

Proteasas de Bromeliaceae. III. Condiciones Optimas de Acción, Estabilidad y Purificación de la Proteasa Aislada de Frutos de *Bromelia laciniosa* Mart.*

NORA S. PRIOLO, MARTA S. BUTTAZZONI,
NESTOR O. CAFFINI y CLAUDIA L. NATALUCCI**

Laboratorio de Botánica Aplicada, Facultad de Ciencias Exactas,
Universidad Nacional de La Plata, Calles 47 y 155, La Plata 1900, Argentina

RESUMEN. A partir de frutos maduros de *Bromelia laciniosa* Mart. se obtuvo una proteasa que manifiesta su máxima actividad caseinolítica a 60 °C y pH 6,4. El agregado de cisteína incrementa notoriamente la capacidad proteolítica y aumenta la estabilidad de la enzima a temperaturas elevadas. El pasaje de la proteasa no purificada a través de Sephadex G-75 permite separar tres fracciones, una de las cuales (peso molecular 15.000-20.000) retiene la actividad proteolítica; esta última se resuelve en al menos tres fracciones (solamente una de ellas activa) por intercambio iónico sobre DEAE-Sephacel con gradiente lineal de cloruro de sodio 0,2-0,8 M.

SUMMARY. "Proteases of Bromeliaceae. III. Optimum activity range, stability and purification of the protease isolated from fruits of *Bromelia laciniosa* Mart.". From mature fruits of *Bromelia laciniosa* Mart. was isolated a protease showing maximum caseinolytic activity at 60 °C and pH 6.4. Cystein notably increases proteolytic activity and makes the enzyme more stable at high temperatures. The non purified protease resolves in three fractions by molecular sieve chromatography (Sephadex G-75), only one of them active (molecular weight 15.000-20.000); the latter affords three new fractions by ion exchange chromatography (DEAE-Sephacel, linear salt gradient 0.2-0.8 M sodium chloride), one of wich retains proteasic capacity.

Papaína, ficina y bromelina son las fitoproteasas de mayor aplicación en los campos bromatológico y farmacológico. Con el nombre de bromelina se comercializan preparaciones enzimáticas obtenidas tanto de frutos como de tallos de *Ananas comosus* L., especie integrante

de una familia (Bromeliaceae) que aparece como muy promisoría en este sentido, en especial su género tipo, *Bromelia* Mez. A pesar del reducido número de especies que componen el género, varias de ellas ya han sido estudiadas: *B. pinguin* L.¹, *B. hemisferica* Lam., *B. karatas* L., *B.*

PALABRAS CLAVE: Bromeliaceae; *Bromelia laciniosa*; Enzimas proteolíticas; Fitoproteasas; Proteasas de frutos; Purificación enzimática.

KEY WORDS: Bromeliaceae; *Bromelia laciniosa*; Proteolytic enzymes; Plant proteases; Fruit proteases; Enzyme purification.

* Trabajo presentado al II Simposio Argentino y V Latinoamericano de Farmacobotánica, La Plata, Argentina, octubre de 1986

** Miembro de la Carrera del Investigador Científico y Tecnológico de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

palmeri Mez y *B. sylvestris* Willd. ex Sims.² En nuestro país coexisten cuatro especies: *B. hieronymi* Mez, *B. laciniosa* Mart., *B. balansæ* Mez y *B. serra* Griseb. La proteasa presente en frutos de la primera ya ha sido estudiada en este laboratorio³: en esta oportunidad se comunican los avances logrados en el conocimiento de la preparación enzimática obtenida a partir de frutos de *B. laciniosa* Mart., de la cual oportunamente se brindara una información preliminar⁴.

MATERIAL VEGETAL

Se separaron bayas maduras de las infrutescencias de *Bromelia laciniosa* Mart., recolectadas en la provincia de Misiones (Argentina) por el Ing. Agr. Basilio Sawchuk en mayo de 1986.

