

Proteasas de Bromeliaceae I. Estudio Preliminar de la Fracción Proteolíticamente Activa Presente en Frutos de *Bromelia laciniosa* Mart.*

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

Cátedra de Botánica, Facultad de Ciencias Exactas,
Universidad Nacional de La Plata, Calles 47 y 115, La Plata 1900, Argentina

RESUMEN. Preparaciones proteolíticamente activas obtenidas a partir de frutos maduros de *Bromelia laciniosa* Mart. fueron analizadas por cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-75, superfine). El procedimiento de triturar los frutos con acetona fría es el que permite obtener la mejor resolución y los valores más altos de actividad enzimática. La capacidad proteolítica es considerablemente menor en el caso de frutos verdes.

SUMMARY. Proteolytically active preparations obtained from mature fruits of *Bromelia laciniosa* Mart. were analyzed by molecular sieve chromatography (Sephadex G-75, Superfine). Best resolution and higher activity are achieved by direct trituration of fruits with cold acetone. Proteolytic capacity is notably diminished in case of unripe fruits.

INTRODUCCION

Al margen de sus variadas aplicaciones industriales, las fitoproteasas han encontrado una considerable aceptación en el ámbito farmacológico, donde se utilizan preferentemente como agentes antiinflamatorios y coadyuvantes de preparaciones digestivas. Una revisión reciente¹ permite acceder al conocimiento de las que han sido aisladas de plantas superiores. Si bien el número de especies estudiadas es considerablemente reducido como para poder conjeturar la existencia de grupos taxonómicos proclives a producir las en cantidad apreciable, algunas familias (Asclepiadaceae, Bromeliaceae, Cari-

caceae, Moraceae) y géneros (*Asclepias*, *Bromelia*, *Ficus*) muestran una promisoriosa tendencia en ese sentido.

Bromelia es un género americano integrado por sesenta especies, propias de zonas tropicales. De ellas, *B. pinguin* L. fue la primera en ser estudiada², seguida de otras cuatro especies mejicanas³ (*B. hemisferica* Lam., *B. karatas* L., *B. palmeri* Mez y *B. sylvestris* Willd. ex Sims.). Distribuidas en el norte de nuestro país hay otras cuatro especies⁴: *B. laciniosa* Mart., *B. hieronymi* Mez, *B. balsanae* Mez y *B. serra* Griseb.; las tres primeras han sido sometidas a estudios previos^{5,6}, orientados primordialmente a la

* El presente trabajo ha contado con el apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la Argentina (CONICET).

** Becaria de perfeccionamiento del CONICET.

PALABRAS CLAVE: *Bromelia laciniosa*, Bromeliaceae, fitoproteasas, enzimas proteolíticas
KEY WORDS: *Bromelia laciniosa*, Bromeliaceae, plant proteases, proteolytic enzymes

determinación de las condiciones óptimas de actividad proteolítica.

La presente contribución es la primera de una serie destinada tanto a perfeccionar el conocimiento de las proteasas ya estudiadas en este laboratorio como a iniciar la búsqueda de las mismas en otras especies de Bromeliáceas que crecen en Argentina.

MATERIAL VEGETAL

Está constituido por frutos verdes y maduros de *Bromelia laciniosa* Mart. procedentes de Misiones (Argentina). La planta es perenne, estolonífera, con un porte superior al medio metro. Las hojas externas pueden superar los 2 m de largo y son fuertemente armadas; las internas poseen agujones menos consistentes. La infrutescencia, que presenta abundantes exudaciones gomosas, es cilíndrico-alargada, constituida por numerosas bayas anaranjadas, triloculares y pluriseminadas.⁴

PARTE EXPERIMENTAL

Obtención de preparaciones con actividad enzimática.

Jugo. Las bayas, separadas de la infrutescencia y liberadas de sus exudaciones gomosas, se exprimen en prensa hidráulica (400 kg/cm²) a 4 °C. El jugo obtenido (pH 3,75) se mezcla con 3 volúmenes de buffer fosfatos 0,1 M (pH 6,4) conteniendo cloruro de sodio 0,1 M y sacarosa 0,25 M y se homogeneiza (Omni-mixer Sorvall) durante 5 minutos en baño de hielo. La preparación obtenida se centrifuga a 16.000 g durante 15 minutos en centrífuga refrigerada. El sobrenadante límpido que conserva la actividad enzimática se analiza inmediatamente por gel filtración.

