁻¹ (Figura 1).

Este resultado indica que el grado de purificación por cromatografía de afinidad ascendió a 72.42 veces. El lote del pico B (fracciones de la 18 a la 22) tuvo una [P] de 0.053 mg mL⁻¹, con una inhibición de papaína de 2.165 mU mL⁻¹. Así, el lote B mostró la mayor inhibición sobre esta enzima con un grado de purificación de 137.54 veces.

El cromatograma para el extracto de frijol (Figura 2) reveló la presencia de tres máximos (C, D y E), que mostraron inhibición de papaína. En el lote del máximo de absorbancia C se recolectaron las fracciones de la 10 a la 13; en el lote del máximo D las fracciones de la 14 a la 17 y en el lote E las fracciones de la 18 a la 23.

La concentración máxima de proteínas en el primer pico fue 0.156 mg mL⁻¹; en el segundo 0.106 mg mL⁻¹ y en el tercero 0.137 mg mL⁻¹. El lote E mostró la mayor actividad inhibidora de papaína; los valores de [P], AI y AIE fueron 0.091 mg mL⁻¹, 1.864 mU mL⁻¹ y 20.484 mU mg⁻¹, respectivamente. Con la purificación selectiva se obtuvo un grado de purificación de 79.10 veces en el lote E.

Análisis de las fracciones purificadas por SDS-PAGE

El análisis electroforético (SDS-PAGE) de los lotes B (amaranto) y E (frijol), que presentaron mayor

The most active fractions (18 to 22) presented AI of 2.80 mU mL⁻¹. The fraction with the highest specific inhibitory activity (AIE) was number 22 (1398.06 mU mg⁻¹). In the pool of fractions collected from 11 to 16 (peak A), a protein concentration [P] of 0.13 mg mL⁻¹ was obtained, with an AI of 2.796 mU mL⁻¹, and an IAE value of 21.509 mU mg⁻¹ (Figure 1).

This result indicates that the degree of purification by affinity chromatography ascended to 72.42 times. The pool of peak B (fractions 18 to 22) had a [P] of 0.053 mg mL⁻¹, with a papain inhibition of 2.165 mU mL⁻¹. Thus, pool B showed the highest inhibition on this enzyme with a degree of purification of 137.54 times.

The chromatogram for the bean extract (Figure 2) revealed the presence of three maxima (C, D and E), which showed inhibition of papain. In the pool C of maximum absorbance, fractions 10 to 13 were collected; in the pool D, fractions 14 to 17, and in the pool E, fractions 18 to 23.

The maximum concentration of protein in the first peak was 0.156 mg mL⁻¹; in the second 0.106 mg mL⁻¹, and 0.137 mg mL⁻¹ in the third. Pool E showed the highest papain inhibitory activity; the values of [P], AI and AIE were 0.091 mg mL⁻¹, 1.864 mU mL⁻¹ and 20.484 mU mg⁻¹, respectively. With the selective purification, a purification degree of 79.10 times was obtained in pool E.

Fraction analysis purified by SDS-PAGE

The electrophoretic analysis (SDS-PAGE) of pools B (amaranth) and E (bean), which showed greater inhibitory activity against papain, showed a band at 7.50 kDa for pool B, and a band at 8.20 kDa for pool E, which is shown in Figure 3.

The homogeneity of these results indicates the feasibility of the process to perform the purification of papain inhibitors, present in the amaranth and bean extracts. Similar to the result found for the inhibitor molar mass from *A. caudatus* seeds, the electrophoresis studies carried out by Valdés-Rodríguez *et al.* (1993) showed the presence of an inhibitor with activity on proteases with a molar mass of 7.40 kDa, in proteinic extracts obtained from *Amaranthus hypochondriacus* seeds, and purified by HPLC.

The molar mass of cystatin isolated from common bean seeds, in the study by Santino *et al.* (1998), was

actividad inhibidora frente a papaína, mostró para el lote B una banda a 7.50 kDa; y para el lote E una banda a 8.20 kDa, lo cual se observa en la Figura 3.

La homogeneidad de estos resultados indica la factibilidad que tiene el proceso aplicado para efectuar la purificación de los inhibidores de papaína presentes en los extractos de amaranto y frijol. Similar al resultado encontrado para la masa molar del inhibidor procedente de las semillas de *A. caudatus*, los estudios de electroforesis realizados por Valdés-Rodríguez *et al.* (1993) mostraron la presencia de un inhibidor con actividad sobre proteasas con una masa molar de 7.40 kDa, en extractos proteínicos obtenidos desde semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y purificados por HPLC.

