

Proteasas de Bromeliaceae. V. Separación y Purificación de Sulfhidril-Proteasas presentes en frutos de *Bromelia balansae* Mez

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

RESUMEN. La trituración de frutos semimaduros de *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae) en presencia de acetona fría (-20°C) permite obtener una preparación enzimática cruda, que al ser tratada con buffer fosfatos de pH 6,4 conteniendo EDTA y cisteína 5 mM produce una solución con actividad proteolítica apreciable y con máxima acción hidrolítica sobre caseína dentro de un rango de pH entre 6,25 y 8,50. Esta solución enzimática cruda se purificó por cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-75 Superfino) y de intercambio iónico (DEAE- y CM-Sepharosa), con lo que se obtuvieron tres fracciones proteolíticamente activas.

SUMMARY. "Proteases of Bromeliaceae. V. Separation and Purification of Sulfhydryl Proteases from Fruits of *Bromelia balansae* Mez". Almost ripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae) were blade homogenized within cold (-20°C) acetone, providing a crude preparation that could be partially solubilized in phosphate buffer (pH 6,4) containing EDTA and cysteine 5 mM. Solutions hydrolize casein (maximum activity pH 6.25-8.50), the activity being enhanced by addition of cysteine. The crude enzyme was purified by molecular sieve chromatography (Sephadex G-75, Superfine) and ion exchange chromatography (DEAE- and CM-Sephrose). Three proteolitically active fractions were thus obtained.

Las proteasas ocupan holgadamente el primer lugar en el mercado mundial de enzimas¹, debido en buena parte a la variedad de aplicaciones que han demostrado poseer². En el campo de la farmacoterapia las enzimas proteolíticas de origen vegetal son tradicionalmente empleadas como agentes antiinflamatorios³, pero estudios muy recientes llevados a cabo con bromelina⁴⁻⁶

alientan crecientes expectativas acerca de su uso como citostáticos.

Las Bromeliáceas constituyen una familia en la que la presencia de proteasas en cantidades superiores a las fisiológicamente necesarias parece ser una característica distintiva. Esto ocurre al menos dentro del género *Bromelia*, integrado por unas cincuenta especies americanas⁷, en ocho de las cua-

* El presente trabajo ha recibido el apoyo de la CIC de la Prov. de Buenos Aires y fue presentado en el X Congreso Farmacéutico Argentino, San Luis, Argentina, octubre de 1988.

** Miembro de la Carrera del Investigador de la CIC de la Prov. de Buenos Aires, Argentina.

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

KEY WORDS: Bromeliaceae; *Bromelia balansae* Mez; Proteolytic enzymes; Plant proteases; Hydrolases; Fruit proteases; Sulfhydrylproteases.

les⁸⁻¹² se ha comprobado la presencia de endopeptidasas cisteínicas¹³ en los frutos.

En nuestro país crecen cinco especies de *Bromelia*¹⁴: *B. laciniosa* Mart., *B. hieronymi* Mez, *B. serra* Griseb., *B. balansae* Mez y *B. urbaniana* (Mez) L.B. Smith (*Deinacanthon urbanianum* Mez). A partir de frutos de las tres primeras se han obtenido preparaciones enzimáticas con actividad caseinolítica destacada¹⁰⁻¹²; en esta oportunidad se dan a conocer las características de las sulfhidrilproteasas que están presentes en los frutos de *Bromelia balansae* Mez.

MATERIAL ESTUDIADO

Se utilizaron frutos bien desarrollados, pero no totalmente maduros, de *Bromelia balansae* Mez (n.v. "caraguatá"), recolectados en mayo de 1987 en la Provincia de Corrientes, Departamento Capital. Las infrutescencias fueron conservadas a -20°C hasta el momento de ser procesadas para obtener las preparaciones crudas.

Bromelia balansae Mez es una planta perenne, estolonífera, de 0,80 a 1 m de altura, provista de hojas alargadas (1 m de largo por 4 cm de ancho) y armadas de fuertes agujones en el margen. La infrutescencia es cilíndrica, de 20 a 25 cm de largo por 12 a 15 cm de ancho, y está constituida por numerosas bayas elipsoidales amarillentas, de 4 a 5 cm de largo por 2 cm de diámetro, fibrosas y pluriseminadas. La planta vegeta a la sombra de grandes macizos arbóreos, extendiéndose desde Brasil y Paraguay (especialmente por la parte oriental) hasta el NE de Argentina (provincias de Corrientes y Misiones)¹⁴.

