

## Proteasas de Bromeliaceae. IV. Aislamiento de una Fitoproteasa Sulfhidráulica presente en Frutos de *Bromelia serra* Griseb.\*

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

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

**RESUMEN.** Por trituración de frutos semimaduros de *Bromelia serra* Griseb. (Bromeliaceae) en presencia de acetona fría (-20 °C) se obtiene un polvo acetónico (1,93 g%, p/p) con actividad proteolítica. La extracción del mismo con buffer fosfatos de pH 6,4 conteniendo EDTA 5 mM y cisteína 5 mM permite preparar una solución de enzima cruda con un contenido proteico de 8,24 g por 100 g de polvo, dotada de buena estabilidad térmica a temperaturas moderadas y con un máximo de actividad caseinolítica a pH 6,0-7,8. Esta preparación cruda se purifica por cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-75 Superfine) y la fracción activa se resuelve en dos nuevas fracciones por cromatografía de intercambio iónico (DEAE Sephacel y CM Sepharose).

**SUMMARY.** "Proteases of Bromeliaceae. IV. Isolation of a Sulphydril Protease from Fruits of *Bromelia serra* Griseb." Almost mature fruits of *Bromelia serra* Griseb., blade homogenized (Waring blender) with cold acetone (-20 °C), provide a light, proteolytically active acetone powder (1,93 g% , w/w). Extractives obtained by gentle stirring with phosphate buffer pH 6,4 containing 5 mM cysteine and 5 mM EDTA (protein content 8,24 g per 100 g of powder) show good thermal stability at moderates temperatures and highest caseinolytic activity at pH 6.0-7.8. Gel-filtration (Sephadex G-75, Superfine) allows to separate one active fraction which is resolved in two new, more purified fractions through ion-exchange chromatography (DEAE Sephacel and CM Sepharose).

Las proteasas (EC 3.4.) son utilizadas en diversos procesos industriales, de los cuales los más conocidos son la tiernización de carnes, la fabricación de cueros, la elaboración de productos alimenticios (cerveza, quesos, pan, etc.), el tratamiento de

ciertas fibras textiles y la producción de detergentes. También merecen destacarse sus aplicaciones medicinales en preparaciones digestivas, antiinflamatorias, desbridantes de heridas y en la formulación de reconstituyentes<sup>1-3</sup>.

\* El presente trabajo ha recibido el apoyo de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (Expediente 2109-1297/85) y fue presentado en la primera Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica, Montevideo (Uruguay), noviembre de 1987.

**PALABRAS CLAVE:** Bromeliaceae; *Bromelia serra* Griseb.; Enzimas proteolíticas; Fitoproteasas; Hidrolasas; Proteasas de frutos; Sulfhidril-proteasas.

**KEY WORDS:** *Bromeliaceae*; *Bromelia serra* Griseb.; Proteolytic enzymes; Plant proteases; Hydrolases; Fruit proteases; Sulphydril proteases.

Anualmente se comercializan en el mercado mundial 75.000 toneladas de enzimas, de las cuales el 60% son proteasas. La mayoría de ellas son de origen microbiano y de naturaleza extracelular, lo que facilita su obtención y permite disminuir los costos de producción. De todos modos, un importante grupo de fitoproteasas sulfhidrúlicas es de gran aplicación industrial, siendo sus representantes más conspicuas papaína, ficina y bromelina, caracterizadas por ser muy activas aún a altas temperaturas y en un rango de pH cercano a la neutralidad, poseer bajo peso molecular, ser activadas por sustancias reductoras y presentar una secuencia de aminoácidos altamente conservativa en las proximidades de sus centros activos<sup>4</sup>.

Las Bromeliáceas constituyen una familia caracterizada por producir proteasas en cantidades que justifican su explotación comercial. El género tipo es *Bromelia*, representado por unas cincuenta especies americanas<sup>5</sup>, de las cuales cinco crecen en el país: *B. laciniosa* Mart., *B. hieronymi* Mez, *B. serra* Griseb., *B. balansae* Mez y *B. urbaniana* (Mez) L.B. Smith<sup>6</sup>. De los frutos de las dos primeras se han aislado sendas proteasas<sup>7-9</sup> y en esta oportunidad se comunican las características de la sulfhidrilproteasa presente en frutos de *B. serra* Griseb.

#### MATERIAL VEGETAL

Bayas semimaduras de *Bromelia serra* Griseb., recolectadas en mayo de 1987 por el Lic. Aníbal G. Amat en la Provincia de Corrientes\*, mantenidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso.