Una breve descripción botánica de la especie ha sido incluida en el trabajo inicial de esta serie⁴.

OBTENCION DE LA PREPARACION ENZIMATICA NO PURIFICADA

Por trituración de los frutos en presencia de acetona fría se obtiene una pre-

paración a la que denominamos "polvo acetónico" (rendimiento 6,4%). Las razones de la elección de la técnica utilizada, así como la descripción de la misma han sido consignadas en un trabajo previo⁴.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD CASEINOLITICA

1,8 g de "polvo acetónico" se trataron con 100 ml de buffer fosfatos de pH 6,4 conteniendo EDTA 5 mM durante 60 minutos a 4 °C, eliminando el material insoluble por centrifugación a 16.000 g durante 30 minutos en centrífuga refrigerada.

La actividad caseinolítica se determina usualmente preparando una mezcla de reacción constituida por 1,1 ml de solución de caseína al 1% y 0,1 ml de solución de enzima, ambas en buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,4. Se incuba a 37 °C durante 20 minutos y la reacción se detiene mediante la adición de 1,8 ml de ácido tricloroacético al 5%. Las mezclas resultantes se centrifugan directamente en los tubos de ensayo donde se practica la re-

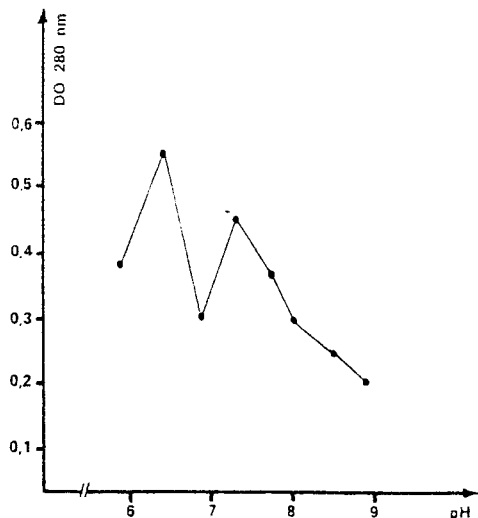


Figura 1. Variación de la actividad proteásica en función del pH. Las determinaciones fueron llevadas a cabo a 50 °C.

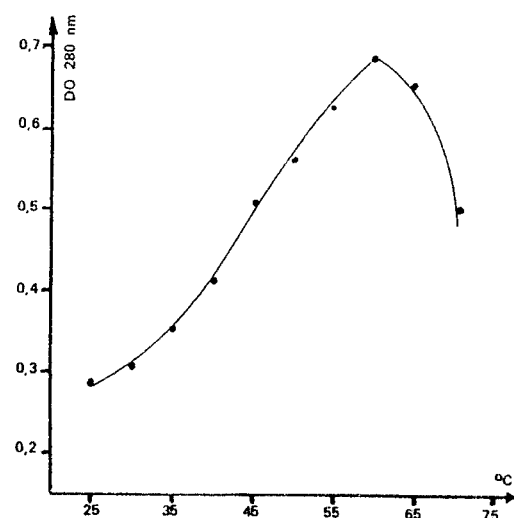


Figura 2. Variación de la actividad proteolítica en función de la temperatura. Las determinaciones fueron llevadas a cabo a pH 6,4.

acción; los productos de hidrólisis se estiman por lectura de la absorbancia a 280 nm de los sobrenadantes límpidos.

pH óptimo

Aplicando la técnica descripta y manteniendo la temperatura constante a 50 °C se fue modificando el pH entre 5,9 y 8,9, utilizando como soluciones reguladoras fosfatos monosódico y disódico 0,1 M (pH 5,9-8,9) y ácido bórico-borato de sodio 0,1 M (pH superiores a 8). Las soluciones de enzima se prepararon en buffer fosfatos de pH 6,4 y las de caseína en las respectivas soluciones reguladoras.