Mientras que la masa molar de la cistatina aislada al inicio desde semillas de frijol común, en el estudio de Santino *et al.* (1998) fue 37 kDa, aproximado, pero después de nuevas fases de purificación ellos detectaron otra molécula activa con una masa molar inferior a 12 kDa, lo cual sugiere la probabilidad de que la primera molécula corresponda a un trímero activo. Así, el resultado actual, obtenido luego de la ultrafiltración en membrana de 10 kDa, correspondería a la masa molecular de un monómero activo.

Caracterización cinética de los inhibidores de papaína

El comportamiento de la actividad de la papaína en ausencia y presencia del lote B, proveniente del extracto purificado de amaranto, establece que la inhibición es competitiva. La velocidad máxima ($V_{\text{máx}}$) no tuvo variaciones significativas, mientras que la constante de Michaelis-Menten (K_m) aparente aumentó en presencia del lote inhibidor B, como lo muestra la gráfica de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk (Figura 4).

Entre la papaína y el inhibidor de amaranto se encontró una alta afinidad, con una constante de inhibición (K_i) de $0.872 \mu\text{M}$ (Cuadro 4).

Al analizar la gráfica de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk para la inhibición de papaína en presencia del lote inhibidor E, proveniente del extracto purificado de frijol (Figura 5), se observa la presencia de una inhibición no competitiva.

En presencia del inhibidor de frijol, la $V_{\text{máx}}$ aparente disminuyó y el valor de la constante K_m se mantuvo constante (Cuadro 5). Este comportamiento

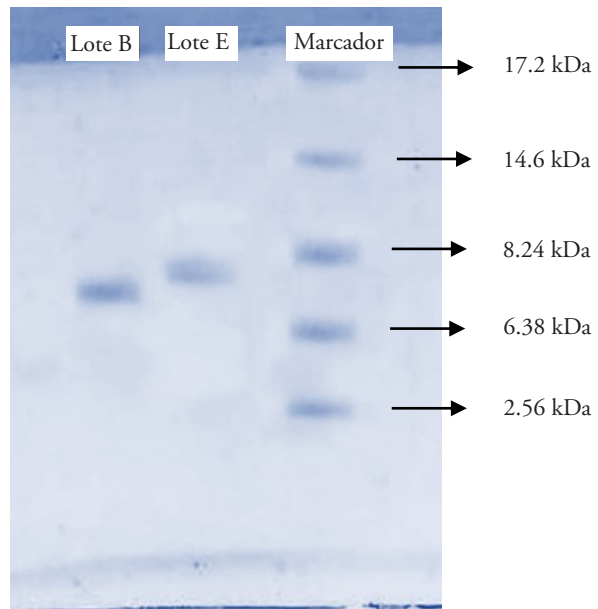


Figura 3. Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones inhibidoras. Lote B: amaranto; Lote E: frijol.
Figure 3. Analysis of the inhibitory fractions by SDS-PAGE. Pool B: amaranth; Pool E: bean.

approximately 37 kDa, but after further purification phases, they detected another active molecule with a molar mass of less than 12 kDa, which suggests the probability that the first molecule corresponds to an active trimer. Thus, the current result, obtained after ultrafiltration in 10 kDa membrane, would correspond to the molecular mass of an active monomer.

Kinetic characterization of papain inhibitors

The behavior of the papain activity in absence and presence of the pool B, coming from the purified extract of amaranth, establishes that the inhibition is competitive. The maximum speed (V_{max}) did not have significant variations, while the apparent Michaelis-Menten constant (K_m) increased in the presence of inhibitor pool B, as shown in the Lineweaver-Burk double reciprocal graph (Figure 4).

A high affinity was found between papain and amaranth inhibitor, with an inhibition constant (K_i) of $0.872 \mu\text{M}$ (Table 4).