PARTE EXPERIMENTAL

Obtención de la preparación enzimática no purificada

Los frutos se cortan dentro de un reci-

piente que contiene acetona fría (-20°C) y se liberan de sus semillas. La mezcla se tritura (Omnimixer Sorvall) durante 5 minutos en baño de hielo y etanol; la suspensión obtenida se filtra a través de papel de filtro y se lava con acetona fría hasta la eliminación de pigmentos. Mediante posterior secado al vacío se obtiene un "polvo acetónico" que se muele finamente en mortero y se conserva en recipientes herméticos.

Para solubilizar la enzima se trata el polvo acetónico durante 30 minutos a 4°C con buffer fosfatos de pH 6,4 conteniendo EDTA y cisteína 5 mM, eliminando el material insoluble por centrifugación a 16.000 g durante 15 minutos en centrífuga refrigerada.

Determinación de la actividad caseinolítica y del contenido proteico

La mezcla de reacción está constituida por 1,1 ml de solución de caseína al 1% conteniendo cisteína (12,5 mM) y 0,01 ml de solución de enzima, ambas en buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,4. Al cabo de 20 minutos a 37°C se detiene la reacción 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 reacción; los productos de hidrólisis se estiman por lectura de la absorbancia a 280 nm de los sobrenadantes lípidos.

La concentración de proteínas de las soluciones de enzima se determina por el método de Bradford¹⁵, que mide la absorción a 595 nm del complejo formado entre la proteína y el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250. La elección de la técnica obedece a su gran sensibilidad y a que la presencia de fenoles (frecuentes en extractos vegetales) EDTA y cisteína no interfieren con la reacción.

Variación de la actividad caseinolítica de la preparación cruda en función del pH y de la temperatura

Para obtener el perfil de pH se utilizan soluciones de caseína en las condiciones antes indicadas, preparadas en buffer fosfatos 0,1 M (pH 6,0 a 7,5), ácido bórico-cloruro de potasio-hidróxido de sodio 0,1 M (pH 8,25 a 10,0), bicarbonato de sodio-hidróxido de sodio (pH 10,5 y 11) fosfato de sodio-hidróxido de sodio 0,1 M (pH 11,5 y 12,0).

El comportamiento de la enzima a distintas temperaturas se determina a pH 6,4, en el rango de 25 °C a 75 °C.

Estabilidad térmica de las soluciones de enzima

Muestras preparadas como ya se indicó se incuban a 37 °C, 50 °C, 60 °C y 65 °C durante 0, 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 en la forma usual.

Cromatografía de exclusión molecular

Soluciones al 2% de la preparación cruda (3,2 ml) se siembran en una columna de 45 cm de largo por 1,5 cm de diámetro interno (adaptación de una columna Pharmacia K 15/90) que contiene 58 ml de Sephadex G-75 Superfino. La elución se realiza con buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,4, con una velocidad de flujo de 7,4 cm.h⁻¹, recogiendo fracciones de 1,8 ml.

La técnica se repite en cuatro oportunidades y las fracciones con actividad caseinolítica se reúnen (44 ml) y se concentran por ultrafiltración (Amicon 8050, membrana YM 10) a un volumen final de 4,5 ml.

Cromatografía de intercambio aniónico

La fracción activa concentrada obtenida en el paso anterior se somete a un cam-

bio de buffer por pasaje a través de Sephadex G-25 y elución posterior con buffer tris-ácido clorhídrico 0,05 M de pH 8. La totalidad de la misma (9 ml) se siembra en una columna Pharmacia K 15/30 conteniendo 43,5 ml de DEAE-Sepharosa. La elución se inicia agregando 54 ml de buffer de partida (tris-ácido clorhídrico 0,05 M de pH 8), para luego generar un gradiente lineal de cloruro de sodio 0-0,7 M, disuelto en el mismo buffer (volumen total del gradiente 250 ml). La velocidad de flujo se regula a 7,9 cm.h⁻¹ y se recogen fracciones de 1,8 ml.

