

Proteasas Presentes en el Látex de Frutos de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. (Moraceae)

LAURA M.I. LOPEZ*, CLAUDIA L. NATALUCCI** y NESTOR O. CAFFINI

Laboratorio de Botánica Aplicada, Facultad de Ciencias Exactas,
Universidad Nacional de La Plata, Casilla de Correo 711, 1900 La Plata, Argentina

RESUMEN. El látex que se obtiene por incisiones superficiales de frutos de *Maclura pomifera*, recogido sobre buffer fosfatos 0,1 M (pH 7) y centrifugado a 16.000 g para eliminar gomas y otros componentes insolubles, produce un extracto crudo con máxima actividad proteolítica entre pH 8,75 y 10,60 y con excelente estabilidad térmica, pudiendo conservarse adecuadamente por liofilización. Por precipitación acetónica y cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sephrose CL-6B) y catiónico (CM-Sephrose CL-6B) se consiguen purificar tres fracciones activas.

SUMMARY. "Proteases from the Latex of Fruits of *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. (Moraceae)." Latex obtained by superficial incisions of *Maclura pomifera* fruits, received on cold neutral phosphate buffer and centrifuged to remove gummy material, affords a crude extract with higher proteolytic activity between pH 8.75 and 10.6 and a notably thermal stability that can be advantageously kept as lyophilized powder. Acetone precipitation followed by ion exchange chromatography (DEAE-Sephrose CL-6B and CM-Sephrose CL-6B) allows the purification of three active fractions.

INTRODUCCION

La presencia de enzimas proteolíticas en el látex de algunas plantas superiores es un hecho frecuente: papaína y ficina, dos de las proteasas de mayor aplicación industrial¹, provienen del látex de frutos de *Carica papaya* (Caricaceae) y de *Ficus carica* o *F. glabrata* (Moraceae), respectivamente. Sin embargo debe advertirse que no todas las plantas con látex son buenas productoras de enzimas proteolíticas, aún cuando se han aislado proteasas de distintos tipos a

partir de especies pertenecientes a las principales familias botánicas caracterizadas por la presencia de laticíferos (Apocynaceae, Asclepiadaceae, Caricaceae, Euphorbiaceae y Moraceae)².

Dentro de las Moraceae, los estudios se han limitado casi exclusivamente al género *Ficus*, probablemente a raíz de que algunos tempranos ensayos³ sobre la actividad proteolítica de especies de otros géneros (*Artocarpus forest*, *Brosimum alicastrum*, *Broussonetia papyrifera* y *Morus nigra*) resulta-

* Becaria de la Universidad Nacional de La Plata

** Miembro de la Carrera del Investigador de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires

PALABRAS CLAVE: *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid.; Moraceae; Fitoproteasas; Proteasas de Látex; Proteasas de Frutos; Purificación de Enzimas

KEY WORDS: *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid.; Moraceae; Plant Proteases; Latex Proteases; Fruit Proteases; Enzyme Purification

ron poco alentadores. Bajo el nombre de ficina se comercializa el látex seco o escasamente purificado de *Ficus glabrata* (y en menor medida de *F. carica*), pero en realidad estas preparaciones enzimáticas están constituidas por un conjunto de componentes activos de los que se posee ya acabado conocimiento ⁴. Más recientemente se han investigado las proteasas presentes en *Ficus elastica* ("ficina E"). ⁵

La única referencia existente sobre proteasas de *Maclura pomifera* ("osage orange") es una comunicación breve contenida en una obra general sobre el tema ⁶, en la que se consignan algunas propiedades de una preparación enzimática no purificada que no fue objeto de estudios posteriores. En el presente trabajo se dan a conocer los resultados obtenidos al analizar el látex de frutos de dicha especie, que incluye la extracción, purificación y caracterización parcial de las proteasas que contiene.

MATERIAL ESTUDIADO

Se utilizó látex proveniente de frutos bien desarrollados, pero no totalmente maduros, de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid., recolectados en marzo de 1989 en la ciudad de Villa Elisa, Provincia de Buenos Aires.