La variación de la actividad caseinolítica en función del pH se muestra en la Fig. 1; los valores de pH consignados corresponden a mediciones efectuadas en la misma mezcla de reacción.

Temperatura óptima

Las determinaciones se llevaron a cabo a pH 6,4 (valor óptimo) y la temperatura se modificó a intervalos de aproximadamente 5 °C, entre 25 °C y 70 °C.

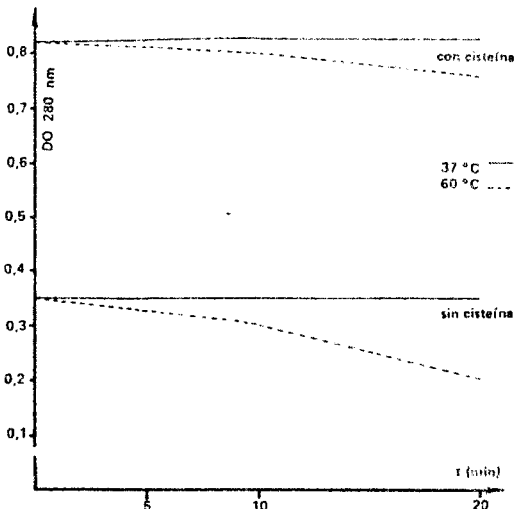


Figura 3. Estabilidad de la proteasa no purificada a 37 °C y 60 °C, con y sin agregado de activador.

El comportamiento de la enzima no purificada se muestra en la Fig. 2.

ESTABILIDAD A LA TEMPERATURA Y AL pH

Se consideró de interés conocer la estabilidad de la proteasa no purificada a la temperatura fisiológica y a su temperatura óptima, en presencia y ausencia de activador. Para ello se incubaron muestras con y sin agregado de cisteína (12,5 mM) a 37 °C y 60 °C durante 0, 5, 10 y 20 minutos y luego se determinó la actividad caseinolítica de la manera descripta. Para interrumpir el efecto de la temperatura al finalizar el tiempo previsto, los tubos conteniendo las muestras se mantuvieron en baño de hielo hasta el comienzo de la reacción. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 3.

Dado que también interesaba conocer el comportamiento de la enzima a los valores de pH en los que había demostrado máxima actividad, se repitió la experiencia a 37 °C, en presencia de cisteína, a pH 6,4 y 7,3 (Fig. 4).

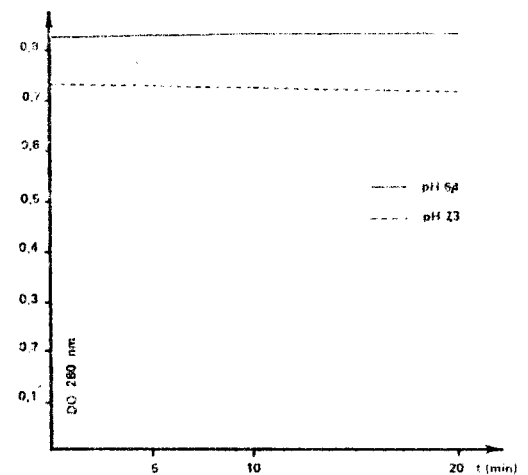


Figura 4. Estabilidad de la proteasa no purificada a pH 6,4 y 7,3 con agregado de cisteína.

PURIFICACION

Tamiz molecular

La preparación no purificada se analiza por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-75 superfino (columna Pharmacia K 15/30, volumen del gel 45 ml, eluyente buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,4, volumen de siembra 1 ml, velocidad de flujo 10 cm hora⁻¹, volumen recogido por tubo 2 ml). El diagrama que ilustra la Fig. 5 se obtiene mediante lectura directa de los eluatos a 280 nm y contiene además los correspondientes valores de actividad caseinolítica, determinados mediante aplicación de la técnica descrita, pero con el agregado de cisteína (12,5 mM).