Cromatografía de intercambio catiónico

La fracción no retenida por el intercambiador aniónico (20,5 ml) se siembra en una columna de las características señaladas en la cromatografía de intercambio aniónico conteniendo 46,5 ml de CM-Sepharosa equilibrada con buffer tris-ácido clorhídrico 0,05 M de pH 8, del cual se hacen pasar 42 ml antes de aplicar un gradiente lineal de cloruro de sodio 0-0,7 M disuelto en el mismo buffer (volumen total del gradiente 250 ml). La velocidad de flujo se fijó en 9,6 cm.h⁻¹ y se recogieron fracciones de 1,8 ml.

Todas las operaciones cromatográficas fueron llevadas a cabo a 4 °C.

RESULTADOS

La trituración de frutos semimaduros de *Bromelia balansae* Mez en presencia de acetona fría permite obtener una preparación cruda con actividad caseinolítica ("polvo acetónico") que representa el 3% del peso de los frutos frescos.

El contenido proteico de la solución de enzima cruda es de 0,95 g por 100 g de polvo acetónico.

La fig. 1 da cuenta del comportamiento de la preparación no purificada a diferentes

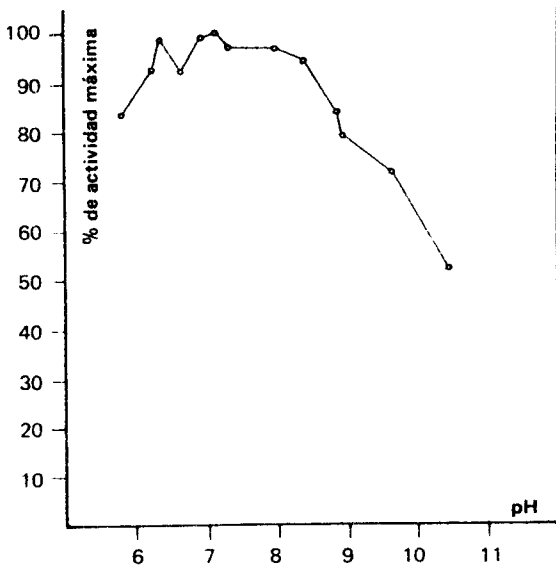


Figura 1. Variación de la actividad caseinolítica en función del pH. La absorbancia a 280 nm de los sobrenadantes se determinó luego de incubar la mezcla de reacción 20 minutos a 37 °C. Los valores de pH fueron medidos en la mezcla de reacción.

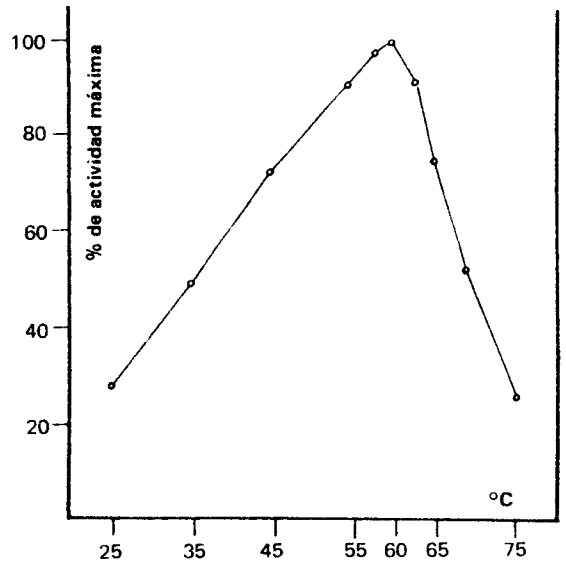


Figura 2. Variación de la actividad caseinolítica en función de la temperatura. Las determinaciones se llevaron a cabo a pH 6,4 y la absorbancia de los sobrenadantes a 280 nm fue leída luego de 20 minutos de incubación.