Maclura pomifera es un árbol o arbusto espinoso de hojas caedizas, acuminadas, pubescentes en la foliación y posteriormente glabras, enteras, de 5 a 10 cm de largo. Su fruto es un sincarpio globoso, solitario, verde o amarillo, de 10 a 15 cm de diámetro, formado por la concrecencia de múltiples y pequeñas drupas. Es una especie cultivada en toda la región templado-cálida de Argentina, siendo muy adecuada para la formación de cercos vivos y rompevientos. Florece en primavera y madura en verano y otoño, multiplicándose por semillas. ⁷

PARTE EXPERIMENTAL

Obtención del extracto crudo

El látex se obtuvo practicando incisiones superficiales a lo largo de frutos frescos, recogiendo en un recipiente conteniendo buffer fosfatos 0,1 M (pH 7,0) mantenido a 0-4 °C. Esta preparación enzimática que contiene 37% (V/V) de látex fue homogeneizada e inmediatamente fraccionada y conservada a -20 °C.

Para obtener lo que se denomina "extracto crudo", la preparación anterior fue diluída (1:20) con buffer fosfatos 0,1 M (pH 7) y centrifugada a 16.000 g durante 20 minutos a 4 °C, eliminando así gomas y otros materiales insolubles.

Determinación de la actividad caseinolítica

La mezcla de reacción consistió en 1,1 ml de solución de caseína al 1% y 0,1 ml de solución de enzima, ambas en buffer fosfatos 0,1 M (pH 7,0). Al cabo de 5 minutos a 37 °C se detuvo la reacción mediante la adición de 1,8 ml de ácido tricloroacético al 5%. Las mezclas resultantes se centrifugaron directamente en los tubos de ensayo donde se practicó la reacción y los productos de hidrólisis se estimaron por lectura de la absorbancia de los sobrenadantes lípidos a 280 nm.

Se adoptó una unidad enzimática arbitraria (unidad caseinolítica) definida como la cantidad de enzima que produce una variación de una unidad de absorbancia por minuto en las condiciones antes mencionadas.

Determinación de la concentración de proteínas

Se utilizó el método de Bradford ⁸, que mide la absorción a 595 nm del complejo formado entre la proteína y el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250, usando albúmina bovina como patrón. En los eluatos cromatográficos la concentración de proteínas fue estimada por medida directa de la absorbancia a 280 nm.

Determinación de la concentración de glúcidos

Fue medida por el método de Dubois *et al.* ⁹, que utiliza ácido sulfúrico concentrado y fenol al 5% como reactivos, leyendo la absorbancia a 490 nm y expresando los resultados como glucosa.

Variación de la actividad caseinolítica del extracto crudo en función del pH

Para obtener el perfil de pH se utilizaron soluciones de caseína al 1%, preparadas en buffer fosfatos 0,1 M (pH 6,0-7,5), ácido bórico-cloruro de potasio-hidróxido de sodio 0,1 M (pH 8,0-10,0) y glicina-cloruro de sodio-hidróxido de sodio 0,25 M (pH 10,5-12,0). En todos los casos se determinó la actividad caseinolítica en las condiciones antes mencionadas, a excepción del pH del buffer en el que se disuelve la caseína.

Estabilidad térmica del extracto crudo

Muestras de extracto crudo se incubaron

a 37 °C, 45 °C, 55 °C, 60 °C y 65 °C, durante 0, 5, 12, 25, 40, 60, 90 y 120 minutos; luego se colocaron en baño hielo-agua hasta el momento del agregado del sustrato para la determinación de la actividad caseinolítica en la forma usual (a 37 °C).

Precipitación acetónica fraccionada

Un volumen de extracto crudo preenfriado a 4 °C fue tratado secuencialmente con uno, dos y tres volúmenes de acetona fría (-20 °C), adicionados gota a gota y agitando; el procedimiento está esquematizado en la fig. 1. En cada paso, luego del agregado del agente precipitante la preparación se dejó en reposo 10 minutos a -20 °C y después se centrifugó a 16.000 g por 15 minutos a 4 °C. En todos los casos el precipitado obtenido fue redissuelto en buffer fosfatos 0,1 M (pH 7,0), determinándose la actividad caseinolítica y la concentración de proteínas y glúcidos de las soluciones respectivas.

