

34. Maria Ester ALESSANDRINI – Attività della papaina e della papaiotina.

La *papaina* è il succo lattiginoso essiccato, e più o meno depurato, estratto dalle frutta della Carica Papaya, un albero detto anche « albero del melone » per la forma dei suoi frutti, originario delle Molucche, e poi propagatosi nelle Indie, nell'America del Sud ed in tutti i Paesi tropicali. Tale succo contiene un'enzima idrolizzante proteolitico scoperto da Wurtz e Bouchut nel 1879, che può anche considerarsi una pepsina vegetale, perchè, analogamente alla pepsina, possiede la proprietà di trasformare gli albuminoidi in peptoni e composti affini.

La *papaiotina* è il fermento estratto dal succo allo stato quasi puro e perciò possiede un'attività maggiore della papaina. La purificazione può essere effettuata in modi differenti: per precipitazione con alcole, o, secondo procedimenti più moderni, mediante adsorbimento in ambiente leggermente alcalino con argilla o Al_2O_3 e successiva eluzione con solfato ammonico in ambiente leggermente acido, com'è indicato da Willstätter e Grassmann (1).

La papaina si presenta sotto forma di polvere o granelli grigio-rossastri, la papaiotina come una polvere bianca-grigiastra. Hanno entrambe odore caratteristico, sapore anche caratteristico, astringente e dolciastro. La papaina è discretamente solubile in acqua, la papaiotina molto solubile. Le soluzioni acquose, agitate, schiumeggiano, non precipitano col calore ed hanno reazione neutra o leggermente acida. L'aggiunta di alcole alle soluzioni acquose fa precipitare il fermento. L'optimum di azione dell'enzima si ha con un $\text{pH} = 5$, con una rapida diminuzione verso il lato acido. Agisce però anche in ambiente neutro o lievemente alcalino. In ambiente nè troppo acido, nè troppo alcalino l'attività dell'enzima si attenua ma non si annulla, ciò avviene invece in ambiente fortemente acido o fortemente alcalino.

L'optimum di temperatura per l'attività del fermento è molto elevato: secondo Willstätter e Grassmann (1 l. c.) è di $65-70^\circ$, secondo altri di $80-90^\circ$.

L'enzima subisce l'influenza di attivatori specifici, ed, in particolare, dell'acido cianidrico. Sembra che quando non abbia subito

il trattamento con tale acido la sua azione proteolitica si limiti alla formazione dei peptoni che non vengono quasi più ulteriormente attaccati, mentre quando è stata sottoposta a tale trattamento preventivo per più ore, la quantità degli ammini-acidi ottenuti sale ad un valore triplo. In ciò ha un comportamento analogo alla tripsina che viene attivata mediante sali di calcio o enterochinasi. I rapporti tra la specificità della tripsina e quella della papaina e l'influenza degli attivatori specifici sulle medesime sono stati studiati da Waldschmidt-Leitz e Hartenek (2). Fra i prodotti della digestione della enzima attivata sono stati riscontrati: la tirosina (in piccola quantità), il triptofano, la leucina, la glicocola, l'alanina, la prolina, l'arginina cioè gli stessi prodotti della digestione triptica. Invece i peptoni ottenuti dalla papaina e dalla papaiotina sono simili a quelli ottenuti dalla pepsina. Infatti trattando con tirosinasi sia i peptoni papainici che quelli pepsinici si ottiene una colorazione verde, mentre con quelli triptici si ha una colorazione nera: l'enzima potrebbe quindi essere considerata anche come un fermento intermedio fra la pepsina e la tripsina.

Nel campo farmaceutico la papaina e la papaiotina vengono usate, soprattutto, associate alla pepsina od in sua sostituzione. Molti prodotti portano l'indicazione dell'attività di 1:80 per la papaina e di 1:200 per la papaiotina e tale attività va riferita, generalmente, alla fibrina di sangue. In pratica però, in nessuno dei numerosi campioni da me esaminati ho riscontrato le attività sopra riportate: dette indicazioni debbono pertanto essere accolte con molta riserva. Infatti in numerosi preparati moderni l'indicazione dell'attività è stata abolita. Si deve anche tener presente che, il substrato fibrina di sangue da usarsi per il controllo, spesso, non risponde molto bene allo scopo.

Per fissare i requisiti a cui devono corrispondere dei buoni preparati, sia di papaina che di papaiotina, ho provato ad applicare differenti metodi per la determinazione della loro attività ed ho trovato che il più consigliabile è quello indicato da P. Rona (3). In tale metodo viene usato come substrato la gelatina, $\text{pH} = 5$, la temperatura di 40° e si fa preventivamente subire al fermento un trattamento con acido cianidrico. In tali condizioni l'idrolisi viene spinta fino alla formazione degli ammino-acidi ed i gruppi $-\text{COOH}$ messi in libertà vengono titolati con potassa alcolica.

Applicando il metodo di determinazione sopra citato a nume-

rosi campioni sia di papaina che di papaiotina del commercio, ho potuto fissare i requisiti a cui devono corrispondere dei buoni prodotti. Pur trattandosi di risultati di modesta importanza scientifica, ho ritenuto, tuttavia, non privo di interesse comunicarli, perchè potranno costituire un utile orientamento per coloro che debbano usare, acquistare e controllare tali prodotti, sulle cui caratteristiche non si aveva finora alcuna indicazione esatta.

Nella parte sperimentale viene dettagliatamente descritto il metodo di determinazione seguito e vengono riportati i risultati ottenuti nell'esame di numerosi campioni di provenienza diversa, alcuni dei quali notevolmente invecchiati.