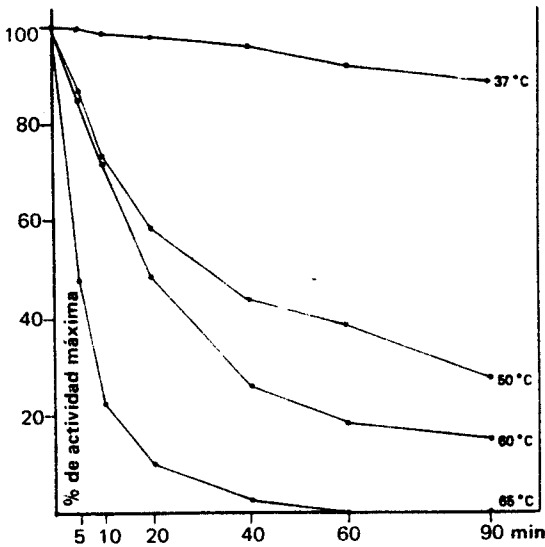


Figura 3. Estabilidad de la proteasa no purificada. Las muestras se mantuvieron durante diversos períodos de tiempo a distintas temperaturas y luego de una incubación de 20 minutos a 37 °C se determinó la actividad residual.

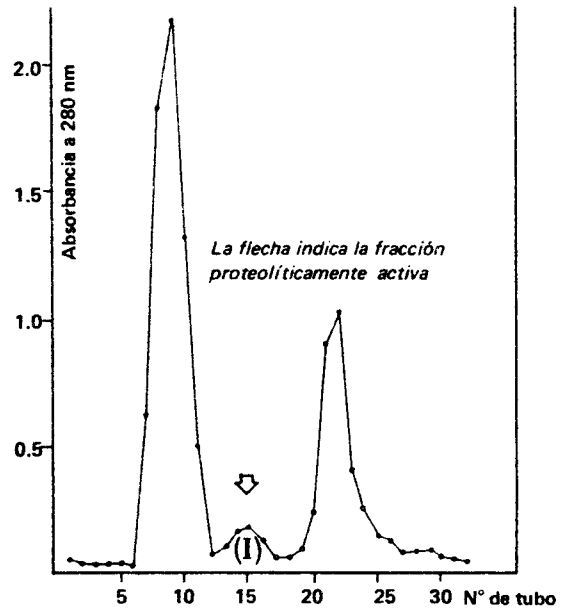


Figura 4. Fraccionamiento de la enzima no purificada a través de Sephadex G-75 Superfino.