When analyzing the Lineweaver-Burk double reciprocal graph for the inhibition of papain in the presence of inhibitor pool E, from the purified bean

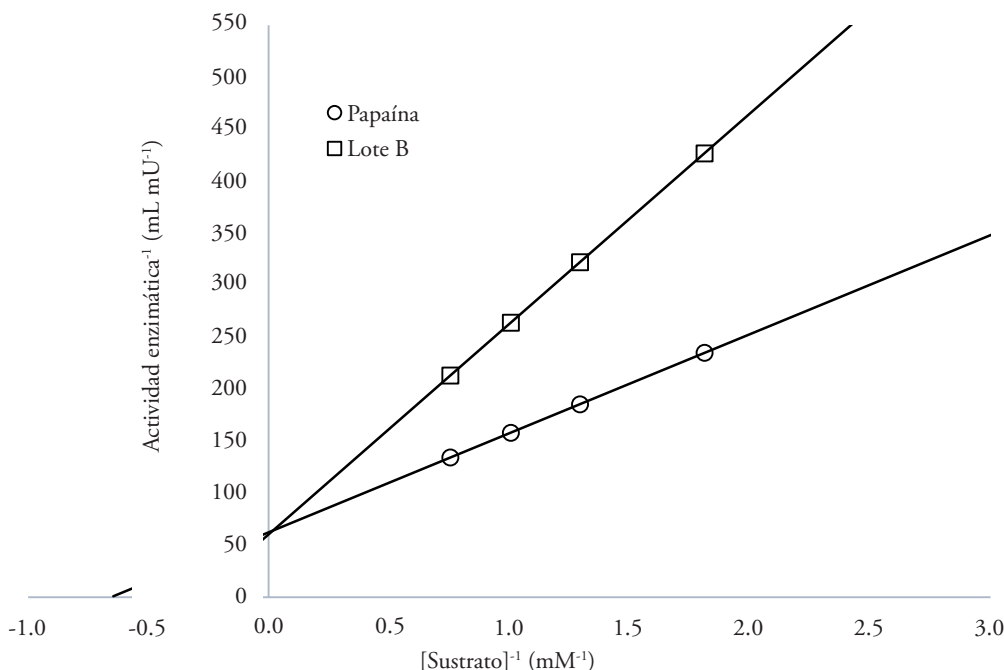


Figura 4. Gráfica de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk para la actividad de papaína sin y con el lote inhibidor B de amaranto.
Figure 4. Lineweaver-Burk double reciprocal graph for papain activity with and without the inhibitor pool B from amaranth.

revela la presencia de un inhibidor no competitivo. El valor de K_i para el inhibidor del extracto de frijol fue $0.058 \mu\text{M}$. Zhao *et al.* (1996) y Oukasha (2015) reportaron la presencia de inhibidores no competitivos de papaína en granos de soya ($K_i: 57 \times 10^{-3} \mu\text{M}$) y en cebada ($K_i: 1.95 \times 10^{-3} \mu\text{M}$); sin embargo, Barret (1987) menciona que las cistatinas que actúan sobre papaína presentan inhibiciones reversibles de tipo competitivo. Respecto a nuestro estudio se debe destacar que también se encontró inhibición reversible competitiva (amaranto) y no competitiva (frijol), y que el valor de la K_i encontrada en frijol coincide con la reportada para la soya.

CONCLUSIONES

La actividad inhibidora de la papaína en extractos proteicos de semillas de amaranto y frijol quedó demostrada. Los inhibidores se purificaron vía cromatografía de afinidad en una matriz de papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL.

El extracto purificado de amaranto contiene un inhibidor competitivo que incrementa el valor de K_m aparente y mantiene el valor de $V_{m\acute{a}x}$; mientras que el de frijol, un inhibidor no competitivo, cuya

extract (Figure 5), the presence of a non-competitive inhibition is observed.

In the presence of the bean inhibitor, the apparent $V_{m\acute{a}x}$ decreased, and the value of the constant K_m remained constant (Table 5). This behavior reveals the presence of a non-competitive inhibitor. The K_i value for the bean extract inhibitor was $0.058 \mu\text{M}$. Zhao *et al.* (1996) and Oukasha (2015) reported the presence of non-competitive papain inhibitors in soybean ($K_i: 57 \times 10^{-3} \mu\text{M}$) and barley ($K_i: 1.95 \times 10^{-3} \mu\text{M}$). However, Barret (1987) indicates

Cuadro 4. Parámetros cinéticos de la inhibición de papaína por inhibidor de amaranto.

Table 4. Kinetic parameters of papain inhibition by amaranth inhibitor.

Papaína	$V_{m\acute{a}x}$ (U mL ⁻¹)	K_m (mM)
Sin inhibidor	$1.68 \times 10^{-2} \pm 0.01 \times 10^{-2}$ a	1.43 ± 0.11 a
Con el lote B	$1.70 \times 10^{-2} \pm 0.06 \times 10^{-2}$ a	3.36 ± 0.08 b

$\bar{X} \pm \sigma$ ($n=3$).