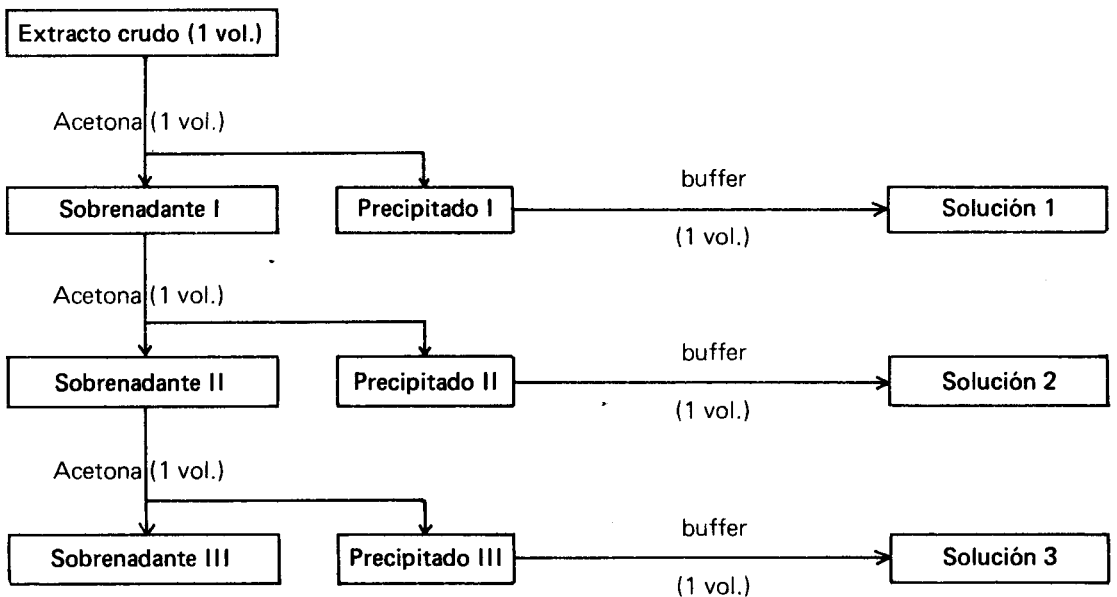


Figura 1. Esquema de la precipitación acetónica fraccionada. La redisolución de cada uno de los precipitados se efectuó con buffer fosfatos 0,1 M (pH 7,0).

Cromatografía de intercambio aniónico

Se utilizó una columna (Pharmacia K 15/30) rellena con 55 ml de DEAE-Sepharose CL-6B, equilibrada con buffer Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0), en la que se sembró una solución de enzima preparada por redisolución en el mismo buffer del precipitado obtenido al tratar un volumen de extracto crudo con dos volúmenes de acetona. Luego de lavar la columna con 60 ml de buffer de partida, las proteínas retenidas fueron eluidas con 200 ml de un gradiente lineal de cloruro de sodio (0,0-0,5 M) en Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0).

Cromatografía de intercambio catiónico

La fracción no retenida por el intercambiador aniónico fue luego aplicada en su totalidad a una columna de iguales características, rellena con 56 ml de un intercambiador catiónico (CM-Sepharose CL-6B) y equilibrada con buffer Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0). Luego de lavar la columna con 60 ml del mismo buffer la elución fue llevada a cabo con 200 ml de un gradiente lineal de cloruro de sodio (0,0-1,0 M) en el buffer de partida.

RESULTADOS Y DISCUSION

Por cada 100 g de frutos frescos de *Maclura pomifera* se obtiene un promedio de 0,5 ml de látex, tal como se indicó en la parte experimental. El agregado de EDTA y/o cisteína al buffer extractante no modifica la actividad caseinolítica del extracto crudo, ni tampoco se incrementa la actividad enzimática por la adición de cisteína a la mezcla de reacción. Dado que la cisteína actúa como activador de tiol-proteinasas, dicho comportamiento sugeriría que las proteasas en estudio no pertenecen a ese grupo.

En la fig. 2 se muestra el efecto de la conservación en frío ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) de la suspensión de látex, que retiene el 85% de la actividad caseinolítica inicial aún después de 6 meses de almacenamiento en esas condiciones. Por otro lado, el extracto crudo puede almacenarse liofilizado sin pérdida significativa de su actividad enzimática.

