

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



ENZIMAS PROTEOLITICAS DE FRUTOS DE ALGUNAS ESPECIES DE

BROMELIA (BROMELIACEAE) QUE CRECEN EN EL PAIS

MARTA SUSANA BUTTAZZONI DE COZZARIN

1981

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Biblioteca
50 y 115 1° subsuelo
biblioteca@exactas.unip.edu.ar
Tel 0221 422-6977/79 int. 129

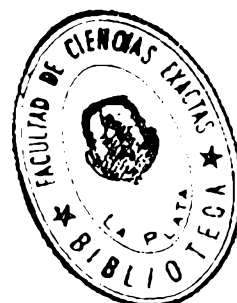


DEX-56174

511

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



ENZIMAS PROTEOLITICAS DE FRUTOS DE ALGUNAS ESPECIES DE
BROMELIA (BROMELIACEAE) QUE CRECEN EN EL PAIS

Legis no
211

DONACION.....
Fecha..... 25-6-99
Inv. B..... Inv..... B. 56. 174

MARTA SUSANA BUTTAZZONI DE COZZARIN

Deseo agradecer fervientemente al Profesor Dr. Néstor o. Caffini quien supo guiarme en la realización de este trabajo aportando no sólo sus conocimientos técnicos y científicos sino su desinteresada colaboración y amistad; también mi reconocimiento a la Profesora Dra. Graciela B. de Pfirter por su afecto y estímulo en los comienzos de esta labor. Quiero además expresar mi gratitud a mis amigos de la cátedra de Botánica por su apoyo moral, quienes en todo momento han sabido brindarme su constante cooperación, comprensión y generosidad.

INDICE GENERAL

ENZIMAS PROTEOLITICAS

DEFINICION Y CLASIFICACION	1
MECANISMOS DE ACCION	3
APLICACIONES	4

ENZIMAS PROTEOLITICAS DE PLANTAS SUPERIORES

PAPAINA	7
Determinación de la actividad enzimática	7
Purificación	8
Aislamiento y cristalización	8
Purificación por conversión en mercuripapaína y posterior activación	9
Propiedades	10
Estabilidad	10
Activadores e inhibidores	10
Propiedades físicas	11
Propiedades biológicas	11
QUIMOPAPAINA	11
Purificación	12
Propiedades	13
FICINA	14
Purificación	15
Propiedades	16
Estabilidad	16
Propiedades físicas	17
BROMELINAS	18
Bromelina de tallos	18
Determinación de la actividad enzimática	18
Purificación	19
Propiedades	19
Bromelina de frutos	22
Determinación de la actividad enzimática	22
Purificación	22
Propiedades	22

PINGUININA	23
OTRAS PROTEASAS DEL GENERO BROMELIA	25
ACTINIDINA	27
AGAVINA	27
ASCLEPINA	29
CALOTROPINA	30
EDESTINASA	33
EUFORBINA	34
HURINA	35
MEXICAINA	35
POMIFERINA	36
SOLANINA	37
TABERNEMONTANINA	38
PROTEASAS DE CEREALES	38
Arroz	38
Avena	39
Cebada	40
Centeno	42
Maíz	42
Trigo	45
PROTEASAS DE CUCURBITACEAS	46
Calabaza blanca	46
Melón	47
Zapallo	48
PROTEASAS DE LEGUMINOSAS	49
Arvejas	49
Maní	50
Mung	51
Porotos	52
Soja	53
Veza	55
CARBOXIPEPTIDASA DE ALGODON	55
CARBOXIPEPTIDASA DE FRUTOS CITRICOS	57
CARBOXIPEPTIDASA DE TOMATE	57
ENDOPEPTIDASA DE LOTO	58
ENDOPEPTIDASA DE TABACO	59
PROTEASA ACIDA DE SORGO	59
PROTEINASAS DE PAPA	60
PROTEINASAS DE RICINO	61

PROTEINASAS DE TRIGO SARRACENO	61
ENZIMAS PROTEOLITICAS DE PLANTAS INSECTIVORAS	62
ANTECEDENTES, OBJETIVOS Y ALCANCES DEL TRABAJO	64
MATERIAL	
DESCRIPCION BOTANICA Y DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS	66
PROCEDENCIA DEL MATERIAL Y EPOCA DE RECOLECCION	67
METODOS	
EXTRACCION DEL JUGO Y AISLAMIENTO DE LAS ENZIMAS CRUDAS	68
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA	69
Comportamiento frente a distintos activadores	70
Determinación de la temperatura óptima	70
Determinación del pH óptimo	70
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD AMIDASICA	71
Determinación de la concentración óptima de activador	72
Determinación de la temperatura óptima	72
Determinación del pH óptimo	73
Determinación de la concentración óptima de sustrato	73
PURIFICACION DE LAS ENZIMAS CRUDAS POR GELFILTRACION	73
Preparación de la columna	73
Desarrollo cromatográfico	74
Análisis de las fracciones obtenidas	74
RESULTADOS	
RENDIMIENTO DE JUGO POR PESO DE FRUTOS	76
RENDIMIENTO DE ENZIMA CRUDA POR VOLUMEN DE JUGO	77
RENDIMIENTO PROMEDIO DE ENZIMA CRUDA POR PESO DE FRUTOS	77
ACTIVIDAD CASEINOLITICA	77
Activadores	78
Temperatura óptima	78
pH óptimo	80
Actividades específicas de las enzimas crudas en condiciones óptimas	80

ACTIVIDAD AMIDASICA	82
Concentración óptima de activador	82
Temperatura óptima	82
pH óptimo	82
Concentración óptima de sustrato	82
Actividades específicas de las enzimas crudas en condiciones óptimas	82
PURIFICACION	85
CONCLUSIONES	89
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	94

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO PARA DESIGNAR ALGUNOS
SUSTRATOS ENZIMATICOS, ACTIVADORES E INHIBIDORES

ANA	Acetato de α -naftilo
APA	Alanina-p-nitroanilida
BAA	α -N-benzoil-L-argininamida
BAEE	α -N-benzoil-L-arginina etil éster
BAL	(British Anti-Lewisita) 2,3-dimercaptopropanol
BAME	α -N-benzoil-L-arginina metil éster
BANA	α -N-benzoil-L-arginina- β -naftilamida
BAPA	α -N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida (= BAPNA)
BTPA	α -N-benzoil-L-tirosina-p-nitroanilida
DAN-O-Me	Diazoacetil-DL-norleucina metil éster
DFP	Diisopropilfluorfosfato
DTT	Ditiotreitol (1,4-dimercapto-2,3-butanodiol)
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
Gr-PPA	Glutaril-fenilalanina-p-nitroanilida
LNA	Leucina- β -naftilamida
LPA	Leucina-p-nitroanilida
MIA	Acido monoiodoacético
NEM	N-etilmaleimida
PCMB	p-cloromercuriobenzoato
PHMB	p-hidroximercuribenzoato
PPA	Fenilalanina-p-nitroanilida
SDS	Dodecil sulfato de sodio (lauril sulfato de sodio)
TAME	p-tosil-L-arginina metil éster
Z-Glu	Carbobenzoxi-L-glutámico
Z-Glu-Phe	Carbobenzoxi-L-glutámico-L-fenilalanina
Z-Phe	Carbobenzoxi-L-fenilalanina
Z-Phe-Ala	Carbobenzoxi-L-fenilalanina-L-alanina
Z-Phe-Leu	Carbobenzoxi-L-fenilalanina-L-leucina
Z-Tir-Leu	Carbobenzoxi-L-tirosina-L-leucina