Medias con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (T-student; $p \leq 0.05$). ♦ Means with different letter are statistically different (T-student; $p \leq 0.05$).

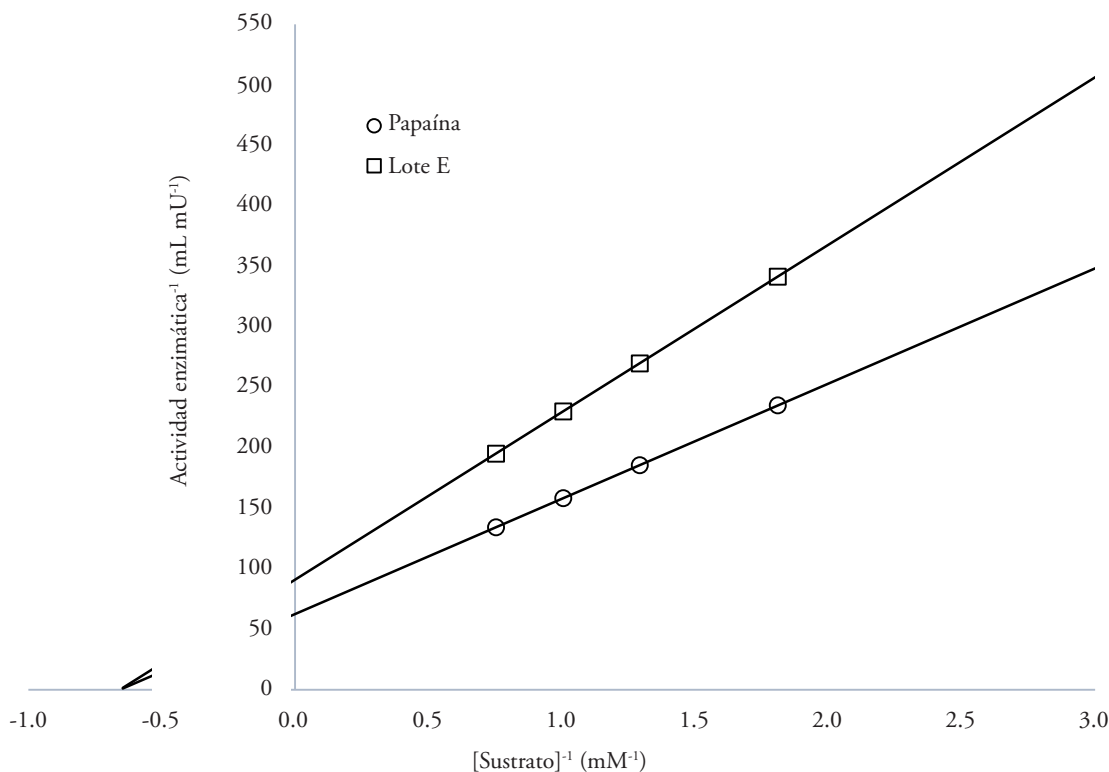


Figura 5. Gráfica de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk para la inhibición de papaína por inhibidor de frijol.
Figure 5. Lineweaver-Burk double reciprocal graph for papain activity with and without the inhibitor pool E from bean.

presencia no modifica el valor de la K_m , pero disminuye el valor de $V_{m\acute{a}x}$.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero proporcionado por la Escuela Politécnica Nacional (Quito) a través del proyecto de investigación semilla (código 15-15). Además, se extiende un agradecimiento al Ingeniero José Velásquez del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP estación Santa Catalina), por la donación de las semillas certificadas usadas en esta investigación.

LITERATURA CITADA

- Barret, A. 1987. The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. *Trends Biochem. Sci.* 12: 193 - 196.
- Cruz, C. A., F. Massena, L. Migliolo, L. Macedo, N. Monteiro, A. Oliveira, F. Macedo, A. Uchoa, M. Grossi de Sá, I. Vasconcelos, A. Murad, O. Franco, and E. Santos. 2013. Bioinsecticidal activity of a novel Kunitz trypsin inhibitor from Catanduba (*Piptadenia moniliformis*) seeds. *Plant Physiol. Biochem.* 70: 61 - 68.

that cystatins acting on papain have reversible inhibitions of competitive type. Regarding our study, it should be highlighted that reversible competitive (amaranth) and non-competitive (bean) inhibition were also found, and that the K_i value, found in bean, matches the one reported for soybean.