El perfil de pH del extracto crudo se muestra en la fig. 3. A valores de pH inferiores a 6,75 la actividad no llega al 40% del máximo, incrementándose luego de manera prácticamente constante hasta alcanzar el

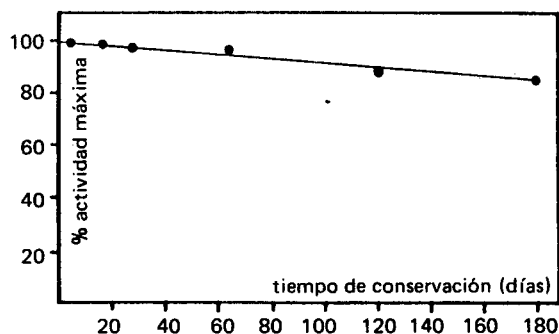


Figura 2. Efecto del almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ de la suspensión de látex. La actividad caseinolítica residual se determinó a los 5, 8, 17, 28, 64, 120 y 180 días de conservación.

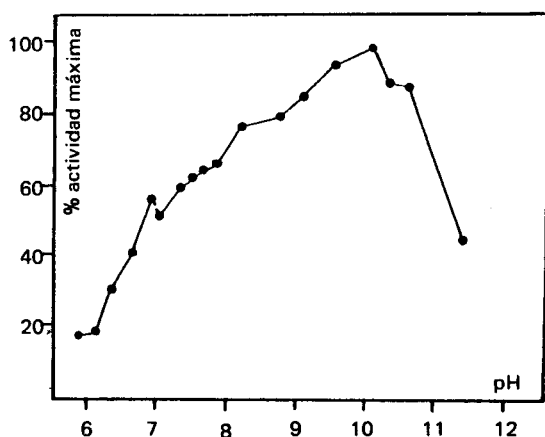


Figura 3. Efecto del pH sobre la actividad caseinolítica del extracto crudo. La actividad caseinolítica fue ensayada a distintos valores de pH, medidos en la mezcla de reacción, durante 5 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

valor óptimo (pH 10,1), a partir del cual desciende bruscamente (43% de la actividad máxima a pH 11,4). La actividad relativa supera el 80% en un rango de pH entre 8,75 y 10,60, característica que hace a esta preparación enzimática especialmente adecuada para su empleo en procesos que exijan ser llevados a cabo en medio alcalino.

La estabilidad térmica del extracto crudo se grafica en la fig. 4. La actividad enzimática de la preparación se mantiene prácticamente intacta luego de permanecer 2 horas a 37 °C, retiene el 95% de la actividad inicial durante el mismo tiempo a 45 °C y un

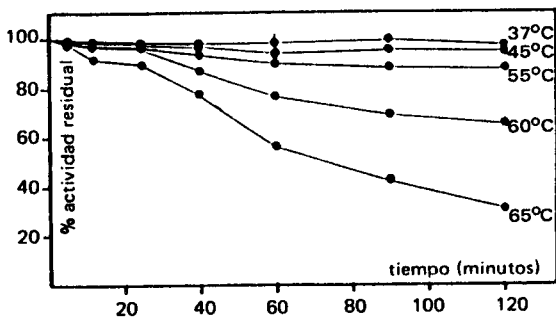


Figura 4. Estabilidad térmica del extracto crudo. Las muestras fueron preincubadas a las temperaturas indicadas durante 5, 12, 25, 40, 60, 90 y 120 minutos. La actividad caseinolítica residual se determinó a 37 °C durante 5 minutos.

88% a 55 °C; a 60 °C la actividad es casi constante durante los primeros 20 minutos, decayendo luego gradualmente (65% de actividad residual a las 2 horas). A 65 °C la actividad decrece desde un principio, siendo del 57% al cabo de una hora y del 31% a las 2 horas.