Precipitado acetónico del jugo. El jugo obtenido por expresión se mezcla con igual volumen de buffer fosfatos 0,1

M (pH 8), se deja en reposo 30 minutos a 4 °C y luego se centrifuga durante 20 minutos en centrífuga refrigerada a 16.000 g. Al sobrenadante, colocado en baño de hielo, se le adicionan lentamente y con agitación suave 2 volúmenes de acetona fría (-10 °C) de modo que la temperatura de la mezcla no supere los 4 °C. Mediante este tratamiento se obtiene un precipitado enzimáticamente activo que se redisuelve y somete a fraccionamiento de inmediato. El sobrenadante, sin actividad proteolítica detectable, se descarta.

Liofilizado del precipitado acetónico del jugo. El precipitado obtenido según la técnica anterior se redisuelve en agua destilada y se liofiliza. La enzima cruda liofilizada se reduce a polvo fino y se conserva en recipientes herméticamente cerrados.

Polvo acetónico. Los frutos se cortan dentro de un recipiente que contiene acetona fría (-10 °C) y se liberan de sus semillas. La mezcla se tritura (Omni-mixer Sorvall) durante 5 minutos en baño de hielo; la suspensión obtenida se filtra al vacío a través de papel de filtro y se lava con acetona fría hasta la eliminación de pigmentos⁷. Luego de un rápido secado al vacío se obtiene un "polvo acetónico" que se muele finamente en mortero. Las fibras y los trozos de pericarpio que acompañan al polvo se separan por tamiz de 10 mallas/cm. El preparado logrado de esta manera, proteolíticamente activo, se conserva en recipientes herméticos.

Determinación de la actividad proteolítica.

La actividad se determina mediante el método de "digestión de caseína" de Kunitz⁸ con algunas modificaciones. Como sustrato se utiliza caseína al 1 % y como activador cisteína 0,05 M (ambas soluciones se preparan en buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,4, en el momento de ser

usadas). La mezcla de reacción, que consiste en 0,5 ml de la solución de cisteína, igual cantidad de solución de enzima y 1 ml de solución de caseína, agregados en dicho orden, se incubaba a 40 °C durante 20 minutos. La actividad enzimática se detiene mediante la adición de 3 ml de ácido tricloroacético al 5 %. 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 de ácido tricloroacético.

Fraccionamiento por tamiz molecular.

Las preparaciones enzimáticamente activas obtenidas según los métodos descriptos anteriormente se analizan por cromatografía de exclusión molecular. Para ello se emplea una columna (K 15/30, Pharmacia) rellena hasta una altura de 27 cm con Sephadex G-75 superfine, equilibrada con solución reguladora de fosfatos 0,1 M (pH 6,4).

A los efectos de obtener resultados comparables, las soluciones a cromatografiar se diluyen convenientemente, de modo que las alícuotas sembradas correspondan en todos los casos a una misma cantidad de frutos (560 mg). El volumen de siembra es de 1 ml; se eluye con buffer de partida a una velocidad de flujo de 5 gotas/cm²/min y se recogen fracciones de 3 ml.

Los respectivos diagramas de elución se obtienen mediante lectura a 280 nm de cada una de las fracciones; en los mismos se grafican además los correspondientes valores de actividad enzimática.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los diagramas de elución obtenidos al someter las diferentes muestras —provenientes de frutos maduros— a cro-

matografía de exclusión molecular (Sephadex G-75) tienen en común la presencia de tres componentes.

El primero de ellos es cuantitativamente el más importante y eluye en la zona de elevado peso molecular. Se caracteriza por ser proteolíticamente inactivo, no precipitable con ácido tricloroacético ni con sulfato de amonio a saturación y —aunque absorbe a 280 nm— posee máxima absorbancia a 330 nm, con corrimiento batocrómico de 57 nm cuando se alcaliniza el medio. En presencia de cloruro férrico da coloración verdosa. En base a las propiedades que manifiesta esta fracción puede inferirse su naturaleza fenólica.

El segundo componente es proteico, eluye en la región del diagrama correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 15.000 y exhibe elevada actividad proteolítica.