NOMINA DE NOMBRES TRIVIALES DE PROTEASAS VEGETALES Y DE
NOMBRES CIENTIFICOS Y VULGARES DE LAS ESPECIES CITADAS

<i>Actinidia chinensis</i> Planch.	27	Calabaza blanca	46
Actinidina	27	Calotropina	30
<i>Agave americana</i> L.	28	Calotropina-FI	31
<i>Agave sisalana</i> (Engelm.) Perr.	27	Calotropina-FII	31
Agavina	27	Calotropina-DI	32
Algodón	55	Calotropina-DII	32
carboxipeptidasa de,	55	<i>Calotropis gigantea</i> R.Br.	31
Ananá	18	<i>Calotropis procera</i> Dry	30
<i>Ananas comosus</i> L.	18	<i>Cannabis sativa</i> L.	33
<i>Arachis hypogaea</i> L.	50	Cáñamo	33
Araquina	50	Carboxipeptidasa C _N	57
Arroz	38	<i>Carica papaya</i> L.	7
Arveja	49	Castor	61
aminopeptidasa 1 (AP1)	49	Cebada	40
aminopeptidasa 2 (AP2)	49	aminopeptidasa de,	41
aminopeptidasa 3 (AP3)	50	carboxipeptidasas de,	41
Arvejilla	55	-peptidasa A	41
<i>Asclepias mexicana</i> Cav.	29	-peptidasa B	41
<i>Asclepias speciosa</i> Torr.	29	-peptidasa C	41
<i>Asclepias syriaca</i> L.	29	Centeno	42
Asclepina	29	<i>Citrus natsudaidai</i> Hayata	57
Asclepina "m"	29	Cuaguayote	35
Asclepina "s"	29	<i>Cucumis melo</i> L. cv. Prince	47
Avena	39	<i>Cucumis melo</i> L. cv. Makuwa Makinc	47
<i>Avena sativa</i> L. cv. Victory	39	<i>Cucumis melo</i> L. var. <i>reticulatus</i> Naud.	47
<i>Benincasa cerifera</i> Savi	46	<i>Cucurbita maxima</i> Duch. cv. Hubbard	48
<i>Bromelia hemispherica</i> Lam.	25	<i>Drosera peltata</i> Smith	62
<i>Bromelia karatas</i> L.	25	<i>Drosera rotundifolia</i> L.	62
<i>Bromelia palmeri</i> Mez	25	Edestina	33
<i>Bromelia pinguin</i> L.	23	Edestinasa	33
<i>Bromelia sylvestris</i> Willd. ex Sims	25	Euforbina	34
Bromelina de frutos	22	<i>Euphorbia cerifera</i> Alcocer	34
Bromelina de tallos	18	<i>Euphorbia lathyris</i> L.	34
Bromelinas	18		

<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench	61	<i>Nepenthes macfarlanei</i> Hamsl.	63
Faseolina	52	<i>Nepenthes</i> spp.	62
Ficina	14	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	59
<i>Ficus carica</i> L.	14	<i>Oriza sativa</i> L. cv. Ratna	38
<i>Ficus carica</i> L. cv. Höraishi	18	<i>Oriza sativa</i> L. cv. Nihonbare	38
<i>Ficus carica</i> L. cv. Kadota	16	Osage Orange	36
<i>Ficus glabrata</i> H.B.K.	14	Palmerina	25
<i>Ficus stenocarpa</i> F. Muell. ex Benth.	14	Papa	60
Giadina	43	proteasas de,	60
<i>Glycine max</i> (L.) Merrill	53	Papaína	7
<i>Gossypium hirsutum</i> L. cv. Coker 413	56	Papaya	7
Grosella china	27	Papaya-peptidasa A	12
Hemisfericina	25	Papaya-peptidasa B	12
Higos	15	<i>Phaseolus aureus</i> Roxb.	51
Hordeína	43	<i>Phaseolus radiatus</i> L.	51
<i>Hordeum vulgare</i> L.	40	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. Perlicka	53
<i>Hura crepitans</i> L.	35	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. Prince	52
Hurina	35	<i>Pileus mexicanus</i> I.M. Johnston	35
Insectívoras.		Pingüinina	23
proteasas de plantas,	62	Pingüinina A	23
Jabillo	35	Pingüinina B	23
Karatasina	25	<i>Pisum sativum</i> L. cv. Greenfeast	49
<i>Lycopersicum esculentum</i> Mill.	57	Pita	28
Loto	58	aminopeptidasa de,	28
endopeptidasa de,	58	Pomiferina	36
<i>Maclura pomífera</i> Schneid.	37	Porotos	52
Madar	31	carboxipeptidasa de,	52
Maíz	43	proteinasa a	52
Mamón	7	proteinasa b	52
Maní	50	Quimopapaína	11
Maya	23	Quimopapaína A	12
Melón	47	Quimopapaína B	12
Mexicaína	35	Ricino	51
Mung	51	<i>Ricinus communis</i> L.	51
Naranja Osage	36	<i>Secale cereale</i> L.	42
<i>Nelumbo nucífera</i> Gaertn.	58	Silvestrisina	25
Nepentesina	63	Sisal	27

Soja	53	Trigo	45
L-argininamida hidrolasa de,	54	carboxipeptidasas de	46
Solanina	37	peptidasas de	45
<i>Solanum elaeagnifolium</i> Cav.	37	proteinasas de	46
<i>Solanum tuberosum</i> L. cv. Russet Burbank	60	Trigo sarraceno	61
Sorgo	59	proteinasas de	61
proteasa ácida de,	59	<i>Triticum aestivum</i> L.	45
<i>Sorghum vulgare</i> Moench.	59	Vencetósigo	29
Soyina	53	Veza	55
Tabaco	59	<i>Vicia sativa</i> L.	55
endopeptidasas de,	59	Vicilina	51
<i>Tabernaemontana grandiflora</i> Jacq.	38	<i>Vigna radiata</i> (L.) Wilczek	51
Tabernemontanina	38	White Gourd	46
Tomate	57	Yang-Tao	27
carboxipeptidasa de	57	Zapallo	48
		aminopeptidasas de	48
		<i>Zea mays</i> L.	43
		Zeína	43

I. ENZIMAS PROTEOLITICAS

DEFINICION Y CLASIFICACION

Las enzimas proteolíticas, también denominadas proteasas o proteinasas, son hidrolasas cuyos sustratos son proteínas o péptidos de variada jerarquía a los que en algunos casos pueden degradar hasta sus unidades constitutivas, los aminoácidos.

Considerando la información experimental de la que actualmente se dispone y atendiendo esencialmente a las características del mecanismo de acción catalítico más que a su origen, especificidad de sustrato o acción fisiológica, se acostumbra a considerar cuatro grupos principales de enzimas proteolíticas: 1) proteasas "serínicas", así denominadas por poseer al menos un residuo serina en su centro activo, el que es específicamente inhibido por compuestos organofosforados, 2) proteasas "sulfhidríflicas" o "tiol-proteasas", en las que el residuo activo está representado por cisteína y que en forma general requieren sustancias reductoras como activadores, resultando inhibidas por iones de metales pesados, 3) "metaloproteinasas", que habi-

tualmente necesitan la presencia de iones metálicos para manifestar su acción hidrolítica y que son sensibles a los agentes quelantes y 4) "proteasas ácidas", caracterizadas por precisar un medio francamente ácido para poder actuar (Hartley, 1960).

Dentro del primer grupo se incluyen, entre otras, las conocidas proteasas animales tripsina, quimotripsina y trombina, así como algunas de origen microbiano tales como las subtilopeptidasas. Aún en trabajos recientes (Cruz *et al.*, 1974) no se mencionan enzimas proteolíticas serínicas de origen vegetal. Sin embargo este concepto deberá ser modificado en lo sucesivo, ya que en el último decenio se ha consignado la separación e identificación de alrededor de una docena de proteinasas "de tipo serínico" provenientes de plantas, la mitad de las cuales son carboxipeptidasas.

