



JORNADAS DE JÓVENES INVESTIGADORES DE LA A.U.G.M.

“CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA LA INTEGRACIÓN REGIONAL”

Universidad: Nacional de La Plata
Facultad/Instituto/Centro,etc: Facultad de Ciencias Exactas,
Departamento Cátedra: Departamento de Ciencias Biológicas, LIPROVE
Curso de Posgrado (si fuera necesario). Alumna del Doctorado de la Fac. de Cs. Exactas
Dirección: 47 y 115, B1900AVW La Plata, Argentina.
Teléfono: (54 221) 4230121 Fax: (54 221) 4226947 E-mail: brunomariela@biol.unp.edu.ar
Autor: Mariela Anahí Bruno
Título: Bioquímica
Núcleo Disciplinario o Comité Académico: Farmacognosia de Productos Naturales
Otros miembros del grupo (si fuera necesario): Laura López, Néstor Caffini, Marcelo Pardo, Julio Mercerat
Palabra Clave: Fitopeptidasa (Español) Fitopeptidase (Portugués)



"Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas de frutos de

Bromelia hieronymi Mez (Bromeliaceae)"

Bioquímica Mariela A. Bruno

LIPROVE, Depto. de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata,

Casilla de Correo 711, B1900AVW, La Plata, Argentina. E-mail: brunomariela@biol.unlp.edu.ar.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

- Aislar, purificar y caracterizar peptidasas presentes en frutos de *Bromelia hieronymi* Mez, especie vegetal que crece espontáneamente en el Noroeste de nuestro país.
- Contar con nuevas fuentes de enzimas proteolíticas que eventualmente reemplacen a las preparaciones comerciales importadas que actualmente se usan en diversos procesos biotecnológicos.

METODOLOGÍA EMPLEADA

Material vegetal

Se utilizaron frutos verdes de *Bromelia hieronymi* Mez (“cháguar”, “cháguar negro”) procedentes de las proximidades de Santiago del Estero (Argentina), recolectados por el Ing. Lucas A. Roic (Universidad Nacional de Santiago del Estero). La planta es estolonífera, forma matorrales y posee filodios enhiestos, glaucos, de punta prolongada y esclerosada, con los bordes armados de aguijones negros y curvos. Las flores, de 4-6 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 5 × 2 cm. La especie se extiende desde Paraguay, por Bolivia, hasta el NE de Argentina, en los campos de vegetación xerófila (Natalucci *et al.*, 1985).

Obtención de extractos crudos

Los frutos (50 g) fueron cortados en rodajas y se trituraron en 250 mL de buffer fosfatos 0,1 M de pH 6, conteniendo EDTA y cisteína 5 mM. El extractivo se filtró por gasa y se centrifugó a 9000 rpm durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante (“extracto crudo”) se fraccionó y se conservó a –20 °C.

Precipitación fraccionada con solventes orgánicos

A los efectos de eliminar la mayor cantidad de carbohidratos y pigmentos presentes en el extracto crudo, el mismo fue sometido a precipitación fraccionada (4 °C) con volúmenes crecientes (0,5 a 5 vol) de acetona y de etanol. Los precipitados obtenidos fueron redisolventes en el mismo buffer de extracción.

Determinación del contenido de proteínas, azúcares solubles y actividad proteolítica

Se determinó el contenido de proteínas (Bradford, 1976), carbohidratos totales (Dubois *et al.*, 1956) y actividad caseinolítica (López *et al.*, 2000) sobre el extracto crudo y sobre cada uno de los precipitados etanólicos (PER) y acetónicos (PAR) redisolventes.

Efecto de activadores e inhibidores

Con el objeto de confirmar si la proteasa en estudio pertenece al grupo de las endopeptidasas cisteínicas, como parecen indicarlo estudios anteriores (Natalucci *et al.*, 1985; Priolo *et al.*, 1991), el sustrato (caseína) fue preparado con concentraciones crecientes (5, 10, 15, 20, 30 y 50 mM) de cisteína y luego se determinó la actividad caseinolítica como es habitual. Paralelamente se llevó a cabo un ensayo preincubando la preparación enzimática durante 30 min a 37 °C en presencia del inhibidor específico E-64, en concentración 100 µM. Finalizada la incubación, se determinó la actividad caseinolítica residual como se describió anteriormente.