Cuadro 5. Parámetros cinéticos de la inhibición de papaína por inhibidor de frijol.

Table 5. Kinetic parameters of papain inhibition by bean inhibitor.

Papaína	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mL ⁻¹)	K_m (mM)
Sin inhibidor	$1.68 \times 10^{-2} \pm 0.01 \times 10^{-2}$ a	1.43 ± 0.11 a
Con el lote E	$1.16 \times 10^{-2} \pm 0.08 \times 10^{-2}$ b	1.56 ± 0.08 a

$\bar{X} \pm \sigma$ ($n=3$).

Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (T-student; $p \leq 0.05$). ♦ Means with different letter are statistically different (T-student; $p \leq 0.05$)

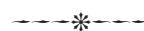
- Cutiño, B., D. Gil, C. Aragón, Y. Fernández, M. Hernández, E. Salas, M. Chávez, J. Guisán, J. Díaz, and A. Del Monte-Martínez. 2014. Computer-aided design of bromelain and papain covalent immobilization. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 16: 19 - 28.
- Chávez, M., J. Díaz, U. Pérez, y J. Delfín, 1990. *Temas de Enzimología*. Ed. ENPES. La Habana. 567 p.
- Delfín, J., Y. González, J. Díaz, and M. Chávez. 1994. Proteinase inhibitor from *Stichodactyla helianthus*: Purification, characterization and immobilization. *Arch. Medical Res.* 25: 199-204.
- Del Moral, S., L. P. Ramírez-Coutiño, y M. J. García-Gómez, 2015. Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos. *Rev. Iberoam. Cienc. ISSN 2334-2501*. www.reibci.org.
- Earlanger, B., N. Kokowski, and W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95: 271 - 278.
- Eprintseva, A.T., D.N. Fedorina, A.V. Salnikova, and A.U. Igamberdiev. 2015. Expression and properties of the glyoxysomal and cytosolic forms of isocitrate lyase in *Amaranthus caudatus* L. *J. Plant Physiol.* 181: 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2015.02.014>
- Gruber, C. W., M. Cemazar, M. A. Anderson, and D. F. Craik. 2007. Insecticidal plant cyclotides and related cysteine knot toxins. *Toxicon* 49: 561 - 575.
- Guisán, J. 1988. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 10: 375 - 382.
- Haq, S. K., S. M. Atif, and R. H. Khan. 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Arch. Biochem. Biophys.* 431: 145 - 159.
- Hellinger, R., and C. W. Gruber. 2019. Peptide-based protease inhibitors from plants. *Drug Discovery Today* 24: 1877-1889. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.05.026>
- Hernández, M., P. Castillo, F. Muñoz, L. Quinchuela, P. Echeverría, G. Jácome, G. Covalada, S. Trejo, and F. Avilés. 2014. Isolation and purification of protease inhibitors from Latin-American plants. https://www.researchgate.net/profile/Martha_De_La_Caridad_Hernandez/publication/284158077_Aislamiento_y_purificacion_de_inhibidores_de_proteasas_a_partir_de_plantas_Latinoamericanas/links/564df99508ae4988a7a59df6.pdf?origin=publication_list (Consulta: diciembre 2017).
- Hines, M., C. Osuala, and S. Nielsen. 1992. Screening for cysteine proteinase inhibitor activity in legume seeds. *J. Sci. Food Agric.* 59: 555 - 557.
- Jamal, F., P. K. Pandey, D. Singh, and M. Y. Khan, 2013. Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochem. Rev.* 12:1-34. DOI 10.1007/s11101-012-9231-y
- Kaur, A. M., and S. K. Sohal. 2016. Pea protease inhibitor inhibits protease activity and development of *Bactrocera cucurbitae*. *J. Asia-Pacific Entomol.* 19: 1183-1189. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2016.10.012>
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 - 685.

CONCLUSIONS

The papain inhibitory activity in protein extracts from amaranth and bean seeds was demonstrated. The inhibitors were purified via affinity chromatography in a papain-glyoxyl-sepharose 6B-CL matrix.

The purified amaranth extract contains a competitive inhibitor that increases the apparent Km value and maintains the Vmax value; while the bean extract, a non-competitive inhibitor, whose presence does not modify the Km value, decreases the Vmax value.

