

Proteasas de Bromeliaceae. II. Separación, Caracterización y Fraccionamiento de una Proteasa aislada de Frutos de *Bromelia hieronymi* Mez.*

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

Laboratorio de Botánica Aplicada, Departamento de Ciencias Biológicas,
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata
calles 47 y 115, La Plata 1900, Argentina

RESUMEN. A partir de frutos verdes de *Bromelia hieronymi* Mez se obtuvieron dos preparaciones proteolíticamente activas, que manifiestan su máximo poder caseinolítico a 60 °C y pH 6,85, observándose un segundo pico a pH 7,57. Al ser sometidas a cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sephacel) ambas preparaciones se resuelven en tres fracciones activas: la primera de ellas es la de mayor potencialidad proteolítica, pero no es retenida por el intercambiador usado, aunque sí por uno catiónico (SP-Sephadex C-50), que la descompone en dos fracciones proteicas, una de las cuales retiene la capacidad caseinolítica.

SUMMARY. "Proteases of Bromeliaceae. II. Separation, characterization and fractionation of a protease isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez". Two proteolytic preparations were obtained from immature fruits of *Bromelia hieronymi* Mez., showing maximum caseinolytic power at 60 °C and pH 6.85 (a secondary peak was detected at pH 7.57). Through anionic exchange chromatography (DEAE Sephacel) both preparations yield three active fractions: the former conserves the highest proteolytic potentiality of the preparations but is not retained by the exchanger and is resolved in two new fractions (only one of them active) by cationic exchange chromatography (SP-Sephadex C-50).

En un trabajo anterior¹ se comunicó la separación de una fracción proteolíticamente activa obtenida a partir de frutos de *Bromelia laciniosa* Mart.; en él pueden encontrarse referencias generales con respecto a las diversas aplicaciones de las fitoproteasas, así como a la difusión del género *Bromelia* y a su distribución en el país. En esta oportunidad se

han obtenido dos nuevas preparaciones enzimáticas a partir de frutos verdes de *Bromelia hieronymi* Mez.

MATERIAL VEGETAL

Está constituido por frutos verdes de *Bromelia hieronymi* Mez procedentes de Tucumán (Argentina), recolectados y remitidos por personal del Instituto Miguel

* El presente trabajo ha recibido apoyo de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (Expediente 2109-4327/84).

** Miembro de la Carrera del Investigador Científico y Tecnológico de la mencionada Comisión.

PALABRAS CLAVE: Bromeliaceae, *Bromelia hieronymi*; enzimas proteolíticas; fitoproteasas; proteasas de frutos.

KEY WORDS: Bromeliaceae, *Bromelia hieronymi*; proteolytic enzymes; plant proteases; fruit proteases

A. Lillo. La planta es estolonífera y forma matorrales, posee filodios enhiestos glaucos, de punta prolongada y a veces esclerosada, con los bordes armados de agujones oscuros y curvos. Las flores, de 4 a 6 cm de largo, están ubicadas en las axilas de pequeñas brácteas, formando grandes panojas terminales, glabras y purpúreas. Las bayas son fusiformes y fibrosas, de unos 5 centímetros de largo por 2 centímetros de diámetro².

La especie se extiende desde Paraguay, por Bolivia, hasta Argentina, en los campos con vegetación xerófila de Jujuy, Salta, Tucumán, Santiago del Estero y Chaco.

OBTENCION DE PREPARACIONES CON ACTIVIDAD PROTEOLITICA

Jugo

Se obtiene por expresión de los frutos en prensa hidráulica (400 kg/cm²), a 4 °C, recibiendo el zumo sobre una solución de buffer fosfatos 0,1 M (pH 6,4), sacarosa 0,25 M y cloruro de sodio 0,1 M, ajustando la relación final a tres volúmenes de solución por cada volumen de jugo. La mezcla se homogeiniza (Omni-mixer Sorvall) durante 5 minutos en baño de hielo y luego se centrifuga a 16.000 g por espacio de 15 minutos en centrifuga refrigerada. El sobrenadante límpido ("jugo") es proteolíticamente activo.