SDS-PAGE

Fue realizada en un equipo Miniprotean II (Bio-Rad) de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970). La corriente se mantuvo constante a 40 mA durante el apilamiento (“stacking”) y luego se llevó a 60 mA durante 40 min. Los geles (poliacrilamida al 12,5 %) fueron teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250. Los valores de las masas moleculares fueron determinados por comparación con patrones proteicos (LMW markers, Bio-Rad).

Isoelectroenfoque (IEF) – Zimograma

El IEF del extracto crudo y de los distintos precipitados (PAR y PER) se llevó a cabo en una Mini IEF Cell, Mod. 111 (Bio-Rad). La muestra (1 mL) fue tratada con 5 vol de acetona y el precipitado redisolventes con 100 µL de agua redestilada. Se usaron geles de poliacrilamida al 5% conteniendo anfolitos de amplio rango (Pharmalyte 3-10, Pharmacia). El enfoque fue llevado a cabo a corriente constante a 100 V durante 15 min, seguidos de otros 15 min a 200 V y finalmente 1 h a 450 V. Los geles fueron fijados y luego teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250. Los zimogramas se realizaron incubando los geles sobre una película

fotográfica color (revelada pero no expuesta) durante 15 min a 55 °C. Las zonas de la película degradadas indican la presencia de proteasas en el gel.

Cromatografía de intercambio catiónico (FPLC).

En una primera etapa se intentó purificar el PAR obtenido por el agregado de dos volúmenes de acetona por cromatografía de intercambio catiónico. Se utilizó una columna (1,5 x 30 cm) de CM-Sepharose Fast Flow, equilibrada con Tris-HCl 50 mM de pH 8,0. Luego de lavar la columna con 60 mL del buffer de partida, se llevó a cabo la elución con 200 mL de un gradiente lineal de cloruro de sodio (0,0-0,5 M) en el mismo buffer; la velocidad de corrida fue de 1mL/min y se recolectaron fracciones de 2mL.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Como se muestra en la Fig. 1, el PAR permite recuperar un mayor porcentaje de proteínas y de actividad que el PER, si bien éste contiene menor cantidad de carbohidratos. En ambos casos con el agregado de 2 vol de solvente se consigue separar la casi totalidad de las proteínas activas, manteniendo reducido el contenido de carbohidratos.

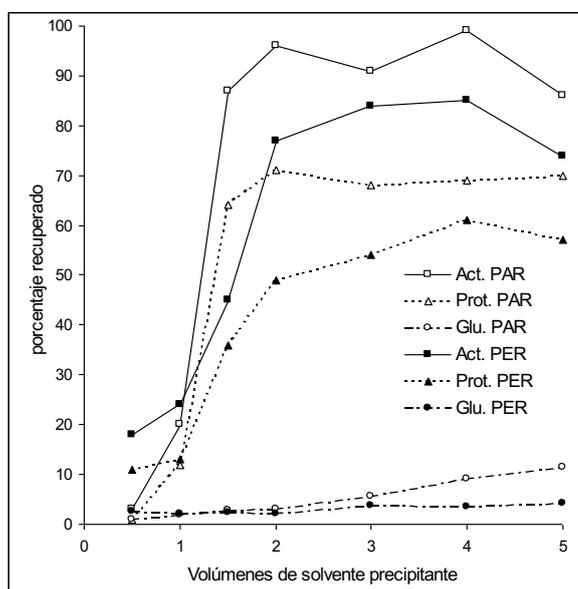


Figura 1. Rendimiento comparativo de la precipitación fraccionada con solventes orgánicos. Act: actividad caseinolítica; Prot: proteínas; Glu: carbohidratos

La Fig. 2 muestra el isoelectroenfoco de los PAR obtenidos con el agregado de diferentes volúmenes de acetona. El patrón de bandas permanece constante luego del agregado de dos volúmenes de acetona.