El último aparece en la zona de bajo peso molecular, posee máxima absorbancia a 280 nm y carece de actividad enzimática. Estaría constituido por péptidos y aminoácidos.

Si bien básicamente los distintos diagramas de elución son similares en cuanto a la presencia de los tres componentes ya descriptos, pueden apreciarse algunas diferencias, notorias en ciertos casos.

En el jugo la actividad enzimática es considerable (Figura 1). La elevada proporción de componentes de alto y bajo peso molecular impide una adecuada separación de la fracción de interés, por lo que se intenta la obtención de una muestra más purificada mediante precipitación acetónica del jugo. De esta manera se obtiene una mejor resolución cromatográfica (Figura 2), probablemente por la notoria disminución de componentes de bajo peso molecular y por la ligera

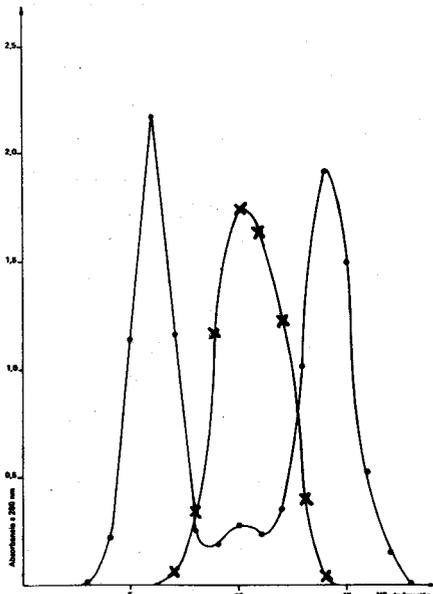


Figura 1. Fraccionamiento (Sephadex G-75, Superfine) del jugo de frutos maduros de *Bromelia laciniosa* (● absorbancia a 280 nm, ✕ actividad caseinolítica)

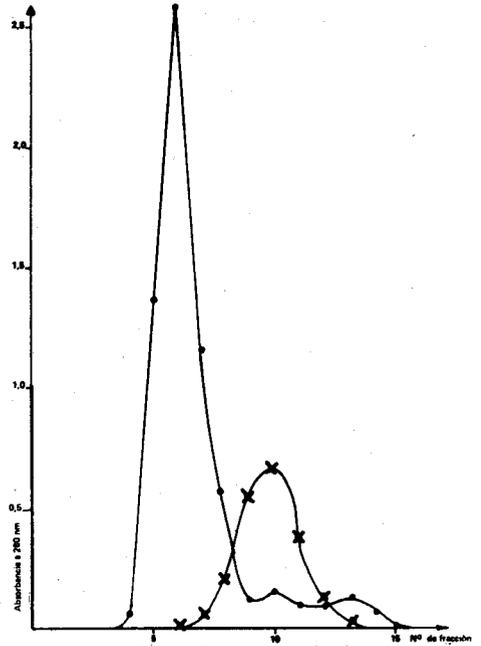


Figura 3. Fraccionamiento (Sephadex G-75, Superfine) del precipitado acetónico liofilizado del jugo de frutos maduros de *Bromelia laciniosa* (● absorbancia a 280 nm, ✕ actividad caseinolítica)

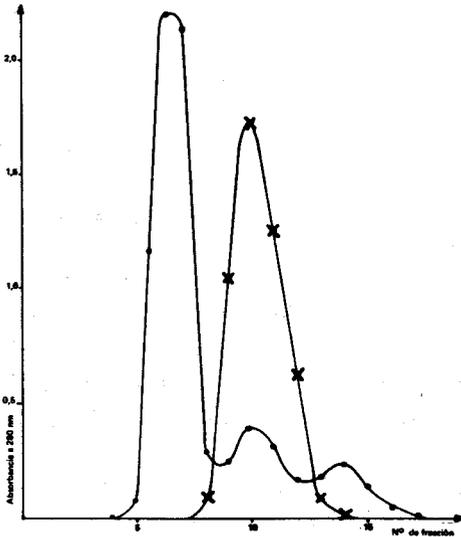


Figura 2. Fraccionamiento (Sephadex G-75, Superfine) del precipitado acetónico del jugo de frutos maduros de *Bromelia laciniosa* (● absorbancia a 280 nm, ✕ actividad caseinolítica)