—End of the English version—



- Laskowski, M., M. Qasim, and S. Lu. 2003. Interaction of standard mechanism, canonical protein inhibitors with proteases. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 593 - 626.
- Lecaille, F., J. Kaleta, and D. Bromme. 2012. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: Their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem. Rev.* 102: 4459 - 4488.
- Lencastre, L.C., A. Faustino, A. Moreni, V. Santos-Ebinuma, P. Gava, and A. Pessoa. 2015. Stability, purification, and applications of Bromelain: A review. *Biotechnol. Prog.* Published on line in wileyonlinelibrary.com. DOI 10.1002/btpr.2190).
- Liang, G., G. Brookhart, G. Feng, G. Reeck, and K. Kramer. 1991. Inhibition of digestive proteinase of stored grain coleoptera by oryzacystatin, a cysteine proteinase inhibitor from rice 386 seed. *FEBS Letters* 278: 139 - 142.
- Molesini, B., D. Treggiari, A. Dalbeni, P. Minuz, and T. Pandolfini. 2017. Plant cysteine-knot peptides: pharmacological perspectives. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 83: 63 - 70.
- Nelson, D. L., and M. Cox. 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6th Ed. W. H. Freeman & Co., New York pp: 200 - 213.
- Oliveira, A.S., J. Xavier-Filho, and M. Sales. 2003. Cysteine proteinases and cystatins. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46: 91 - 104.
- Oliveira, A., L. Migliolo, R. Aquino, J. Ribeiro, L. Macedo, L., Andrade, M. Bemquerer, E. Santos, S. Kiyota, and M. De Sales. 2007. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its *in vitro* effects towards digestive enzymes from insect pests. *Plant Physiol. Biochem.* 45: 858 - 865.
- Oukasha Abd El-latif, A. 2015. Isolation and purification of a papain inhibitor from Egyptian genotypes of barley seeds and its *in vitro* and *in vivo* effects on the cowpea bruchid, *Callosobruchus maculatus* (F) *Pestic Biochem. Physiol.* 118: 26 - 32.

- Rosenberg, L., Y. Krieger, A. Bogdanov-Berezovski, E. Silberstein, Y. Shoham, and A. J. Singer. 2014. A novel rapid and selective enzymatic debridement agent for burn wound management: a multi-center RCT. *Burns* 40:466–474. DOI 10.1016/j.burns.2013.08.013.
- Samiksha, D. Singh, A. K. Kesavan, and S. K. Sohal. 2019. Purification of a trypsin inhibitor from *Psoralea corylifolia* seeds and its influence on developmental physiology of *Bactrocera cucurbitae*. *Int. J. Biol. Macromol.* 139: 1141-1150. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.063>
- Santino, A., A. Gallo, A. Leone, P. Poltronieri, and G. Zacheo. 1998. Purification and characterisation of a novel papain inhibitor from common vean (*Phaseolus vulgaris*) seed. *Physiol. Plant.* 104: 293 - 298.
- Schagger, H., and G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368 - 379.
- Siklos, M., M. BenAissa, and G. Thatcher. 2015. Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systemic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 5: 506 – 519.
- Silva, M., M. Brandao, J. Perdigão, R. Oliveira, M. Feliciano, and L. Da Silva. 2015. Partial purification of trypsin/papain inhibitors from *Hymenaea courbaril* L. seeds and antibacterial effect of protein fractions. *Hoehnea* 43: 11 - 18.
- Szewinska, J., J. Siminska, and W. Bielawski. 2016. The roles of cysteine proteases and phytocystatins in development and germination of cereal seeds. *J. Plant Physiol.* 207: 10 - 21.
- Valdés-Rodríguez, S., M. Segura-Nieto, A. Chagolla-Lopez, A. Vargas-Cortina, N. Martinez-Gallardo, and A. Blanco-Labra. 1993. Purification, characterization, and complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seeds. *Plant Physiol.* 103: 1407 - 1412.
- Wong, J., T. Ng, R. Cheung, X. Ye, H. Wang, S. Lam, P. Lin, Y. Chan, E. Fang, P. Ngai, L. Xia, X. Ye, Y. Jiang, and F. Liu. 2010. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87: 1221 - 1235.
- Zhao, Y., M. Botella, L. Subramanian, X. Niu, S. Nielsen, R. Bressan and P. Hasegawa. 1996. Two wound-inducible soybean cysteine proteinase inhibitors have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than a constitutive homolog. *Plant Physiol.* 452: 1299 – 1306.