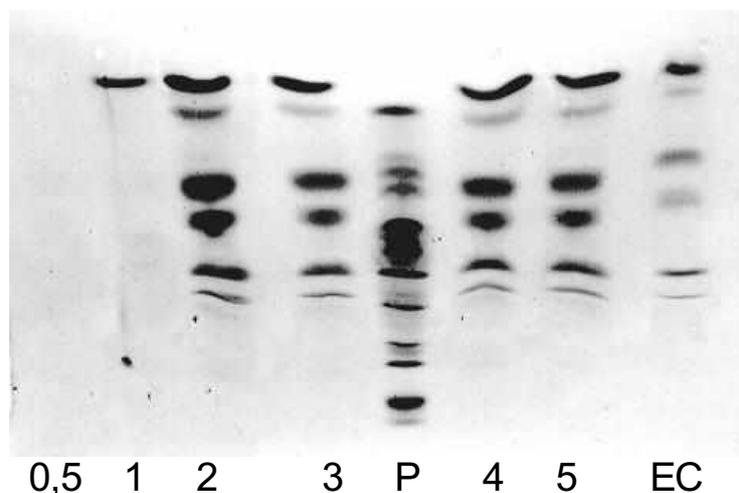


Figura 2. IEF de PAR obtenidos con distintos volúmenes (0,5; 1; 2; 3; 4; 5) de acetona. P: patrones. amiloglucosidasa (pI 3.50), inhibidor de tripsina (pI 4.55), β -lactoglobulina a (pI 5.20), anhidrasa carbónica II (pI 5.85), anhidrasa carbónica I (pI 6.55), mioglobina (pI 6.85 and 7.35), lectinas de *Lens culinaris* (pI 8.15, 8.45 and 8.65) y tripsinógeno (pI 9.30); EC: extracto crudo

El análisis por isoelectroenfoco del PAR (2 vol) muestra la presencia de seis bandas proteicas cuyos pI son 5,9, 6,4, 7,6, 8,3, 9,8, y 10,4. El zimograma correspondiente permite identificar dos fracciones con intensa actividad proteolítica (pI 8,3 y 6,4) y otras dos (pI 10,4 y 5,9) de menor cuantía (Fig. 3). Por SDS-PAGE (Fig. 4) se observa una banda mayoritaria de masa molecular de alrededor de 25 kDa, que está dentro del rango de los valores característicos de las endopeptidasas cisteínicas.

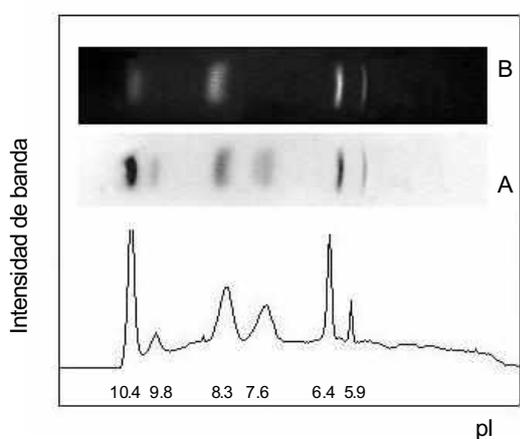


Figura 3. IEF (A) y zimograma (B) del PAR (2 vol).

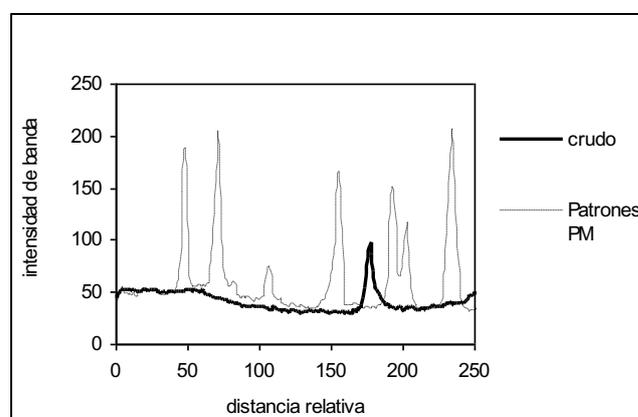


Figura 4. SDS-PAGE del extracto crudo

El resultado del tratamiento con concentraciones crecientes de cisteína se muestra en la Fig. 5. El agregado de cisteína incrementa la actividad caseinolítica, alcanzándose el valor máximo (34%) cuando la concentración de cisteína es ≥ 15 mM.