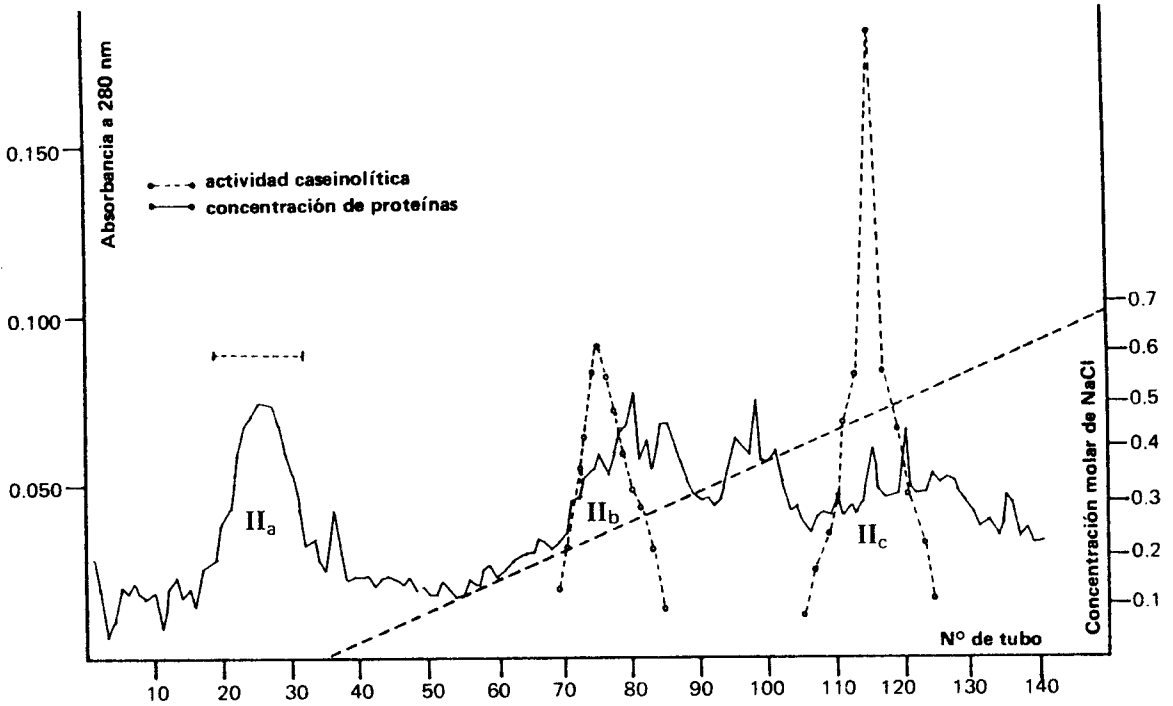


Figura 5. Purificación a través de DEAE-Sepharosa de la fracción activa (I) obtenida por cromatografía de exclusión molecular. El trazo sobre la fracción II_a indica en la abscisa el número de tubos reunidos para realizar la cromatografía de intercambio catiónico y en la ordenada el valor promedio de la actividad.

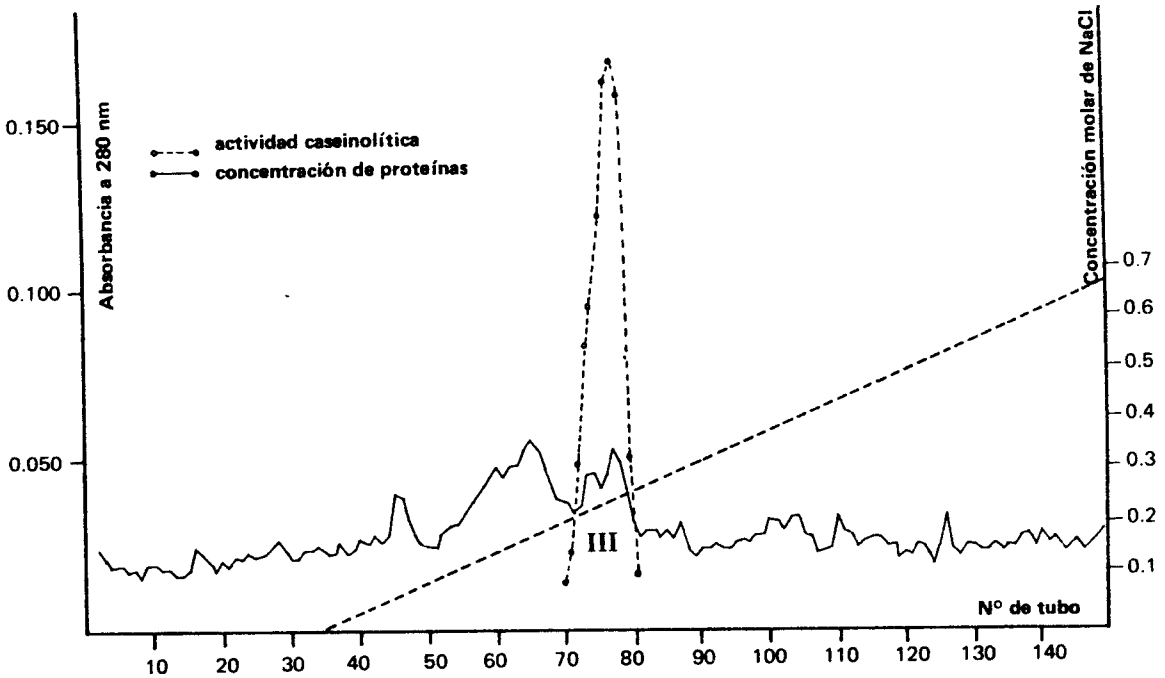


Figura 6. Purificación a través de CM-Sepharosa del componente básico (II_a) separado por DEAE-Sepharosa.

valores de pH. La actividad caseinolítica es máxima y permanece prácticamente constante dentro del rango de pH 6,25 a 8,25, disminuyendo al 70% de la misma a pH 9,5 y a la mitad a pH 10,5.

En la fig. 2 se muestra el efecto de la temperatura sobre la actividad caseinolítica a pH 6,4. Al cabo de 20 minutos de incubación, la preparación enzimática registra un máximo de actividad a 60 °C, en tanto que a 47 °C y 65 °C en las condiciones descritas alcanza el 80% de la actividad máxima, que es del 50% a 35 °C y 70 °C.