El segundo grupo, por el contrario, estaría mayoritariamente integrado por proteasas vegetales, de las cuales seguramente papaína, ficina y bromelina son sus representantes más conspicuos.

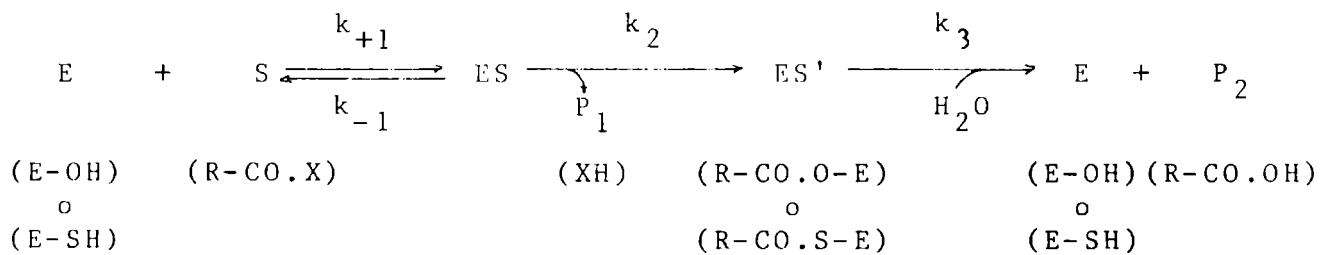
Tradicionalmente se ha aceptado que las enzimas proteolíticas de los dos grupos anteriores son endopeptidasas, en tanto que las metaloproteasas del tercer grupo incluirían únicamente exopeptidasas, tanto aminopeptidasas como carboxipeptidasas. También en este caso la información última con la que se cuenta exige una mayor flexibilidad de la clasificación propuesta *ut supra*. En efecto, a la excepción ya mencionada de las carboxipeptidasas serínicas vegetales que no requieren iones metálicos para poner de manifiesto su actividad, debe sumarse la existencia de aminopeptidasas sulfhidrúlicas del mismo origen que tampoco los necesitan.

El último grupo es probablemente el menos nutrido, donde pepsina suele ser mencionada como su representante

casi exclusiva, pero que sin embargo debería incluir algunas proteasas vegetales decididamente ácidas, como la edestinasa del cáñamo y las enzimas proteolíticas de las plantas insectívoras.

MECANISMOS DE ACCION

Tal como ha sido señalado, prácticamente la totalidad de las enzimas proteolíticas vegetales pertenecen a uno de los dos primeros grupos y su comportamiento respondería a similares mecanismos de acción enzimática. Actualmente se postula que tanto las proteasas serínicas como las sulfhidríticas actúan sobre sus sustratos según una reacción en tres etapas:



El primer paso es la formación de un complejo enzima-sustrato ES (complejo de Michaelis) en el que no hay enlaces covalentes y que está sujeto a la constante de disociación $K_s = k_{-1}/k_{+1}$. A continuación sobreviene un proceso de acilación representado por la ruptura del enlace susceptible (R-CO.X) y la subsiguiente formación de un compuesto covalente intermedio acil-enzima (ES'), en el que la unión del grupo R-CO. del sustrato y la enzima se efectúa por un enlace éster (R-CO.O-E) en las proteasas serínicas o tioéster (R-CO.S-E) en las sulfhidríticas. Al mismo tiempo se produce la liberación del primer producto P_1 (XH), llamado también grupo saliente. La constante de velocidad de esta segunda etapa (k_2) es la constante de acilación. Finalmente sobreviene la desacilación, regida por la constante k_3 y que requiere la presencia de un compuesto nucleofílico, usualmente el agua, dando por resultado un segundo producto P_2 (R-CO.OH) y la libera-

ción de la enzima (Oliver *et al*, 1977).

En la serie de reacciones anteriores participan, además de los de cisteína o serina, los grupos laterales de otros aminoácidos espacialmente vecinos, que en conjunto constituyen el llamado "centro o sitio activo" de la enzima, en cuyo ambiente la reactividad del hidroxilo o sulfhidrilo está muy acentuada. Habitualmente la colaboración del grupo carboxilo de un ácido aspártico o el imidazol de la histidina permiten una catálisis más efectiva.

APLICACIONES

Como la mayoría de los productos naturales, las enzimas proteolíticas han sido utilizadas en forma empírica durante mucho tiempo por parte de los habitantes de distintos lugares, usualmente en materia de alimentación y de salud. Una prueba de ello es el uso del jugo de ananá (Berger y Asenjo, 1939) y el látex de diferentes especies de higos (Tauber, 1949) como agentes antihelmínticos, aún cuando las enzimas responsables de la acción vermícida (bromelina y ficina, respectivamente) no se utilizan ya con esos fines.

Los nativos de ciertas regiones de Centro y Sudamérica usan tradicionalmente el jugo de papaya para hacer más tiernas las carnes que consumen. Actualmente el tiernizado de la carne se logra incorporando papaína a la superficie de la misma o inyectando profundamente una solución de la enzima. Una mejor distribución se consigue si se la aplica por vía endovenosa a los animales antes de ser faenados, pero en este caso debe tenerse en cuenta que la enzima nativa provocaría un severo "stress" al animal, recurriéndose entonces a enzimas sulfhidríflicas (papaína, bromelina, ficina) inactivadas reversiblemente, las que resultan

luego reactivadas por el potencial reductor que adquieren los músculos del animal luego de su muerte (Kang, 1978).

Es conocido el uso de ciertas enzimas proteolíticas para evitar la formación de turbiedad por enfriamiento ("chill-proofing") de la cerveza, hecho debido a la presencia de proteínas que se hacen insolubles a bajas temperaturas. La hidrólisis no tiene que ser total porque la cerveza debe mantener una cierta cantidad de proteína coloidal, necesaria para que la misma tenga "cuerpo" y produzca espuma abundante y duradera. Papaína, bromelina y pepsina son las proteasas más frecuentemente usadas en este sentido.

Otro proceso industrial importante en el que se emplean enzimas proteolíticas es la manufactura de cueros, ya sea en la etapa previa de depilación de la piel como en la posterior de "batido", cuyo objetivo es preparar el cuero para el teñido y que consiste en la remoción de restos de pelos, glándulas, células epiteliales y tejidos superficiales no separados por los tratamientos previos. En este caso la proteasa más utilizada es pancreatina, pero también se ha ensayado el uso de papaína, tripsina, bromelina y de proteasas bacterianas y fúngicas.

Los hidrolizados ("lisados") de proteínas han sido muy utilizados en la práctica médica como reconstituyentes, a la que esporádicamente retornan cada tanto. Actualmente se acrecienta su aplicación como aditivos alimentarios (Sair, 1974), pero si bien en algunos casos suelen utilizarse enzimas proteolíticas en su preparación, es mucho más común que se recurra a la hidrólisis clorhídrica. Naturalmente que así se destruyen algunos aminoácidos (tirosina y especialmente triptofano), por lo que en los hidrolizados destinados a uso terapéutica o en la elaboración de peptona (triptona) para ensayos microbiológicos se recurre a

la hidrólisis enzimática, comúnmente a cargo de tripsina o de pepsina.

La aplicación terapéutica más común de las proteasas vegetales, especialmente de papaína y de bromelina, está vinculada a su probada acción antiflogística. No obstante no puede dejar de mencionarse su uso en trastornos digestivos, en el tratamiento de lesiones de piel y para desbridar heridas escarificadas.

Ficina, papaína, tripsina y recientemente bromelina son también utilizadas en inmunohematología para la detección de anticuerpos, ya que tanto *in vivo* como *in vitro* son capaces de aglutinar glóbulos rojos cubiertos con anticuerpos incompletos. Bromelina difiere de las otras tres enzimas serológicamente activas por no requerir activación ni pretratamiento de los eritrocitos (Cawley *et al.*, 1964).