PARTE SPERIMENTALE

Per la determinazione dell'attività proteolitica della papaina e della papaiotina col metodo sopra citato, occorrono le seguenti soluzioni:

Soluzione di gelatina in polvere al 6,6% ;

Soluzione tampone. Soluzione di citrato bisodico $\frac{M}{5}$,
alla quale corrisponde un $pH = 5$.

Soluzione alcolica di timolftaleina al 0,5%

Soluzione N/20 di potassa in alcole al 90%.

Esecuzione del saggio. Si opera esattamente nel modo seguente :

a g. 0,1 di papaina o di papaiotina, si aggiungono, in un palloncino tarato da cc. 50, mg. 25 di cianuro potassico, cc. 10 di acqua, cc. 5 di soluzione tampone di citrato sodico e qualche goccia di toluolo. Si mantiene il tutto due ore in termostato a 40° per attivare il fermento. Dopo tale periodo, si aggiungono cc. 30 (pari a g. 2) della soluzione di gelatina preventivamente portata alla temperatura di 40°. Si agita bene e si mantiene a detta temperatura in termostato per 6 ore, ed, eventualmente, per 8-12 ore. Dopo tale

N ^o campione	tipo campione	durata dell'idrolisi	quantità di enzima prelev.	cc NaOH N/20 cons. (media di tre determ. eseguite)
1	Papaina	6 ore	cc 10 sol. = = g. 0,02 enzima	7,5
2	"	"	"	6,75
3	"	"	"	7,00
4	"	"	"	6,5
5	"	"	"	6,2
6	"	"	"	7,2
7	Papaina vecch.	8 ore	"	5,0
8	Papaina molto vecchia	12 "	"	3,0
9	Papaina alter. all'aspetto	12 "	"	0
10	Papaiotina	5 ore	"	11,9
11	"	"	"	12,1
12	"	"	"	11,7
13	"	"	"	12,5
14	"	"	"	14,2
15	"	"	"	11,8
16	"	"	"	16,0
17	"	"	"	12,0
18	Papaiotina vecchia	8 ore	"	7,0
19	Papaiotina molto vecchia	12 "	"	1,0
20	Papaiotina alterata all'aspetto	"	"	1,0

periodo si raffredda a temperatura ambiente e si porta a volume con acqua distillata. Si prelevano cc. 10 del liquido e si versano in un matraccio contenente circa cc. 90 di alcole a 95° scaldato preventivamente a 50° e più, si aggiungono poi cc 0,5 della soluzione alcolica di timolftaleina e si titola con potassa alcolica N/20.

Si eseguisce contemporaneamente una prova in bianco e si detraggono i cc. consumati in questa prova da quelli adoperati nella prova precedente. Il numero dei cc. di potassa consumati misurano l'attività dell'enzima.

Nella tabella seguente sono riportati i risultati ottenuti per numerosi campioni di provenienza diversa e di differente stato di conservazione.

Dall'osservazione dei risultati riportati nella tabella, si può facilmente concludere che g. 0,02 di una buona papaina (contenuti nei cc. 10 della soluzione preparata come sopra indicato) dopo 6 ore d'idrolisi nelle esatte condizioni sopra citate, devono consumare non meno di cc. 6-7 di soluzione d'idrato sodico N/20 e g. 0,02 di una buona papaiotina, nelle stesse condizioni, non meno di cc. 11-12 (dopo avere naturalmente detratti quelli consumati nella prova in bianco).

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Chimica, 10-2-1946.

RIASSUNTO

Dopo avere provato alcuni metodi per determinare l'attività della papaina e della papaiotina, si è constatato che il più consigliabile è quello che viene riportato in tutti i dettagli della sua pratica attuazione.

In base ai risultati ottenuti nell'esame di numerosi campioni del commercio, di diversa provenienza, si sono potuti fissare i requisiti a cui devono corrispondere dei buoni prodotti sia di papaina che di papaiotina.

RESUMÉ

Après avoir essayé quelques méthodes pour déterminer l'activité de la papaine et de la papayotine, on a constaté que l'une d'entre elles est à préférer, dont on rapporte tous les détails à suivre pour son application pratique.

D'après les résultats obtenus de l'examen de nombreux échantillons du commerce, de diverse provenance, on a pu fixer les conditions auxquelles doivent satisfaire des bons produits tant de papaine que de papayotine.

SUMMARY

Upon trial of several methods hitherto proposed for the determination of the activity of papaine and papayotine, one has been found to be preferable, of which full particulars are given for its practical application.

Following results obtained from the examination of a number of commercial samples of different origin, it has been possible to establish the requirements to be met by any good product either of papaine or papayotine.

ZUSAMMENFASSUNG

Nachdem einige Methoden zur Aktivitätsbestimmung des Papains und Papaiotins versucht worden sind, wurde festgestellt, dass die geeignetste jene ist, welche in allen Einzelheiten ihrer praktischen Anwendung angegeben ist.

Auf Grund der Ergebnisse, welche bei der Prüfung zahlreicher Handelsmuster verschiedener Herkunft erhalten wurden, konnten die Eigenschaften festgestellt werden, welche gute Papain und Papaiotinprodukte haben müssen.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Z. physiol. Chem. 138, 184 (1924).
- 2) Z. physiol. Chem. 138, 184 (1924).
- 3) Praktikum der physiol. Chem. 1, (Ferment-methoden), 344 (1931).
Verlag I. Springer, Berlin.