Intercambio iónico

De las tres fracciones separadas por tamiz molecular, la fracción II (11 ml),

proteolíticamente activa, fue desalada y llevada a pH 8 por pasaje a través de Sephadex G-25 medio con tris-ácido clorhídrico 0,1 M de ese pH (volumen final 14 ml). La totalidad de la misma se aplicó a una columna (Pharmacia K 15/30) de DEAE-Sephacel (volumen del gel 45 ml). La elución se inició agregando 14 ml de buffer de partida, para luego generar un gradiente lineal de cloruro de sodio 0 -1 M disuelto en el mismo buffer. La velocidad de flujo se reguló a 10 cm hora⁻¹ y se recogieron fracciones de 2 ml.

El diagrama de la Fig. 6a se obtiene del modo indicado para la cromatografía de tamiz molecular.

A los efectos de mejorar la separación anterior, se redujo el rango del gradiente de cloruro de sodio (0,2 - 0,8 M), manteniendo las demás condiciones. La Fig. 6b da cuenta de los resultados obtenidos.

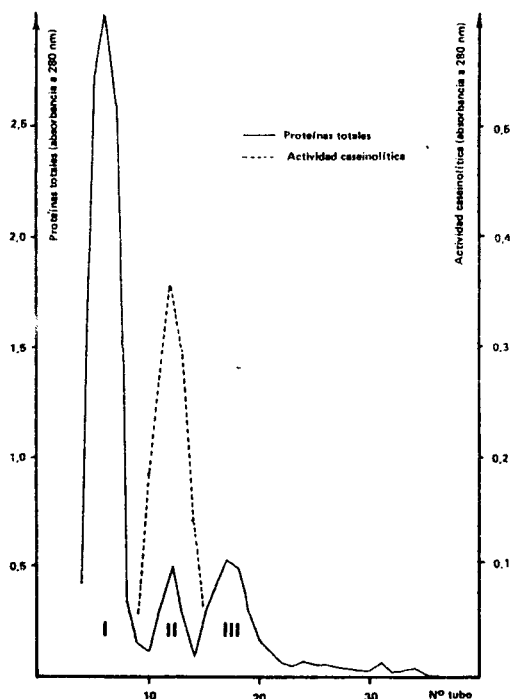


Figura 5. Fraccionamiento de la enzima no purificada a través de Sephadex G-75.

RESULTADOS Y DISCUSION

La preparación enzimática obtenida por trituración de las bayas maduras de *Bromelia laciniosa* Mart. en presencia de acetona fría, retomada con buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,4 y EDTA 5 mM, presenta máxima actividad caseinolítica a pH 6,4, con un segundo pico a pH 7,3, en tanto que el rango de temperatura óptima se encuentra entre 55 °C y 65 °C, con un máximo a 60 °C.

El agregado de un activador como cisteína incrementa notoriamente la actividad (*cfr.* Fig. 3), pero además parecería ejercer un efecto protector sobre la enzima, haciéndola más estable a la temperatura. A 37 °C la proteasa es estable luego de 20 minutos de incubación, independientemente de la presencia de cisteína, pero a 60 °C la actividad disminuye en el mismo lapso un 8% con el agregado de

cisteína y un 42% sin ella. No hay decremento de la actividad por exposición de la enzima durante 20 minutos a los valores óptimos de pH.

El esquema de purificación incluye una primera etapa en la que la preparación enzimática no purificada es fraccionada por pasaje a través de tamiz molecular y una segunda etapa en la que la fracción activa se somete a intercambio iónico, con variación de la amplitud del gradiente salino.