II. ENZIMAS PROTEOLITICAS DE PLANTAS SUPERIORES

PAPAINA

La papaína es una de las proteasas sulfhidrílicas separadas del látex de los frutos verdes del "mamón" o "papaya" (*Carica papaya* L., Caricaceae). Fue aislada por primera vez en forma cristalina en 1937 por Balls *et al.*, en tanto que en 1954 Kimmel y Smith hicieron lo propio a partir del látex desecado.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

La actividad de la papaína puede determinarse ya sea midiendo la velocidad de digestión de proteínas o siguiendo la hidrólisis de sustratos sintéticos tales como ésteres o amidas de aminoácidos (Arnon, 1970). Ya que en su estado nativo la papaína presenta muy poca actividad, todos los ensayos se llevan a cabo en presencia de activadores, especialmente cisteína (0,005 M) y EDTA (0,002 M).

El método para determinar la actividad proteolítica (Arnon y Shapira, 1967) se basa en la estimación de los productos de digestión de la caseína. La unidad de actividad enzi-

mática se define como la actividad que produce un aumento de una unidad de absorbancia, medida a 280 nm, por minuto de digestión, mientras que la actividad específica se expresa como el número de unidades de actividad enzimática por miligramo de proteína.

El ensayo más utilizado en el caso de papaína es la medida de su actividad esterásica, habitualmente usado en la estandarización de preparaciones comerciales. Comúnmente se usa el éster etílico de la benzoil arginina (BAEE) como sustrato y el dosaje de los grupos carboxílicos formados se efectúa por titrimetría (Smith y Parker, 1958). La unidad de actividad enzimática se define en este caso como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar un micromol de BAEE por minuto, a 25°C.

Usualmente se suele determinar la capacidad de la papaína para hidrolizar uniones amida. En la estimación de la actividad amidásica se recurre a la benzoil arginina-p-nitroanilida (BAPA) en carácter de sustrato y la p-nitroanilina formada se valora espectrofotométricamente a 410 nm (Arnon, 1965). En este caso la unidad de actividad enzimática se expresa en forma equivalente a la anterior.

PURIFICACION

a. Aislamiento y cristalización

La papaína puede prepararse partiendo tanto del látex fresco como del látex desecado comercial. El método (Kimmel y Smith, 1954) se basa en una precipitación fraccionada con sulfato de amonio y cloruro de sodio.

El extracto crudo se prepara tratando el látex desecado con solución alcalina de cisteína. Luego de filtrar la solución el sobrenadante se lleva a pH 9 y se centrifuga, descartándose el precipitado de proteína desnaturalizada.

El primer paso del fraccionamiento se consigue recogiendo el precipitado formado por agregado de sulfato de amonio al 40% de saturación a la solución sobrenadante obtenida anteriormente. El precipitado se redissuelve en solución de cisteína (pH 7-7,5) y se reprecipita por adición de cloruro de sodio. Este nuevo precipitado se suspende en cisteína de pH 6,5 a temperatura ambiente y se deja toda la noche a 4°C para que cristalice. La recrystalización se consigue disolviendo los cristales en agua destilada y agregando solución saturada de cloruro de sodio, o disolviendo en metanol y añadiendo sulfato o cloruro de litio. Partiendo de 180 g de látex seco se obtienen 45 mg de proteína en el extracto crudo, que se reducen a 2,1 mg de proteína cristalizada (rendimiento: 0,0012 %)

b. Purificación por conversión en mercuripapaína y posterior activación (Brubacher y Bender, 1966)

La papaína cristalizada se suspende en cisteína (pH 4,5), se centrifuga a 10.000 g y se resuspende en cloruro mercúrico 0,01M. Durante una semana se añade etanol de 95% hasta lograr una concentración final del 70%, con lo que se obtiene mercuripapaína cristalina que es soluble en agua y que puede ser almacenada durante varios meses a 2°C sin pérdida apreciable de actividad. La mercuripapaína es reconvertida a papaína activa con solución de 4-metilbencenotiol, compuesto que compleja el mercurio.

El procedimiento indicado tiene dos ventajas: 1) se remueven pequeñas cantidades de impurezas y 2) para conservar papaína durante largos períodos de tiempo es preferible almacenarla como su derivado mercúrico inactivo, que es más estable y no pierde actividad.

PROPIEDADES

a. Estabilidad

La enzima cristalina muestra un alto grado de estabilidad, mientras que en solución pierde del 1 al 2% de su actividad por día, debido probablemente a fenómenos de autólisis y/u oxidación. Es estable a altas temperaturas (puede resistir 3 horas a 100°C) y aún en solución es bastante termoes estable, excepto en condiciones ácidas. La papaína resiste la acción de una serie de agentes desnaturalizantes tales como metanol al 70%, dimetilsulfóxido al 20% y soluciones de urea 8 M; sin embargo es sensible a la acción del ácido tricloroacético al 10 % o del clorhidrato de guanidina 6 M.

b. Activadores e inhibidores

Por tratarse de una enzima sulfhidrúlica, la papaína requiere la presencia de un grupo sulfhidrilo libre para evidenciar su actividad catalítica. En la enzima nativa ese grupo se encontraría bloqueado formando una unión disulfuro o en parte como ácido sulfónico. La activación puede entonces lograrse con agentes reductores tales como cisteína, sulfuro, sulfito o cianuro. En general es necesario contar con un compuesto que posea un grupo tiol como cisteína o tioglicolato y un agente quelante como el EDTA. El BAL (dimercaptopropanol) cumple con ambas funciones, pero en la práctica suele recurrirse a un medio que contenga cisteína 0,005 M y EDTA 0,001 a 0,002 M.

Pueden mencionarse una serie de inhibidores específicos de grupo, como los iones de metales pesados, las clorometilcetonas de fenilalanina y tirosina y reactivos de aldehidos tales como la hidroxilamina y la fenilhidrazina, en-

tre otros. Existen además inhibidores estructurales que son específicos para papaína: el ácido carbobenzoxi-L-glutámico (Z-Glu) se comporta como inhibidor no competitivo a valores de pH de 3,9 a 4,5, mientras que una serie de péptidos que contienen alanina como segundo residuo a partir del C-terminal actúan como inhibidores competitivos porque ocupan el sitio activo de la enzima.

c. Propiedades físicas

El punto isoeléctrico de la papaína es 8,75 (Smith y Kimmel, 1954), mientras que el peso molecular alcanza a 23.000 (Drenth *et al.*, 1968), resultado de la presencia de 212 aminoácidos que conforman una sola cadena peptídica con 3 puentes disulfuro. La molécula es esferoidal, está plegada en dos partes principales y en la unión de las mismas un conjunto de 7 aminoácidos constituirían el sitio activo de la misma (Berger y Schechter, 1970).

d. Propiedades biológicas

La mayoría de las uniones peptídicas son hidrolizadas por la papaína, que es capaz de degradar una mayor cantidad de sustratos y más extensivamente que la tripsina, la pepsina y la quimotripsina, dando lugar en muchos casos a la producción de aminoácidos libres.

QUIMOPAPAÍNA

El látex de *Carica papaya* L. contiene varias enzimas. La papaína es responsable solamente de una parte de la actividad proteolítica total, a la cual también contribuye la quimopapaína. La molécula de quimopapaína es más grande y mucho más estable que la de papaína en medio ácido y también su solubilidad

es mayor en soluciones salinas. Por otra parte las dos son bastante similares en cuanto a especificidad de sustrato y a sus propiedades inmunológicas, pero la secuencia aminoacídica en las cercanías del sulfhidrilo activo es bastante diferente en uno y otro caso, lo cual de todos modos no excluye la posibilidad de semejanza de ambos sitios activos como resultado de una conformación espacial adecuada.