Polvo acetónico

Por trituración de los frutos en presencia de acetona fría se obtiene una preparación a la que denominamos "polvo acetónico". La descripción de la técnica ha sido detallada en un trabajo previo¹.

CONDICIONES OPTIMAS DE ACTIVIDAD CASEINOLITICA DE LAS PREPARACIONES NO PURIFICADAS

La actividad enzimática se determinó mediante el tradicional método de digestión de la caseína³, modificado de la si-

guiente manera, por razones operativas y de menor consumo de reactivos: a) la mezcla de reacción está constituida por 0,6 ml de solución de caseína al 1% y 0,6 ml de solución de enzima (ambas en buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,4); b) la reacción se detiene mediante la adición de 1,8 ml de ácido tricloroacético al 5% a los 20 minutos de iniciada la misma; c) las mezclas resultantes se centrifugan directamente en los tubos de ensayo donde se practican las reacciones. Los productos de hidrólisis se estiman por lectura de la absorbancia a 280 nm de los sobrenadantes límpidos. Las lecturas se corrigen mediante blancos que se realizan agregando en primer término la solución del ácido tricloroacético.

Temperatura óptima

Para este ensayo se trató polvo acetónico con buffer fosfatos de pH 6,4 durante 30 minutos a 4 °C, eliminando el material insoluble por centrifugación a 16.000 g durante 15 minutos en centrifuga refrigerada. Por su parte el jugo fue diluido convenientemente en el mismo buffer. Las determinaciones se realizaron aplicando la técnica descripta en el rango de 35 °C a 70 °C, con intervalos de aproximadamente 5 °C (Fig. 1).

pH óptimo

La temperatura se matuvo a 37 °C y el pH se modificó mediante el uso de las siguientes soluciones reguladoras: fosfatos monosódico y disódico 0,2 M (pH 6-8) y ácido bórico-borato de sodio 0,2 M (pH 8 y superiores); no se realizaron determinaciones a valores inferiores a pH 6 pues la caseína no se solubiliza en esas condiciones a excepción de valores muy bajos de pH. Las soluciones de enzima se prepararon utilizando agua destilada en lugar de buffer, en tanto que las soluciones de caseína se prepararon con buffer

de pH 6 a 9 con intervalos de aproximadamente 0,5 unidades. La variación de la actividad caseinolítica en relación con el pH del medio se muestra en la Fig. 2; los

valores de pH consignados corresponden a mediciones efectuadas en la misma mezcla de reacción.

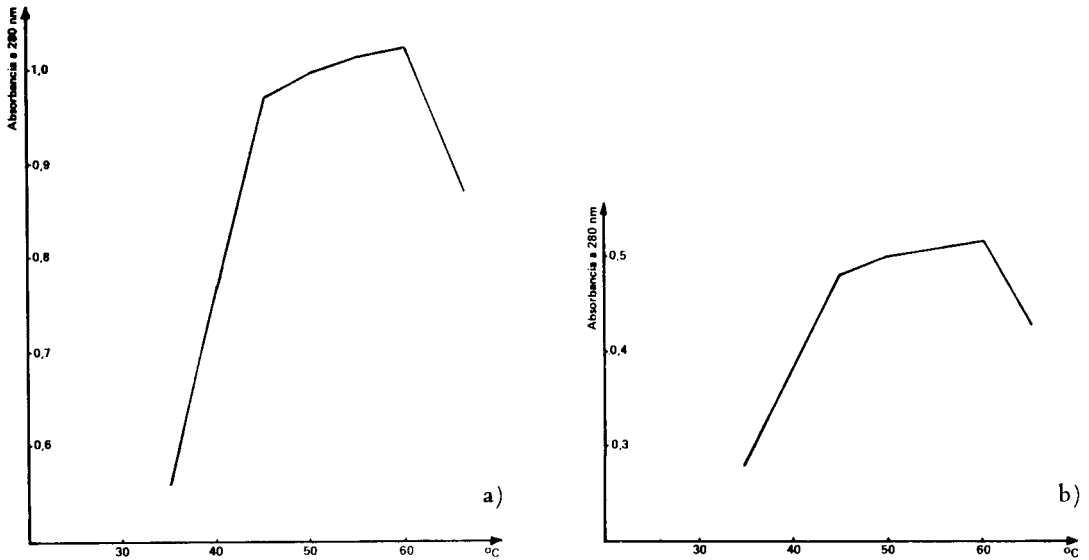


Figura 1. Temperatura óptima: a) jugo; b) polvo acetónico.