Las plantas son estoloníferas, con filodios envainadores de 1,50 m de largo x 4 cm de ancho, con bordes muy espinosos y

punta muy prolongada y punzante. Poseen meritalios cortos (ca. 40 cm de largo x 1,5 cm de diámetro) en cuyo extremo desarrolla una infrutescencia globosa de 10-14 cm de largo x 7-10 cm de diámetro, de aspecto que recuerda al extremo de una maza de guerra medieval e integrada por bayas ovoides de 4 cm x 2,5 cm, de color amarillo limón.

#### PARTE EXPERIMENTAL

Las preparaciones enzimáticas crudas se obtienen por trituración de las bayas en presencia de acetona fría, tal como ha sido descrito en un trabajo previo<sup>7</sup>, con un rendimiento de 1,93 g de polvo acetónico por 100 g de frutos.

La actividad proteolítica se determina midiendo el grado de digestión de la caseína, de acuerdo al procedimiento detallado con anterioridad<sup>9</sup>.

El contenido proteico del polvo acetónico se estima por el método de Lowry *et al.*<sup>10</sup> modificado por Potty<sup>11</sup> para su uso en presencia de fenoles, hecho corriente en extractivos de origen vegetal. Dada la interferencia que producen tanto la cisteína como el EDTA en la determinación<sup>12</sup>, los extractivos se preparan sin el agregado de estas sustancias, que sólo protegen la estructura enzimática, sin modificar la capacidad extractiva del buffer.

#### *Variación de la actividad caseinolítica en función del pH y de la temperatura*

Las muestras destinadas a estos ensayos se preparan agitando suavemente a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 60 minutos 0,5 g de polvo acetónico con 100 ml de buffer fosfatos de pH 6,4 conteniendo EDTA 5 mM y cisteína 5 mM. El material insoluble se separa por centrifugación durante 30 minutos a 16000 g en centrífuga refrigerada y se lleva a volumen con la solución extractante.

\* Argentina. Pcia. de Corrientes, Departamento Capital: ruta 12 hacia Perichón, Amat *et al.* 1090, V-1987 (LPE).

En la determinación del perfil de pH se utiliza caseína al 1% en solución 0,1 M de buffer fosfatos (pH 6,0 a 7,5), bórico-cloruro de potasio-hidróxido de sodio (pH 8,25 a 10), bicarbonato de sodio-hidróxido de sodio (pH 10,5 y 11) y fosfato de sodio-hidróxido de sodio (pH 11,5 y 12). Los valores que se consignan corresponden al pH medido en la mezcla de reacción (fig. 1).

El perfil de temperatura se establece determinando la actividad caseinolítica a pH 6,4 durante 20 minutos, a intervalos de 5 °C entre 20 y 80 °C (fig. 2).

*Estabilidad térmica de la preparación enzimática*

Muestras preparadas como se indicó antes se incuban a 37, 47, 60 y 65 °C durante 5, 10, 20, 40, 60 y 90 minutos, al cabo de los cuales se colocan en baño de hielo hasta el momento de la determinación de la actividad caseinolítica (fig. 3).

*Cromatografía de exclusión molecular*

Una solución al 3,5% de la preparación no purificada se cromatografía en Sephadex

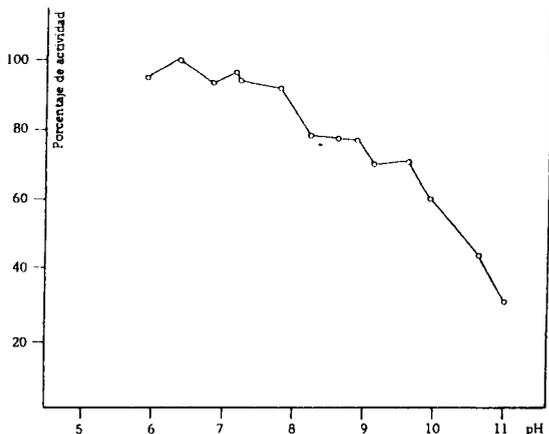


Figura 1. Variación de la actividad caseinolítica en función del pH. La absorbancia a 280 nm de los sobrenadantes se determinó luego de incubar la mezcla de reacción 20 minutos a 37 °C.