Otras proteasas presentes en el látex en menor proporción son las denominadas "papaya peptidasa A" y "papaya peptidasa B", de peso molecular cercano al de la papaína (24.000) pero con una reactividad menor que la de papaína y quimopapaína (Lynn, 1979).

PURIFICACION

Jansen y Balls (1941) desarrollaron un método para purificar quimopapaína a partir de látex desecado, logrando cristalizar un producto enzimático activo pero no homogéneo. Posteriormente Ebata y Yasunobu (1962) separan la denominada "quimopapaína A" y un tiempo después Kunimitsu y Yasunobu (1967) cristalizan la "quimopapaína B" por el procedimiento que se describe a continuación.

La papaína cruda del comercio se disuelve en agua y se precipita con sulfato de amonio a 45% de saturación, centrifugándose luego a 20.000 g, con lo que la papaína queda en el precipitado, mientras que la solución sobrenadante es llevada a 65% de saturación con sulfato de amonio, precipitando así la quimopapaína. Este precipitado se redisuelve en buffer acetato de pH 5 que contiene EDTA (0,001 M) y se dializa durante toda la noche contra el mismo buffer.

La solución dializada se purifica por pasaje a través de una columna de CM-celulosa, recogiendo la fracción

activa que eluye al agregar buffer acetato 0,7 M (pH 5). Esta fracción se recromatografía sobre Amberlita XE-64 equilibrada con buffer fosfato 0,25 M (pH 5,9), separándose con este eluyente dos fracciones poco activas; al cambiar la concentración del buffer (0,4 M) se separan dos fracciones más, de las cuales la última es más activa y de alto grado de homogeneidad, que cristaliza en forma de cristales aciculares a partir de una solución de pH 2 a la que se le agrega progresivamente cloruro de sodio.

Posteriormente Lynn (1973) describe una técnica de separación más sencilla, basada en el fraccionamiento del látex a través de una columna de agarosa mercurial. La quimopapaína así separada tiene un peso molecular de 33.000 y es homogénea por electroforesis en gel de poliacrilamida. Recientemente se ha desarrollado una técnica (Joshi *et al.*, 1976) que permite la separación de quimopapaína mediante el uso de columnas de Amberlita IR-120 (Hg^{++}).

PROPIEDADES

La quimopapaína B cristalizada, homogénea a través de una serie de ensayos, representa solamente de un 3 a un 5% del extracto crudo inicial. Posee un peso molecular de 35.200, logrado en base al aporte de 318 aminoácidos y su punto isoeléctrico es de 10,4. Propiedades muy similares presenta la quimopapaína A, pero su actividad específica es tres veces menor que la de la anterior.

La quimopapaína se asemeja a la papaína en su capacidad para hidrolizar una amplia gama de péptidos y derivados de aminoácidos, pero la velocidad de hidrólisis de la última es bastante mayor.

El pH óptimo de acción determinado sobre caseína es bastante amplio (pH 7-9), con dos picos en pH 7,2 y 9,5. Cuando se utiliza hemoglobina como sustrato el valor óptimo se alcanza a pH 7. Por el contrario, frente a benzoil-L-argininamida (BAA) el pH óptimo es un "plateau" entre pH 5,5 y 8.

Al igual que papaína, ficina y bromelina, la quimopapaína se comporta como una enzima sulfhidrónica y requiere la presencia de compuestos reductores y metal-quelantes. Los estudios realizados (Tsunoda y Yasunobu, 1966) sugerían que probablemente estaban comprometidos dos grupos sulfhidrilos por molécula de enzima, hecho posteriormente confirmado por Lynn (1973), quien además señala la presencia de una molécula de un aminoazúcar no identificado.

La quimopapaína es muy estable a valores bajos de pH, en especial cuando se almacena a pH 2 y por debajo de 10°C.

FICINA

Recibe este nombre la enzima proteolítica aislada del látex de algunas especies de *Ficus* (Moraceae). Sin embargo el estudio del contenido de ficina en distintas especies del género revela significativas diferencias en cuanto al tenor de actividad proteolítica (Williams *et al.*, 1968; Williams y Whitaker, 1969): de 46 especies de *Ficus* estudiadas sólo 13 muestran valores apreciables de actividad enzimática. El látex de *Ficus stenocarpa* F. Muell. ex Benth. es el de mayor actividad específica, seguido de cerca por los de *F. carica* L. y *F. glabrata* H.B.K. Un total de 26 componentes activos cromatográficamente distinguibles, han sido detectados en 6 especies de *Ficus*.

También se observan variaciones en la activi-

dad del látex separado de variedades diferentes de la misma especie: un examen de 25 variedades de *Ficus carica* permite comprobar que entre los valores extremos la actividad frente a caseína se duplica. Esto se agrava aún más si se considera que existen más de 1.800 especies de *Ficus*, con un considerable número de subespecies y variedades (solamente de *Ficus carica* se mencionan 700 variedades), por lo que la necesidad de precisar el origen del material vegetal no necesita en este caso ser demasiado enfatizada.

PURIFICACION

La ficina es cristalizada por primera vez a partir del látex fresco de higos por Walti (1938), pero a causa de la variabilidad del material se prefiere ahora utilizar látex seco comercial como materia prima.

Se han desarrollado algunos métodos para la purificación preliminar, pero quizás el más conveniente sea el propuesto por Englund *et al.* (1968), ya que la enzima es estabilizada durante la extracción por conversión en un derivado inactivo durante el proceso de purificación. El látex desecado se suspende en tetrionato de sodio (que inactiva reversiblemente la ficina) y EDTA y luego de un tiempo se elimina el precipitado formado. Al sobrenadante se le adiciona cloruro de sodio, se vuelve a centrifugar y ahora el precipitado se retoma con buffer de pH 7,1 conteniendo fosfato y tetrionato de sodio y EDTA. Esta solución, luego de ser dializada toda la noche contra el mismo buffer, puede ser usada directamente para cromatografía. La resolución subsiguiente de los componentes proteolíticamente activos se consigue por cromatografía en CM-celulosa.

Por comparación de los resultados obtenidos en diferentes laboratorios (Englund *et al.*, 1968; Sgarbieri *et al.*,

1964; Liener y Friedenson, 1970) parecería que existen *al menos* tres componentes principales junto a otros componentes menores, todos ellos con actividad enzimática notoria.

Por fraccionamiento del látex de *Ficus glabrata* con cloruro de sodio a 0-50% de saturación, Jones y Glazer (1970) separan cinco componentes electroforéticamente puros, tres de los cuales (ficinas F1, F2 y H) son relativamente más básicos que los otros dos (ficinas B y E). En un trabajo posterior y utilizando otras técnicas de fraccionamiento salino junto a cromatografía en CM-celulosa y gel-filtración en Sephadex G-75, Kortt *et al.* (1974) aíslan tres componentes mayores (ficinas I, II y III) y tres menores (ficinas IV, V y VI) del látex de la misma especie, obteniendo dos de ellas (ficinas II y III) en forma cristalina. El análisis de la composición de aminoácidos de estas últimas revela que la primera es considerablemente más básica (3 residuos de histidina por mol) que la segunda (1 residuo de histidina por mol). En base a estas y otras consideraciones los autores consideran que las ficinas F1, F2 y H de Jones y Glazer (1970) son homólogas de las ficinas V, VI y II, respectivamente, mientras que la ficina III sería equivalente a la ficina E y a la enzima aislada por Englund *et al.*, (1968).

PROPIEDADES

a. Estabilidad

Se ha señalado (Cohen, 1958) que la ficina cristalina mantenida a 50°C durante dos horas tiene un rango de estabilidad máximo entre pH 4,5 y 9,5. Un estudio acerca de la estabilidad de los 10 componentes activos del látex de *Ficus carica* L. CV. Kadota (Liener, 1961) revela que 5 de ellos retienen no menos del 75% de su actividad luego de una hora a

pH 7 y 55°C. Las soluciones de enzima pierden rápidamente su capacidad hidrolítica cuando se almacenan congeladas. La ficina también se inactiva por liofilización, a menos que se parta de una solución 0,01 M de buffer fosfato de pH 7 que contenga cloruro de sodio 0,1 M.