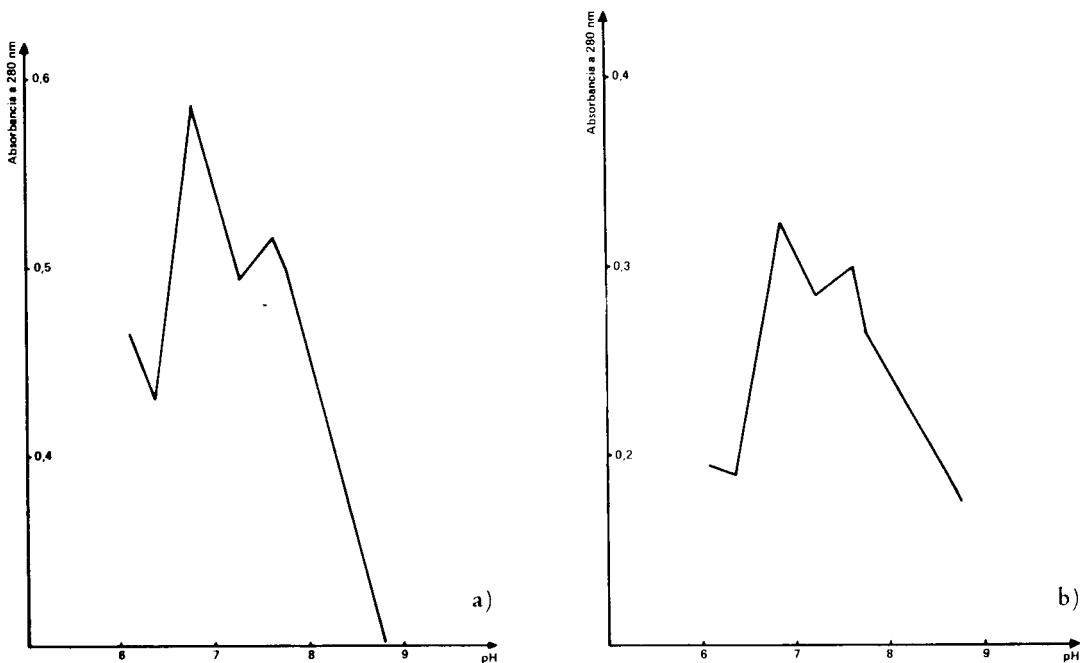


Figura 2. pH óptimo: a) jugo; b) polvo acetónico.

FRACCIONAMIENTO POR INTERCAMBIADORES IONICOS

Las preparaciones con actividad caseinolítica obtenidas según los métodos descriptos se analizaron por cromatografía de intercambio iónico. Para ello se rellenó una columna (Pharmacia K 15/30) con DEAE-Sephacel hasta una altura de 22 cm y se equilibró con una solución buffer tris-ácido clorhídrico 0,1 M (pH 8).

Las muestras a cromatografiar se preparan como se explicó en el ensayo de temperatura óptima y se llevan a pH 8 con tris 0,1 M. A los efectos de obtener resultados comparables, las soluciones de enzima se diluyen convenientemente de modo que las alícuotas sembradas correspondan en ambos casos a una misma cantidad de frutos (1,40 g).