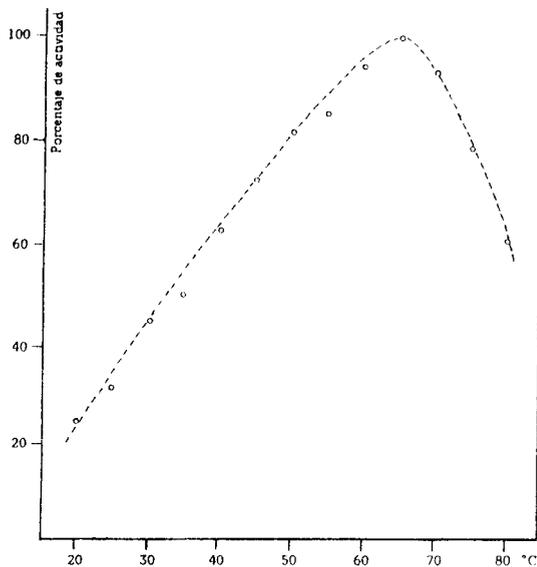


Figura 2. Variación de la actividad caseinolítica en función de la temperatura. Las determinaciones se llevaron a cabo a pH 6,4 y la absorbancia de los sobrenadantes a 280 nm fue leída luego de 20 minutos de incubación de la mezcla de reacción.

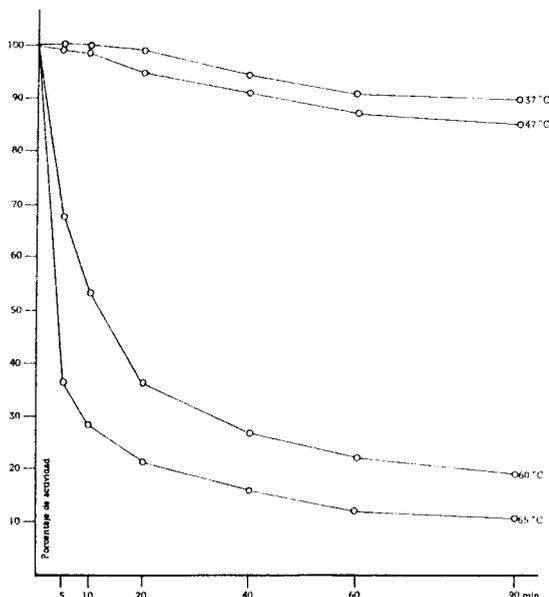


Figura 3. Estabilidad de la proteasa no purificada. Las muestras se mantienen durante distintos períodos de tiempo a diferentes temperaturas y luego se determina la actividad caseinolítica residual.

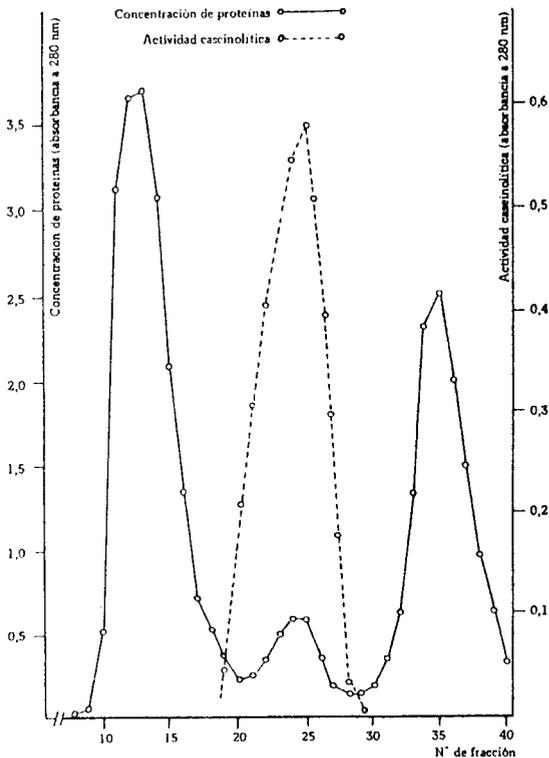


Figura 4. Fraccionamiento de la enzima no purificada a través de Sephadex G-75 Superfine.

G-75 superfine (columna Pharmacia K 15/30, volumen del gel 49,5 ml, eluyente buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,4, volumen de siembra 2 ml, velocidad de flujo 6,5 cm.hora<sup>-1</sup>, volumen recogido en cada tubo 1,2 ml). El diagrama que ilustra la fig. 4 se obtiene mediante lectura directa de los eluatos a 280 nm y contiene además los correspondientes valores de actividad caseinolítica.

#### Cromatografía de intercambio iónico

La fracción activa obtenida en el paso anterior se somete a un cambio de buffer por pasaje a través de Sephadex G-25 y elución posterior con tris-ácido clorhídrico 0,1 M de pH 8. La totalidad de la misma se siembra en una columna Pharmacia K 15/30 conteniendo 45 ml de DEAE-Sepha-

cel. La elución se inicia agregando 30 ml de buffer de partida (tris-ácido clorhídrico 0,1 M de pH 8), para luego generar un gradiente lineal de cloruro de sodio 0-1 M, disuelto en el mismo buffer. La velocidad de flujo se regula a 12,2 cm.hora<sup>-1</sup> y se recogen fracciones de 1,2 ml (fig. 5).