Las condiciones de óptima actividad al usarse distintos sustratos sintéticos se logran en todos los casos a pH 6,5.

b. Propiedades físicas

El peso molecular oscila entre 25.500 y 26.500 y el punto isoeléctrico consignado en unos casos es 9 y en otros mayor a 9,6. La actividad aumenta considerablemente si se agregan agentes quelantes como EDTA, en especial si se usan en conjunción con sustancias reductoras tales como cianuro, cisteína, mercaptoetanol o BAL. En razón de la participación directa de un grupo sulfhidrilo en el mecanismo catalítico, la ficina es inactivada por reactivos tales como el cloruro mercúrico, la N-etilmaleimida (NEM), el ácido monoiodoacético (MIA) y la cloro- o iodoacetamida.

Es poco lo que se conoce sobre la estructura primaria de la ficina, excepto la limitada secuencia de aminoácidos en la vecindad inmediata del grupo sulfhidrilo reactivo. Cuando se la compara con la secuencia equivalente de papaína y de bromelina (Liener y Friedenson, 1970) se advierte un sorprendente paralelismo, lo que podría estar sugiriendo la existencia de un mecanismo de catálisis común a las tres enzimas mencionadas.

El parecido entre las tres proteasas mencionadas no es tan acusado cuando se considera su contenido en carbohidratos. Papaína carece de residuos glucídicos y bromelina

contendría 1,5 a 2% de azúcares, mientras que con respecto a ficina existen opiniones discrepantes, ya que mientras Englund *et al.* (1968) afirman que está desprovista de carbohidratos, Jones y Glazer (1970) denuncian la presencia de 1% de ellos. Ultimamente Friedenson y Liener (1974) parecen haber demostrado que ficina es efectivamente una glucoproteína, a través del análisis de un glucopéptido en el que la fracción glucídica estaría representada por glucosamina, manosa, galactosa, fucosa y xilosa en relación molar 5:2:1:1:1 y que recuerda en muchos aspectos al glucopéptido aislado de bromelina. Casi simultáneamente Sugiura y Sasaki (1974) comunican el aislamiento de una glucoproteína a partir del látex de *Ficus carica* cv. Hōraishi a la que denominaron "ficina-S" y que contiene 4,8% de azúcares, junto a otras cuatro fracciones puramente proteicas (ficinas A, B, C y D).

BROMELINAS

Con el nombre de "bromelina" se conoce desde hace tiempo a la proteasa separada del jugo de los frutos del "ananá" (*Ananas comosus* L., Bromeliaceae). De los tallos de esta especie se aísla posteriormente una proteasa de características bastante diferentes a la anterior, por lo que actualmente correspondería referirse a ellas como "bromelina de frutos" y "bromelina de tallos", considerándolas en forma separada (Murachi, 1970).

BROMELINA DE TALLOS

a. Determinación de la actividad enzimática

Como la mayoría de las enzimas proteolíticas, la bromelina de tallos hidroliza sustratos proteicos y sintéticos. El sustrato proteico utilizado habitualmente es la ca-

seína y el procedimiento a seguir es similar al indicado para papaína y ficina. La actividad esterásica se determina a pH 6 usando BAEE como sustrato, mientras que la actividad amidásica se mide en función de la velocidad de hidrólisis de BAA. Las unidades enzimáticas y las actividades específicas se expresan en la forma habitual.

b. Purificación (Murachi *et al.*, 1964)

Se parte de bromelina comercial, proveniente de la precipitación acetónica del jugo obtenido por expresión de tallos, que se suspende en buffer fosfato de pH 6,1. La suspensión se centrifuga y el sobrenadante se hace atravesar una columna de Duolita A-2 y otra de Amberlita CG-50, Tipo 1, equilibradas con buffer fosfato de pH 6,1. La enzima se desorbe con fosfato dipotásico 0,2 M conteniendo cloruro de potasio 1 M. A la porción media del eluato se le añade sulfato de amonio, se centrifuga y el precipitado se redisuelve en buffer acetato de sodio de pH 5,2, cromatografiándolo en una columna de Sephadex G-100. La fracción eluida que contiene la enzima es entonces llevada a 42% de saturación con sulfato de amonio; el precipitado se elimina por centrifugación y al sobrenadante se le añade más sulfato de amonio hasta 50% de saturación, con lo que precipita la bromelina, que es redisuelta en agua y dializada durante 48 horas.

c. Propiedades

La enzima conserva plenamente su capacidad de digerir a la caseína luego de 24 horas a 5°C, dentro de un rango de pH de 4 a 10. Es asimismo estable durante 20 minutos a 25°C en metanol al 25%, pero su actividad caseinolítica se reduce en una tercera parte al cabo del mismo tiempo en etanol

al 20% a 37°C. Si se mantiene también durante 20 minutos una solución acuosa a 55°C y pH 6,1 la actividad se reduce a la mitad. La liofilización de la enzima provoca una disminución de la actividad enzimática en un 27%.

La bromelina de tallos es una proteína básica, con un peso molecular de 33.000, consecuencia de la unión de 285 aminoácidos (Murachi *et al.*, 1964). Otros investigadores (Ota *et al.*, 1964) aumentan los valores a 35.730 y 321, respectivamente. De todos modos la enzima es más básica y alrededor de una vez y media más grande que la molécula de papaína. El punto isoeléctrico está ubicado a pH 9,55.

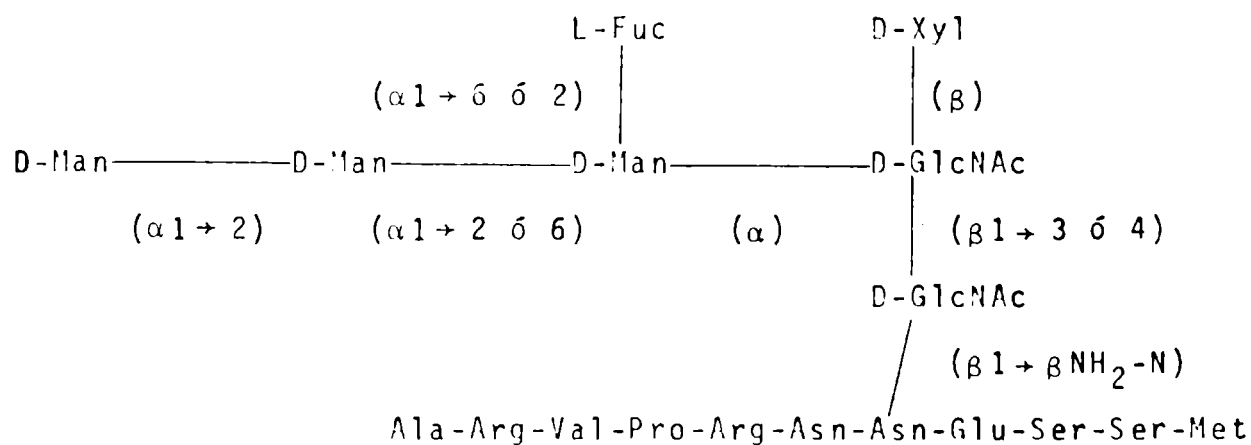
Con el advenimiento de técnicas más modernas para determinar la homogeneidad de los productos biológicos se ha demostrado que en bromelina de tallos existen varios componentes. Así, por enfoque isoeléctrico Minami *et al.* (1971) comprueban la presencia de un componente principal de carácter básico (pI 9,45) acompañado de una fracción menor de naturaleza ácida (pI 4,7). Posteriormente Ota *et al.* (1972) separan un componente mayor que representa el 77% de la enzima y tiene un peso molecular de 28.000, junto a cinco componentes menores, que en algún caso parecen provenir de un proceso de autodigestión intracelular de la enzima.