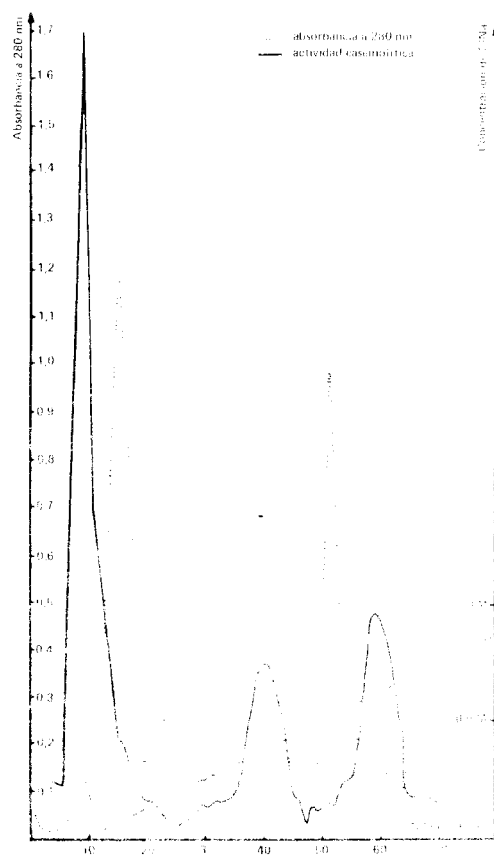


Figura 3. Fraccionamiento del jugo por DEAE-Sephacel.

Después de aplicadas las muestras se inició la elución con el agregado de 25 ml de buffer de partida y luego se generó un gradiente lineal (240 ml) de cloruro de sodio (0-1,0 M) disuelto en el mismo buffer. La velocidad de flujo se reguló en 10 gotas.cm⁻².min⁻¹ y se recogieron fracciones de 3 ml.

Los respectivos diagramas de elución (Figs. 3 y 4) se obtuvieron por lectura directa de la absorbancia a 280 nm de cada una de las fracciones: en los mismos se grafican además los valores correspondientes a la actividad caseinolítica de cada tubo.

Tanto en el caso del jugo como del polvo acetónico, los eluatos correspondientes a la fracción no retenida por DEAE-Sephacel fueron reanidos y sembrados en una columna (Pharmacia K 15/30) conteniendo 35 ml de SP Sephadex C-50 equilibrada con buffer fosfatos 0,1 M de pH 7. La elucion se inició con el agregado de 25 ml de buffer de partida, aplicándose luego un gradiente lineal (200 ml) de cloruro de sodio (0-1,0 M) disuelto en el mismo buffer. La veloci-

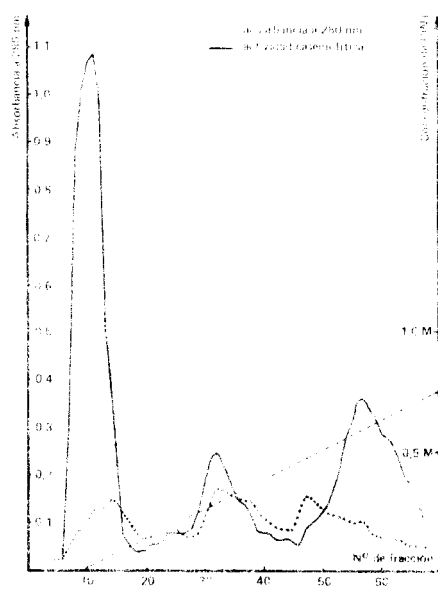


Figura 4. Fraccionamiento del polvo acetónico por DEAE-Sephacel.

dad de flujo se mantuvieron en once gotas.cm⁻².min⁻¹ y se recolectaron fracciones de 3 ml. Los diagramas de elución obtenidos se muestran en las Figs. 5 y 6. En todos los casos se trabaja a 4 °C en cámara fría.

RESULTADOS Y DISCUSION

A partir de frutos verdes de *Bromelia hieronymi* Mez se obtuvieron dos preparaciones (con y sin tratamiento con solvente orgánico) proteolíticamente activas, que presentan similares perfiles de temperatura y pH. Las condiciones de

máxima actividad caseinolítica se alcanzan a 60 °C y pH 6,85, detectándose un segundo pico a pH 7,57.

Tanto el jugo como el polvo acetónico se resuelven en tres fracciones activas por pasaje a través de DEAE-Sephacel (intercambiador aniónico). La que eluye en primer término, que no es retenida por el intercambiador, resultó ser la de mayor poder caseinolítico. Al recromatografiar la misma utilizando un intercambiador catiónico (SP-Sephadex C-50) se consigue separarla en dos componentes, de los cuales únicamente el segundo es activo; un comportamiento similar fue observado últimamente en bromelina de frutos⁴.