Dado que el extracto crudo es considerablemente pigmentado y contiene una apreciable cantidad de glúcidos solubles (relación glúcidos/proteínas = 1,6), se ensayó una precipitación acetónica fraccionada (fig. 1) con el objeto de optimizar el método de purificación. La tabla 1 muestra los resultados obtenidos: la adición al extracto crudo de un volumen de acetona permite eliminar los pigmentos y la casi totalidad (94,7%) de los glúcidos, reteniendo el 85,3% de las proteínas y el 88,2% de la actividad; el agregado de un segundo volumen de acetona produce un precipitado rico en proteína activa, a pesar de su bajo contenido en proteínas totales (6,6%). En base a los datos anteriores se resolvió precipitar el extracto crudo directamente con 2 volúmenes de acetona; de esta manera se consigue remover los pigmentos y el 92% de los glúcidos, recuperándose el 97,2% de la actividad enzimática.

Mediante cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sepharose CL-6B) del precipitado acetónico redisoluto se obtiene la

Muestra	Glúcidos (mg/ml) (%)	Proteínas (mg/ml) (%)	Actividad (U _{cas} /ml) (%)	Actividad específica (U _{cas} /mg)
Extracto crudo	1,000 (100,0)	0,624 (100,0)	85,68 (100,0)	137,3
Solución 1	0,053 (5,3)	0,532 (85,3)	75,60 (88,2)	142,1
Solución 2	0,025 (2,5)	0,041 (6,6)	7,68 (9,0)	187,3
Solución 3	0,018 (1,8)	0,039 (6,3)	1,40 (1,6)	35,9

Tabla 1. Resultados de la precipitación acetónica fraccionada.

separación neta de dos fracciones activas (A y B), que eluyen de la columna cuando el gradiente lineal de cloruro de sodio aplicado alcanza concentraciones de 0,10 M y 0,17 M, respectivamente (fig. 5). La fracción proteica no retenida es sometida luego a cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharose CL-6B), lo que permite separar una tercera fracción activa (C) cuando el gradiente de cloruro de sodio es de 0,23 M (fig. 6).

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos en el proceso de purificación: en total se logra recuperar el 66% de la actividad enzimática original, distribuida en tres frac-

ciones proteolíticamente activas (fracciones A, B y C) que han sido purificadas 1,7, 3,1 y 2,5 veces, respectivamente.

Los resultados del estudio de los componentes proteolíticos del látex de frutos de *Maclura pomifera* no coinciden con los obtenidos por Tauber ⁶ en cuanto al pH de máxima actividad (pH 6,45), si bien en ese caso se utilizó gelatina en lugar de caseína como sustrato; en cambio resulta similar el comportamiento de la enzima frente al agregado de cisteína, que no afecta la velocidad de reacción. La preparación cruda obtenida en esta oportunidad puede resultar valiosa en procesos tecnológicos que requie-

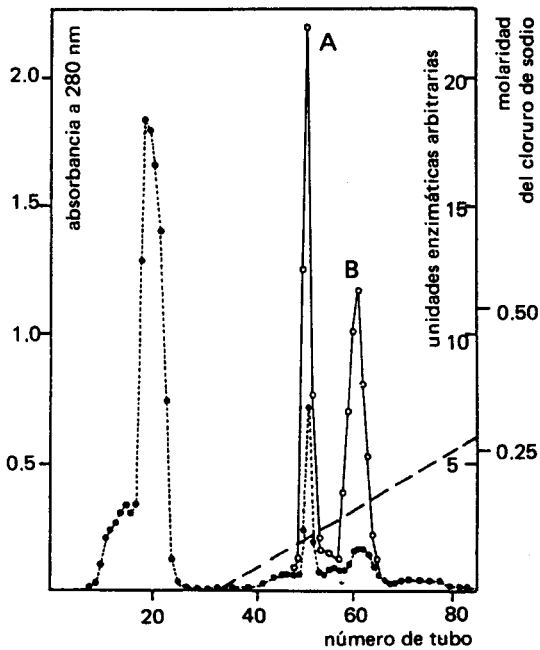


Figura 5. Purificación a través de DEAE-Sepharose CL-6B. El precipitado acetónico redissuelto en buffer Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) se sembró en una columna de DEAE-Sepharose CL-6B (1,5 x 30 cm), se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0,0-0,5 M) en buffer Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0), a una velocidad de flujo de 4,9 cm/h y se recolectaron fracciones de 2,0 ml. —○— Actividad caseinolítica determinada a los 15 minutos de incubación a 37 °C. —●— Absorbancia a 280 nm.