Takahashi *et al.* (1973) consiguen separar dos componentes, a los que denominan SB₁ y SB₂, de similar peso molecular, idéntica composición de carbohidratos y parecida actividad enzimática tanto frente a caseína como ante sustratos sintéticos, existiendo ligeras diferencias en la composición de aminoácidos.

Para evitar los errores provenientes de la aparición de productos de autodigestión, Lynn (1977) inhibe

previamente la bromelina en forma de derivado mercurial y separa un total de cuatro componentes, dos de los cuales (que representan la mayor parte de la enzima) tienen un peso molecular de 28.000, igual composición de carbohidratos y parecerían corresponder a las fracciones SB₁ y SB₂ de Takahashi *et al.* (1973).

La enzima es una glucoproteína en la que la porción glucídica está unida covalentemente a la cadena peptídica principal. Por digestión con nepsina se ha obtenido un glucopéptido para el que se ha propuesto la siguiente estructura (Yasuda *et al.*, 1970):



La bromelina de tallos tiene un solo grupo sulfhidrilo por molécula (Murachi y Yasui, 1965), que es esencial para su actividad catalítica. En ausencia de activadores la enzima exhibe sólo el 60-70% de su actividad frente a caseína. Como en las otras enzimas sulfhidrúlicas, la cisteína, el 2-mercaptoetanol y el ditiotreitól (DTT, 1,4-dimercapto-2,3-butanodiol) son activadores efectivos y en menor medida también lo es el cianuro de potasio. Los inhibidores son los corrientes para este tipo de enzimas.

BROMELINA DE FRUTOS

a. Determinación de la actividad enzimática

Los procedimientos son los mismos que se han mencionado al considerar bromelina de tallos, con la única excepción que en este caso la cantidad de enzima requerida es menor (Ota *et al.*, 1964). No se ha comunicado ensayo alguno sobre la posible actividad esterásica de la bromelina separada de frutos.

b. Purificación

Se parte del jugo (pH 3,2-3,5) obtenido por expresión de frutos frescos, maduros o no, que es enfriado a 0-4°C y al que se le añade un volumen de acetona fría. El precipitado se descarta y al sobrenadante se le agregan dos volúmenes más de acetona fría, con lo que la enzima precipita, debiendo ser desecada al vacío y pulverizada en un mortero. El polvo acetónico se retoma con buffer citrato de pH 6, se centrifuga y el sobrenadante se pasa a través de una columna de DEAE-celulosa equilibrada con buffer acetato, con lo que se obtienen varias fracciones de alta actividad proteolítica.

La producción de enzima cruda desecada por litro de jugo es de 3,3 a 3,7 gramos. Luego de la cromatografía en columna se obtiene un producto que representa del 32% (frutos maduros) al 43% (frutos verdes) del contenido inicial de proteínas y que conserva el 87-88% de actividad.

c. Propiedades

A diferencia de la que se obtiene de los tallos, la bromelina de frutos es una proteína ácida y parece ser homogénea por recromatografía y la electroforesis en acetato de celulosa. Sin embargo también está asociada a una frac-

ción glucídica de la que no ha podido ser separada. La bromelina de frutos es asimismo mucho más activa frente a BAA que la bromelina de tallos.

De todos modos y al igual que lo ocurrido en bromelina de tallos, la aparente homogeneidad de la bromelina de frutos ha sido cuestionada ahora por Ota *et al.* (1972), quienes separaron tres componentes de la misma, uno de los cuales, de peso molecular 18.000, constituye casi el 90% del total y es esencialmente similar a uno de los componentes separados de la bromelina de tallo por los mismos autores.

Recientemente (Yamada *et al.*, 1976) se ha consignado la separación de una nueva proteasa denominada "bromelina de frutos FA₂", de peso molecular 31.000 y pI 4,6 que es bastante similar a su homóloga de tallos, pero que a diferencia de ésta no es una glucoproteína.

PINGÜININA

La pingüinina es una enzima proteolítica presente en los frutos de *Bromelia pinguin* L. (Bromeliaceae), planta tropical muy abundante en las Antillas, donde se la conoce con el nombre vulgar de "maya".

La proteasa es separada por primera vez por Asenjo y Fernández (1942) por precipitación acetónica, pero no muy bien caracterizada. Con posterioridad Messing *et al.* (1960) aíslan la enzima del jugo fresco por fraccionamiento etanólico y dan a conocer algunas propiedades de la preparación obtenida. En un trabajo siguiente, Messing (1960) constata la presencia de dos componentes a los que denomina "pingüininas A y B", con distintos valores de punto isoeléctrico y pH óptimo y un comportamiento diferente frente al agregado de sulfato de amonio y a la presencia de iones magnesio.

Toro-Goyco y Matos (1964, 1966) logran un avance en el procedimiento de purificación y cristalización con el uso de la gel-filtración por Sephadex G-100. Los resultados experimentales indican la presencia de dos macromoléculas, de las cuales una sola tiene actividad proteolítica, confirmando luego por electroforesis sobre papel y ultracentrifugación que los frutos de *Bromelia pinguin* contienen un solo componente enzimáticamente activo.

En un trabajo posterior, Toro-Goyco *et al.* (1968) consiguen aislar y purificar la enzima sin el uso de reactivos orgánicos, para lo cual proceden a centrifugar a altas velocidades el jugo de los frutos, precipitando las impurezas por el agregado de álcalis y sometiendo el sobrenadante a gel-filtración a través de Sephadex G-100. El rendimiento obtenido es de 1,3 mg de enzima por 100 ml de jugo, recuperándose totalmente la actividad enzimática presente en el mismo. La enzima así obtenida es homogénea por electroforesis en papel, ultracentrifugación, gel-filtración y cromatografía de intercambio iónico.

La activación por agentes tales como tioglicolato, mercaptoetanol y BAL, así como la fuerte inhibición ejercida por p-hidroximercuribenzoato (PHMB) y NEM confirman que la enzima requiere la presencia de grupos sulfhidrilo para expresar su actividad.

Pingüinina tiene una temperatura óptima de 65°C, es muy estable a la desnaturalización por calor y muestra un pH óptimo en la zona ácida (pH 3,8 - 4,0). Los pesos moleculares difieren de acuerdo al pH al que fueron determinados: a pH 7,3 es de 19.200 y a pH 4,6 aumenta a 25.400. La enzima se inactiva a pH 7,3 y su actividad aumenta con la disminución del pH, existiendo en consecuencia la posibilidad de que la proteasa ac-

tiva sea un dímero y que el valor de peso molecular más alto represente un equilibrio dinámico monomérico-dimérico.

Aún cuando pingüinina y bromelina de tallos han sido aisladas a partir de especies pertenecientes a la misma familia (Bromeliaceae), muestran propiedades bastante diferentes. Pingüinina tiene un máximo de actividad proteolítica a pH 3,8-4 y bromelina a pH 6, mientras que el pI es de 6,5 para pingüinina y de 9,5 para bromelina. La especificidad de sustrato de pingüinina es, por el contrario, similar al de papaína por su afinidad hacia los péptidos en los cuales el átomo de nitrógeno es aportado por aminoácidos aromáticos. La composición en aminoácidos de estas dos últimas proteasas exhibe además un marcado parecido, donde la diferencia más significativa está representada por la ausencia de metionina en papaína y la presencia de cuatro residuos por mol en pingüinina. El contenido en hidratos de carbono es similar al de bromelina (1,7 a 1,9% de su peso total), pero aún queda por demostrar que pingüinina sea una glucoproteína. Al igual que en bromelina, la liofilización ejerce un marcado efecto sobre la estructura y actividad de la enzima.