Si bien básicamente los dos diagramas de elución en DEAE-Sephacel son similares en cuanto a la presencia de tres componentes activos, el que corresponde al jugo sugiere que esta preparación, aunque menos purificada, es la de mayor potencialidad enzimática.

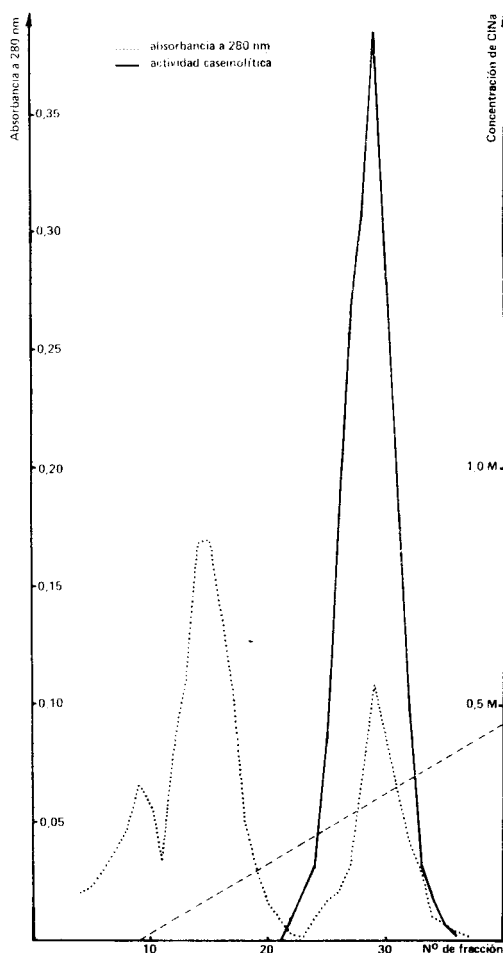


Figura 5. Jugo: fraccionamiento a través de SP-Sephadex C-50 de la fracción no retenida por DEAE-Sephacel.

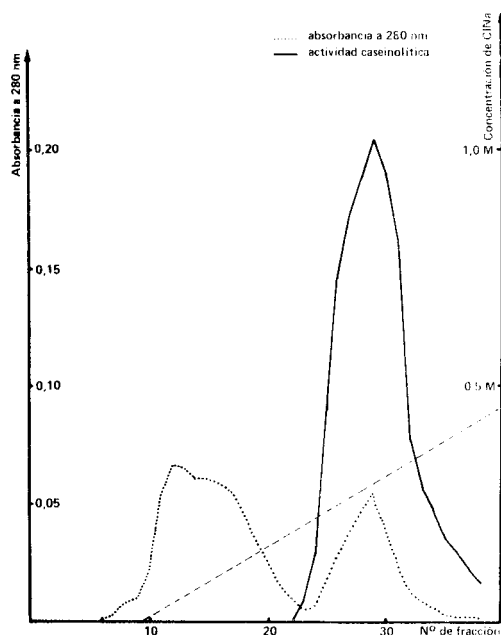


Figura 6. Polvo acetónico: fraccionamiento a través de SP-Sephadex C-50 de la fracción no retenida por DEAE-Sephacel.

AGRADECIMIENTOS. Al Sr. Pablo Raúl Legname, del Instituto Miguel A. Lillo, Tucumán, por la gentileza de haber coleccionado y remitido las muestras vegetales utilizadas en este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Buttazzoni, M.S., N.O. Caffini, C.L. Natalucci y N.S. Priolo (1984) *Acta Farm. Bonaerense* 3: 33-8
2. Castellanos, A. (1945) en Descolle, H.R. "*Genera et Species Plantarum Argentinarum*" 3: 151
3. Kunitz, M. (1947) *J. Gen. Physiol.* 30: 291-310
4. Ota, S., E. Muta, Y. Katahira y Y. Okamoto (1985) *J. Biochem.* 98: 219-28