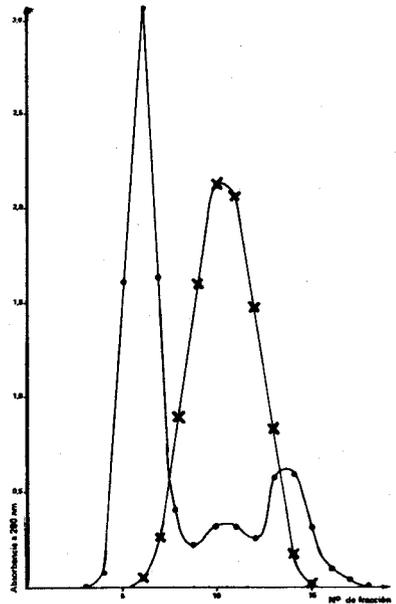


Figura 4. Fraccionamiento (Sephadex G-75, Superfine) del polvo acetónico de frutos maduros de *Bromelia laciniosa* (● absorbancia a 280 nm, ✕ actividad caseinolítica)

usadas). La mezcla de reacción, que consiste en 0,5 ml de la solución de cisteína, igual cantidad de solución de enzima y 1 ml de solución de caseína, agregados en dicho orden, se incuba a 40 °C durante 20 minutos. La actividad enzimática se detiene mediante la adición de 3 ml de ácido tricloroacético al 5 %. Los productos de hidrólisis se estiman por lectura de la absorbancia a 280 nm de los sobrenadantes lípidos. Las lecturas se corrigen mediante blancos que se realizan agregando en primer término la solución de ácido tricloroacético.

Fraccionamiento por tamiz molecular.

Las preparaciones enzimáticamente activas obtenidas según los métodos descritos anteriormente se analizan por cromatografía de exclusión molecular. Para ello se emplea una columna (K 15/30, Pharmacia) rellena hasta una altura de 27 cm con Sephadex G-75 superfine, equilibrada con solución reguladora de fosfatos 0,1 M (pH 6,4).

A los efectos de obtener resultados comparables, las soluciones a cromatografiar se diluyen convenientemente, de modo que las alícuotas sembradas correspondan en todos los casos a una misma cantidad de frutos (560 mg). El volumen de siembra es de 1 ml; se eluye con buffer de partida a una velocidad de flujo de 5 gotas/cm²/min y se recogen fracciones de 3 ml.

Los respectivos diagramas de elución se obtienen mediante lectura a 280 nm de cada una de las fracciones; en los mismos se grafican además los correspondientes valores de actividad enzimática.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los diagramas de elución obtenidos al someter las diferentes muestras —provenientes de frutos maduros— a cro-

matografía de exclusión molecular (Sephadex G-75) tienen en común la presencia de tres componentes.

El primero de ellos es cuantitativamente el más importante y eluye en la zona de elevado peso molecular. Se caracteriza por ser proteolíticamente inactivo, no precipitable con ácido tricloroacético ni con sulfato de amonio a saturación y —aunque absorbe a 280 nm— posee máxima absorbancia a 330 nm, con corrimiento batocrómico de 57 nm cuando se alcaliniza el medio. En presencia de cloruro férrico da coloración verdosa. En base a las propiedades que manifiesta esta fracción puede inferirse su naturaleza fenólica.

El segundo componente es proteico, eluye en la región del diagrama correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 15.000 y exhibe elevada actividad proteolítica.

El último aparece en la zona de bajo peso molecular, posee máxima absorbancia a 280 nm y carece de actividad enzimática. Estaría constituido por péptidos y aminoácidos.

Si bien básicamente los distintos diagramas de elución son similares en cuanto a la presencia de los tres componentes ya descritos, pueden apreciarse algunas diferencias, notorias en ciertos casos.

En el jugo la actividad enzimática es considerable (Figura 1). La elevada proporción de componentes de alto y bajo peso molecular impide una adecuada separación de la fracción de interés, por lo que se intenta la obtención de una muestra más purificada mediante precipitación acetónica del jugo. De esta manera se obtiene una mejor resolución cromatográfica (Figura 2), probablemente por la notoria disminución de componentes de bajo peso molecular y por la ligera

reducción de la fracción de naturaleza fenólica. En este caso la actividad caseinolítica de la fracción proteica es levemente menor, efecto atribuible al tratamiento acetónico. El precipitado acetónico puede conservarse liofilizado, pero el proceso reduce drásticamente la actividad enzimática de la preparación, hecho ya señalado para otras proteasas^{9,10} (Figura 3).