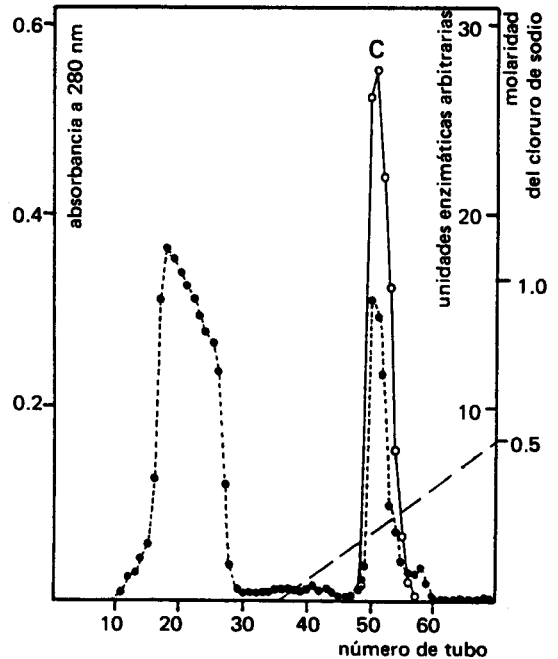


Figura 6. Purificación a través de CM-Sepharose CL-6B. La fracción básica no retenida por DEAE-Sepharose CL-6B fue sembrada en una columna de CM-Sepharose CL-6B (1,5 x 30 cm), eluida con un gradiente lineal de NaCl (0,0-1,0 M) en buffer Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0), a una velocidad de flujo de 4,3 cm/h y se recolectaron fracciones de 2,5 ml. —○— Actividad caseinolítica determinada a los 15 minutos de incubación a 37 °C. —●— Absorbancia a 280 nm.

Fracción	Volumen (ml)	Proteínas (mg/ml)	Actividad (U _{cas} /ml)	Actividad total (U _{cas})	Actividad específica (U _{cas} /mg)	Purificación (veces)	Rendimiento %
Extracto crudo	30	0,624	85,7	2571	137,3	1,0	100,0
Precipitado acetónico	30	0,573	83,3	2499	145,4	1,1	97,2
Fracción A	14,7	0,116	26,6	391	229,3	1,7	15,2
Fracción B	31,4	0,023	9,8	308	426,1	3,1	12,0
Fracción C	31,0	0,094	31,9	989	339,4	2,5	38,5

Tabla 2. Purificación de las proteasas del látex de frutos de *Maclura pomifera*.

ran el uso de proteasas, debido al amplio rango de pH en el que es activa, a su notable estabilidad térmica (comparable a la de algunas proteasas microbianas) y a la posibilidad de conservarla inalterada por liofilización. El esquema de purificación permite, por otra parte, separar con facilidad los componentes proteolíticamente activos, cu-

ya caracterización será objeto de posteriores trabajos.

AGRADECIMIENTOS. El presente trabajo contó con el apoyo parcial de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires y de la Universidad Nacional de La Plata.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Caffini, N.O., L.M.I. López, C.L. Natalucci y N.S. Priolo (1988) *Acta Farm. Bonaerense* 7: 195-213
2. Boller, T. (1986) "Roles of proteolytic enzymes in interactions of plants with other organisms", en "Plant Proteolytic Enzymes" (M.J. Dalling, ed.), CRC Press, Boca Raton, Vol. I, págs. 76-80
3. Robbins, B.H. y P.D. Lamson (1934) *J. Biol. Chem.* 106: 725-8
4. Gaughran, E.R.L. (1976) *Q.J. Crude Drug Res.* 14: 1-21
5. Lynn, K.R. y N.A. Clevette-Radford (1986) *Phytochemistry* 25: 1559-61
6. Tauber, H. (1949) "The Chemistry and Technology of Enzymes", J. Wiley & Sons, New York, pág. 171
7. Dimitri, M.J. (1978) "Moráceas", en "Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería" (M.J. Dimitri, dir.), Editorial Acme SACI, Buenos Aires, 3a. Ed., Tomo I, Primer Volumen, pág. 327
8. Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72: 248-54
9. Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith (1956) *Anal. Chem.* 28: 350-6