Los eluatos correspondientes a la fracción no retenida por el intercambiador aniónico se reúnen y siembran en una columna de las características señaladas, conteniendo 40 ml de CM-Sepharose equilibrada con buffer tris-ácido clorhídrico de pH 8, del cual se hacen pasar 38 ml antes de aplicar un gradiente lineal de cloruro de sodio 0-1 M disuelto en el mismo buffer (velocidad de flujo 16,3 cm.hora<sup>-1</sup>, recogiendo fracciones de 2,1 ml). El diagrama de elución se muestra en la fig. 6.

Todas las separaciones cromatográficas se llevan a cabo a 4 °C, en cámara fría.

#### DISCUSION DE LOS RESULTADOS

La trituración de frutos semimaduros de *Bromelia serra* Griseb. en presencia de acetona fría permite obtener una preparación cruda ("polvo acetónico") que representa el 1,93% del peso de los frutos.

El contenido proteico del extractivo que se obtiene por tratamiento del polvo acetónico con buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,4 es de 8,24 g por 100 g de polvo.

Como puede apreciarse en la fig. 1, la preparación no purificada exhibe su máxima actividad caseinolítica a pH 6,0-7,8, rango en el que prácticamente permanece constante. La actividad sigue siendo aún considerable a pH cercano a 9 (80%), pero disminuye a la mitad a pH 10 y se reduce a un 30% cuando el medio se torna más alcalino (pH 11).

El análisis de la fig. 2 permite comprobar que el comportamiento térmico de la proteasa cruda de *B. serra* es similar al demostrado por preparaciones equivalentes de

*B. laciniosa*<sup>9</sup> y de *B. hieronymi*<sup>10</sup>: luego de incubar durante 20 minutos la mezcla de reacción, la máxima actividad caseinolítica se obtiene a 65 °C, reduciéndose a un 80% a 75 °C y a un 60 % al alcanzar los 80 °C en iguales condiciones.

La preparación no purificada manifiesta una estabilidad elevada a temperaturas moderadas: luego de 90 minutos de incubación a 37 °C conserva un 90% de la actividad inicial y al cabo del mismo tiempo a 47 °C la actividad se mantiene superior al 85% . A temperaturas más elevadas (60 °C y 65 °C) la actividad se reduce rápidamente (36% luego de 20 minutos a 60 °C y 21,5% al cabo del mismo tiempo); a partir de los 20 minutos hay en ambos casos una manifiesta disminución de la velocidad de inactivación, sugiriendo la existencia de componentes enzimáticos de diferente estabilidad térmica (fig. 3).

Al igual que en el caso de las dos especies anteriormente citadas, la cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-75) permite una excelente separación de la fracción activa, que en el diagrama de la fig. 4 aparece flanqueada por una de mayor peso molecular y alto contenido fenólico (de elevada absorbancia a 330 nm) y otra de menor peso molecular, con alta absorbancia a 280 nm pero nula a 330 nm y carente de actividad proteolítica.

Mediante la aplicación sucesiva de ambos tipos de cromatografía de intercambio (aniónico y catiónico) a la fracción activa obtenida por exclusión molecular se consigue una purificación significativa, ya que aparecen dos componentes de propiedades eléctricas distintas. En el diagrama de la Fig. 5 se observa una primera fracción de  $pI > 8$  que no es retenida por el intercambiador aniónico (DEAE-Sephacel) y otra de menor punto isoeléctrico que es liberada cuando el gradiente de cloruro de sodio alcanza valores del orden de 0,5 a 0,7 M.