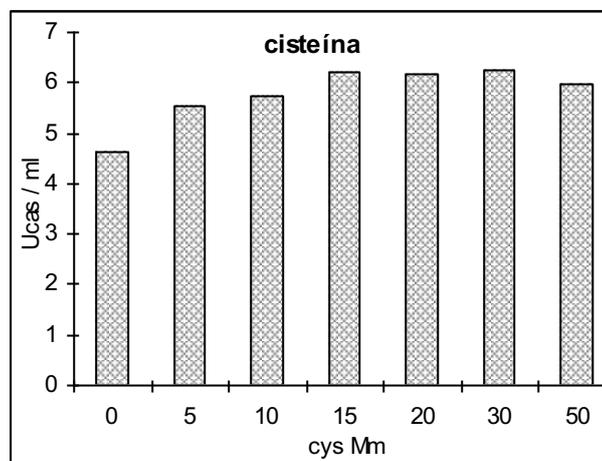


Figura 5. Efecto del tratamiento con cisteína

El agregado de E-64 (inhibidor específico de endopeptidasas cisteínicas) en concentración 100 μ M produjo una importante inhibición (actividad residual 5,2%), confirmando la naturaleza cisteínica de las proteinasas en estudio (Fig. 6).

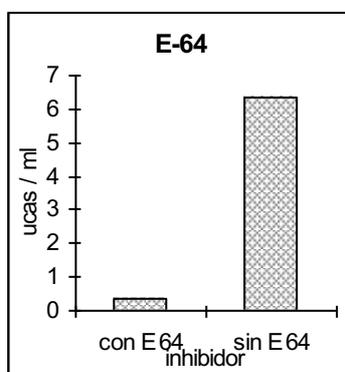


Fig. 6. Efecto del tratamiento con E-64

Por FPLC (intercambiador catiónico) se logra separar la fracción activa de pI 10,4 de la fracción no activa de pI 9,8 (datos no mostrados). Sobre la fracción no retenida se ha previsto realizar una cromatografía utilizando un intercambiador aniónico.

CONCLUSIONES

Se ha desarrollado una nueva estrategia para aislar y purificar las endopeptidasas presentes en frutos de *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae) que habían sido previamente estudiadas en nuestro laboratorio.

Los datos obtenidos coinciden con los estudios preliminares (Priolo et al., 1991) y definen la estrategia que se llevará a cabo en la purificación por FPLC, para luego caracterizar las especies moleculares proteolíticamente activas.

REFERENCIAS

- Bradford M.B.** (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. y Smith F.** (1956). "Colorimetric method for determination of sugars and related substances". *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Laemmli U.K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 227: 680-685
- López L.M.I., Sequeiros C., Brullo A., Maras B., Barra D., Natalucci C.L. y Caffini N.O.** (2000) "Purification and Characterization of Macrodontain I, a Cysteine Peptidase from Unripe Fruits of *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae)", *Protein Expression and Purification* 18: 133-40
- Natalucci C.L., Priolo N.S., Buttazzoni M.S. y Caffini N.O.** (1985) "Proteasas de Bromeliaceae. II. Separación, caracterización y fraccionamiento de una proteasa aislada de frutos de *Bromelia hieronymi* Mez", *Acta Farm. Bonaerense* 4: 93-8
- Priolo N.S., López L.M.I., Arribére M.C., Natalucci C.L. y Caffini N.O.** (1991) "New purified plant proteinases for the food industry", *Acta Alimentaria (Budapest)* 20: 189-196