La preparación no purificada es estable a 37 °C, ya que conserva el 90% de su actividad después de un período de incubación de 90 minutos a esa temperatura. Luego de 20 minutos a 50 °C la actividad es un 60% de la inicial, pero se reduce a un 30% a los 90 minutos de incubación. Temperaturas superiores incrementan notoriamente la velocidad de degradación enzimática: al cabo de 20 minutos a 60 °C se pierde el 50% de la actividad inicial y alcanza sólo el 15% a los 90 minutos, en tanto que a 65 °C la actividad remanente es apenas el 10% de la inicial a los 20 minutos y se hace nula a los 60 minutos de incubación (fig. 3).

El perfil cromatográfico que se obtiene por exclusión molecular (Sephadex G-75) responde a un patrón común a las tres espe-

cies anteriores estudiadas¹⁰⁻¹²: luego de la elución de una primera fracción con alto contenido fenólico (de elevada absorbancia a 330 nm) se separa la fracción caseinolíticamente activa, de M_r 15.000-20.000 (I), seguida de una fracción constituida esencialmente por oligopéptidos (fig. 4).

La fracción activa obtenida por exclusión molecular (I) se resuelve en tres fracciones de mayor grado de pureza por cromatografía de intercambio aniónico a pH 8 (DEAE-Sepharsa): la primera de ellas (II_a) no es retenida por el intercambiador (fig. 5), mientras que la aplicación de un gradiente lineal de cloruro de sodio permite la separación de dos fracciones de $pI < 8$ cuando el gradiente alcanza concentraciones 0,2-0,3 M (II_b) y 0,45 M (II_c), respectivamente.

Sometida a cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharsa), la fracción II_a resulta sensiblemente purificada (III) cuando la concentración de cloruro de sodio del gradiente aplicado es de 0,25 M (fig. 6).

AGRADECIMIENTOS. Al Lic. Anibal G. Amat, quien recolectó los frutos de *Bromelia balansae* empleados en el presente trabajo. A las Srtas. Adriana Brullo y Adriana Obludziner por su colaboración en algunos aspectos de la parte experimental.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. 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
2. Caffini, N.O., L.M.I. López, C.L. Natalucci y N.S. Priolo (1988) *Acta Farm. Bonaerense* 7: 195-213
3. Kumakura, S., M. Yamashita y S. Tsurufuji (1988) *Eur. J. Pharmacol.* 150: 295-302
4. Batkin, S., S.J. Taussing y J. Szekerczes (1988) *Cancer Invest.* 6: 241
5. Batkin, S., S.J. Taussing y J. Szekerczes (1988) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 114: 507-8
6. Maurer, H.R., M. Hozumi, Y. Honna y J. Okabe-Kado (1988) *Planta Medica* 1988: 377-80
7. Smith, L.B. y R.J. Downs (1979) "Bromelioideae (Bromeliaceae)" en *Flora Neotropicalica*, Monograph N° 14, Part III, págs. 1493-2142

8. Toro-Goyco, E., I. Rodríguez Costas y H. Ehrig (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 622: 151-9
9. Garduño, R., M. Soriano, E. Chávez, M.T. Cruz, L.M. del Castillo y M. Castañeda-Agulló (1974) *Rev. Latinoamer. Quím.* 5: 243-8
10. Natalucci, C.L., N.S. Priolo, M.S. Buttazzoni y N.O. Caffini (1985) *Acta Farm. Bonaerense* 4: 93-8
11. Priolo, N.S., M.S. Buttazzoni, N.O. Caffini y C.L. Natalucci (1986) *Acta Farm. Bonaerense* 5: 159-64
12. Caffini, N.O., C.L. Natalucci, N.S. Priolo y M.S. Buttazzoni (1988) *Acta Farm. Bonaerense* 7: 9-14
13. Barret, A.J. (1986) "The classes of proteolytic enzymes", en "*Plant proteolytic enzymes*" (M.J. Dalling ed.), CRC Press, Boca Raton, USA, vol. I, págs. 1-16
14. Castellanos, A. (1945) "Bromeliaceae", en "*Genera et Species Plantarum Argentinarum*" (H.R. Descolle, dir.), G. Kraft Ltda., Buenos Aires, Argentina, Tomo II, págs. 143-57
15. Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72: 248-54