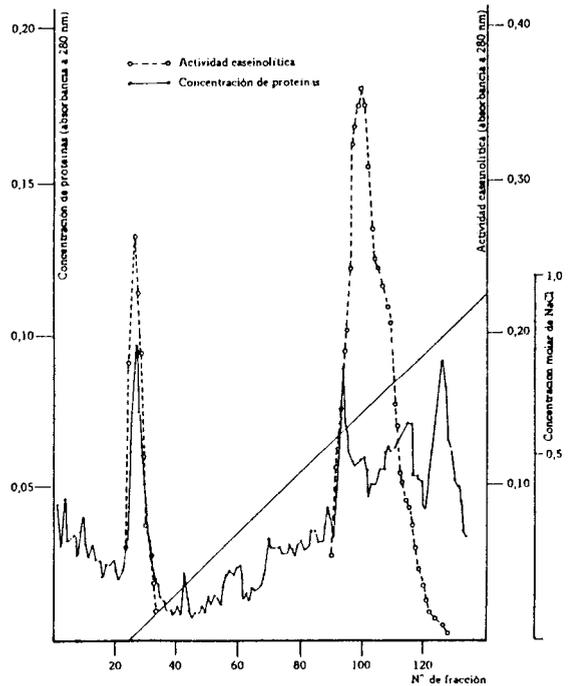


Figura 5. Purificación a través de DEAE Sephacel de la fracción activa obtenida por cromatografía de exclusión molecular.

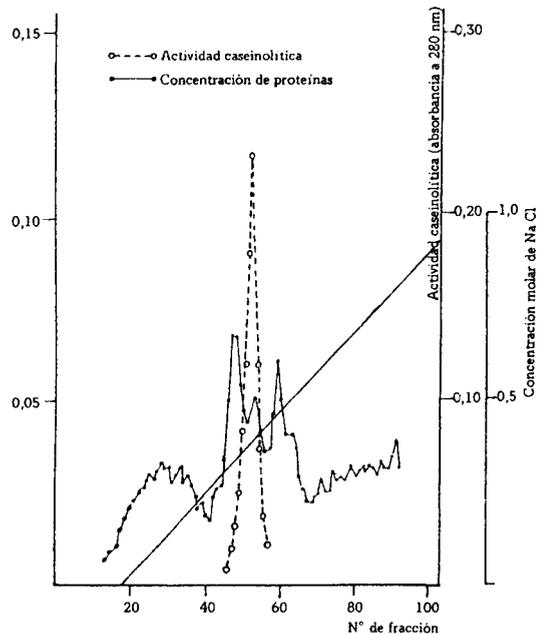


Figura 6. Purificación a través de CM Sepharose del componente básico separado por DEAE Sephacel.

La fracción de mayor PI es recromatografiada a través de un intercambiador catiónico (CM-Sepharose). La fig. 6 muestra un pico no totalmente resuelto que retiene la actividad proteolítica y que eluye cuando el gradiente de cloruro de sodio alcanza el rango 0,3-0,5 M.

Las tres proteasas hasta ahora estudia-

das presentan características distintivas, ya que la preparación aislada de *B. laciniosa* carece de componentes básicos, en tanto que en las otras dos aparece una fracción de esas características acompañada por una segunda fracción activa de  $pI < 8$  (*B. serra*) o por dos de ellas (*B. hieronymi*).

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Sicard, P. (1982) "Applications industrielles des enzymes", en "Les Enzymes. Production et utilisations industrielles" (G. Durand y P. Monsan, eds.), Gauthier-Villars, Paris, págs. 121-64
2. Whitaker, J.R. (1982) "Enzymes of importance in high protein foods", en "Use of Enzymes in Food Technology" (P. Dupuy, ed.) Technique et Documentation Lavoisier, Paris, págs. 329-58
3. Netti, C., G.L. Bandi y A. Pecile (1972) *II Farmaco* (Ed. Pr.) 27: 453-66
4. Mantell, S.H., J.A. Matthews y R.A. McKee (1985) "Principles of Plant Biotechnology. An Introduction to Genetic Engineering in Plants", Blackwell Sci. Pub., London, págs. 207-12
5. Smith, L.B. y R.J. Downs (1979) "Bromelioideæ (Bromeliaceæ)", *Flora Neotropica*, Monograph N° 14, Part III, págs. 1493-2142
6. Castellanos, A. (1945) "Bromeliaceæ", en "Genera et Species Plantarum Argentinarum" Tomo III, (H.R. Descole, dir.), Guillermo Kraft Ltda., Buenos Aires, págs. 143-57
7. Buttazzoni, M.S., N.O. Caffini, C.L. Natalucci y N.S. Priolo (1984) *Acta Farm. Bonaerense* 3: 33-8
8. Natalucci, C.L., N.S. Priolo, M.S. Buttazzoni y N.O. Caffini (1985) *Acta Farm. Bonaerense* 4: 93-8
9. Priolo, N.S., M.S. Buttazzoni, N.O. Caffini y C.L. Natalucci (1986) *Acta Farm. Bonaerense* 5: 159-64
10. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall (1951) *J. Biol. Chem.* 193: 265-75
11. Potty, V.H. (1969) *Anal. Biochem.* 29: 535-9
12. Peterson, G.H. (1979) *Anal. Biochem.* 100: 201-20