El pasaje por tamiz molecular (Sephadex G-75) permite la separación de tres fracciones (I, II y III, Fig. 5). La fracción de mayor peso molecular (I) es de naturaleza fenólica, en tanto que la de menor peso molecular (III) estaría constituida por oligopéptidos, ambas carentes de actividad caseinolítica. La fracción II (peso molecular 15.000-20.000) retiene

toda la capacidad proteolítica y es objeto de un segundo fraccionamiento por intercambio iónico (DEAE-Sephacel). Con la aplicación de un gradiente lineal de cloruro de sodio 0 - 1 M se consigue resolver la fracción II en dos nuevas fracciones (IIA y IIB, Fig. 6a), la segunda de las cuales retiene la actividad proteolítica. La reducción de la amplitud del gradiente (cloruro de sodio 0,2 - 0,8 M) permite distinguir que la fracción activa (IIB) está compuesta por al menos tres fracciones (Fig. 6b), con una buena separación de la proteína proteolíticamente activa.

AGRADECIMIENTOS. A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires por el apoyo otorgado a este proyecto (Expte. 2109-007/85).

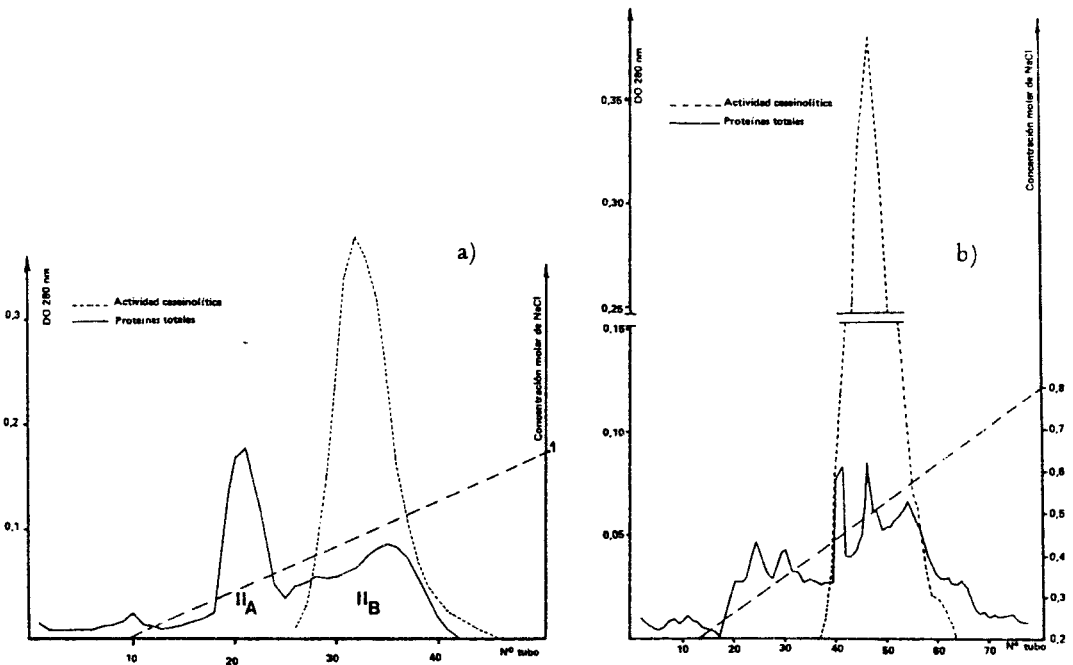


Figura 6. Purificación de la fracción proteolíticamente activa a través de DEAE-Sephacel, aplicando un gradiente lineal de cloruro de sodio 0 - 1 M (a) y 0,2 - 0,8 M (b).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Toro-Goyco, E., I. Rodríguez Costas y H. Ehrig (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 622: 151-9
2. Garduño, R., M. Soriano, E. Chavez, M.T. Cruz, L.M. del Castillo y M. Castañeda-Agulló (1974) *Rev. Lat. Quím.* 5: 243-8
3. Natalucci, C.L., N.S. Priolo, M.S. Buttazzoni y N.O. Caffini (1985) *Acta Farm. Bonaerense* 4: 93-8
4. Buttazzoni, M.S., N.O. Caffini, C.L. Natalucci y N.S. Priolo (1984) *Acta Farm. Bonaerense* 3: 33-8