Teniendo en cuenta la presencia de una importante fracción de naturaleza fenólica y considerando la posibilidad de que por interacción de ésta con la proteí-

na enzimática se reduzca la actividad de esta última, se recurre al procedimiento de triturar los frutos en presencia de acetona.

Al analizar esta muestra se puede apreciar una buena separación de la fracción de interés, la que comparativamente presenta los valores de actividad enzimática más elevados; por otra parte se advierte un cierto incremento de las otras dos fracciones como consecuencia de haber utilizado los frutos en lugar del jugo (Figura 4).

A los efectos de verificar si el estado de desarrollo de los frutos utilizados es el adecuado para la obtención de la proteasa, se compara el comportamiento del polvo acetónico de los mismos con el obtenido a partir de frutos verdes.

En el diagrama de elución de esta última muestra se observa un marcado aumento del primer componente, que solapa la fracción proteica y cuya presencia sólo se manifiesta al realizar las determinaciones de actividad enzimática (Figura 5).

Los resultados muestran que los frutos verdes poseen una reducida capacidad caseinolítica, por lo que se establece que los frutos maduros son los más apropiados para la posterior extracción y purificación.

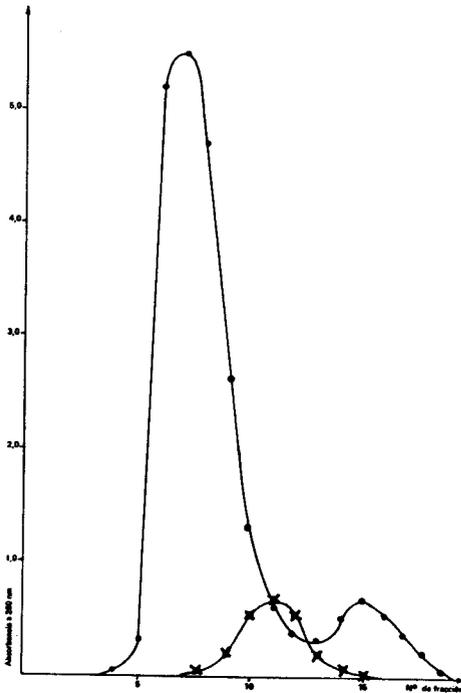


Figura 5. Fraccionamiento (Sephadex G-75, Superfine) del polvo acetónico de frutos verdes de *Bromelia laciniosa* (● absorbancia a 280 nm. ■ actividad caseinolítica)

AGRADECIMIENTO. Al Ing. Agr. Basilio Sawchuk, Presidente del Centro de Estudio de Plantas Aromáticas y Medicinales (CEPLAM), por el envío de frutos de *Bromelia laciniosa*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Buttazzoni, M.S. y N.O. Caffini (1982) *Acta Farm. Bonaerense* 1: 23-38
2. Toro-Goyco, E., A. Marezki y M.L. Matos (1968) *Archives of Biochemistry and Biophysics* 126: 91-104

3. Garduño, R., M. Soriano, E. Chávez, M.T. Cruz, L.M. del Castillo y M. Castañeda-Agulló (1974) *Rev. Latinoamericana Química* 5: 243-8
4. Castellanos, A. en Descole, H.R. (1945) "*Genera et Species Plantarum Argentinarum*" 3: 151
5. Pfirter, G.M.B. de y M.S.B. de Cozzarin (1976) *Rev. Farm. (Buenos Aires)* 118: 3-8
6. Cozzarin, M.S.B. de y G.M.B. de Pfirter (1980) *Rev. Farm. (Buenos Aires)* 123: 3-7
7. Clements, R.L. (1965) *Analytical Biochemistry* 13: 390-401
8. Kunitz, M. (1947) *J. Gen. Physiol.* 30: 291-310
9. Murachi, T., M. Yasui y Y. Yasuda (1964) *Biochemistry* 3: 48-55
10. Liener, I.E. y B. Fridenson (1970) *Meth. Enzymol.* 19: 261-73