OTRAS PROTEASAS DEL GENERO BROMELIA

A partir del jugo obtenido por expresión de los frutos de cuatro plantas mexicanas pertenecientes al género *Bromelia* (*B. hemispherica* Lam., *B. karatas* L., *B. palmeri* Mez y *B. sylvestris* Willd. ex Sims.), Cruz *et al.* (1974) aíslan cuatro proteínas sulfhidríficas de similares características enzimáticas, a las que denominan respectivamente "hemisfericina", "karatasina", "palmerina" y "silvestrisina".

El procedimiento de extracción de las enzimas se inicia con la expresión de los frutos para obtener un zumo que puede conservarse congelado casi indefinidamente sin pérdida apre-

ciable de actividad. La purificación consiste en homogeneizar dos volúmenes de jugo con uno de una solución 0,1 M de cloruro de sodio y 0,25 M de sacarosa, centrifugando luego en frío a 100.000 g. El sobrenadante se hace atravesar una columna de Sephadex G-75, eluyendo con una solución fosfatada de pH 7, con lo que en todos los casos se consigue separar tres componentes, de los cuales el que eluye en segundo término es el proteolíticamente activo, que recromatografiado y liofilizado se comporta como un componente único y homogéneo.

Los pesos moleculares de las cuatro enzimas, determinados en base a la concentración de grupos tioles, oscilan entre 22.500 y 24.800. La actividad proteolítica es similar, aún cuando la actividad esterolítica es mayor en hemisfericina y palmerina que en karatasina y silvestrisina. No obstante, la actividad de estas enzimas es notoriamente superior a las de pingüinina y bromelinas.

Un resultado sorprendente se observa al aplicar la técnica del enfoque isoeléctrico a las enzimas purificadas y aparentemente homogéneas, ya que se obtiene un número variable (de 7 en palmerina a 11 en silvestrisina) de componentes activos, comprendidos entre un rango de valores de pH entre 3,4 y 10,4. Resta aún dilucidar si las formas múltiples de cada enzima son verdaderas isoenzimas, es decir moléculas semejantes en las que se han producido sustituciones en la secuencia aminoacídica, o si por el contrario hay una única forma molecular que ha sufrido autólisis, aún cuando la evidencia experimental indica que en ese caso el proceso debería haber ocurrido durante la maduración del fruto (Garduño *et al.*, 1974).

ACTINIDINA

El conocimiento de que el agregado de frutos frescos de "Yang-tao" o "grosella china" (*Actinidia chinensis* Planch., Dilleniaceae) a las jaleas impedía su gelificación (hecho presuntamente debido a la presencia de enzimas proteolíticas) lleva a Arcus (1950) al aislamiento de una proteasa sulfhidrúlica a la que denomina "actinidina". La enzima es capaz de degradar la hemoglobina aún más rápidamente que la gelatina y en menor medida es activa contra peptona y leche pasteurizada. La máxima actividad se logra a pH 4-4,3.

Varios años más tarde McDowall (1970) consigue cristalizar la enzima, que se asemeja a papaína por su acción sobre BAEE (pH óptimo 5-7, Km 89 mM), siendo capaz de hidrolizar el 15-20% de los enlaces peptídicos de la gelatina. Su peso molecular (Sephadex G-50) es de 12.800 ± 700 y el pH de mínima solubilidad (pI) es 3,1. Por electroforesis en gel de poliacrilamida se advierte la presencia de dos bandas aniónicas, tanto a pH 5 como 8,3. Posteriormente Baker (1973) obtiene cristales suficientemente puros como para ser estudiados por difracción con rayos X, consiguiendo además que la enzima presenta un comportamiento anómalo por gel-filtración, ya que el peso molecular es el doble (26.000) cuando se determina por técnicas de ultracentrifugación. Ultimamente el mismo autor (Baker, 1980) ha conseguido determinar la estructura de la proteína, que presenta una notable similitud con papaína (la correspondencia asciende al 48% de los residuos aminoacídicos).

AGAVINA

A partir de un polvo acetónico que representa el extracto crudo de hojas de "sisal" (*Agave sisalana* (Engelm.) Perr., Amaryllidaceae), Tipton (1964a) separa siete fracciones proteicas por cromatografía en DEAE-celulosa y gel-filtración sobre

Sephadex G-100, de las cuales cinco (B, C, D, E y F) son proteolíticamente activas frente a caseína y cuatro (B, C, E y F) frente a BAA, pero sus actividades específicas, pH óptimos y pesos moleculares difieren considerablemente entre sí. Ninguno de los componentes parece depender de la presencia de grupos sulfhidrilos para manifestar su actividad. Los componentes C, D, E y F son inhibidos por agentes quelantes como la *o*-fenantrolina, cianuro, EDTA o BAL, sugiriendo que probablemente está involucrado un metal en la actividad proteolítica, mientras que la inhibición por diisopropilfluorofosfato (DFP) implicaría el requerimiento de una serina activa.

Purificando el extracto crudo por fraccionamiento etanólico, precipitación con sulfato de amonio y gel-filtración por Sephadex G-100 se logra separar una entidad enzimática cristalizable de acetona fría (Tipton, 1964b) que es indistinguible de la fracción F obtenida anteriormente. La enzima tiene un pH óptimo 7-8 (BAA), un peso molecular de 52.500 (gel-filtración) y para designarla se propone el nombre trivial "agavina".

En estudios posteriores (Tipton, 1965) se confirma que agavina es una metaloproteína que requiere la presencia de al menos un residuo serina en el sitio activo. El metal unido a la proteasa es el hierro, que en la enzima nativa está en forma ferrosa y en relación de un átomo gramo por 66.000 g de enzima.

Ultimamente (du Toit *et al.*, 1978) se ha conseguido aislar una aminopeptidasa de las hojas de "pita" (*Agave americana* L.) por fraccionamiento con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio (DEAE-Sephadex) y gel-filtración (Sephadex G-200). La homogeneidad de la enzima, de peso molecular 86.500, es confirmada por electroforesis, enfoque isoeléctrico, gel-filtración y ultracentrifugación. El punto isoeléctrico de la proteasa purificada es 4,53 y contiene un 1,25% de hidratos de carbono,

pareciendo no requerir iones metálicos para su activación. El análisis de la composición aminoacídica revela que glicina, junto a ácido aspártico y ácido glutámico representan la tercera parte de la molécula, en la que lisina es el residuo C-terminal y leucina o isoleucina el N-terminal.

La aminopeptidasa en cuestión desarrolla una franca actividad frente a diversos sustratos (du Toit y Schabort, 1978), en los que tanto aminoácidos alifáticos como aromáticos o básicos representen el extremo N-terminal. Por otra parte la enzima carece de actividad endopeptidásica o de cualquier otro tipo de actividad proteolítica.

ASCLEPINA

Winnik *et al.* (1940) son los primeros en aplicar la denominación "asclepina" para designar a una proteasa separada del látex que fluye de los pecíolos de un "vencetósigo" (*Asclepias speciosa* Torr., Asclepiadaceae). En un trabajo paralelo, Greenberg y Winnik (1940) afirman haber aislado una segunda proteasa a partir del látex de *Asclepias mexicana* Cav., proponiendo las denominaciones "asclepina s" y "asclepina m" para la primera y la segunda, respectivamente. Se trata en ambos casos de proteasas sulfhidrúlicas del tipo de la papaína o de la bromelina. Algo más tarde Carpenter y Lovelace (1943) determinan el punto isoeléctrico (3,11) de una proteasa a la que se refieren como "asclepina" y que suponen igual a la obtenida de *A. speciosa*, aunque en realidad la obtienen de un macerado de raíces en lugar de hojas y de una especie diferente, *A. syriaca* L.

Fue necesario que transcurrieran más de treinta años para que la asclepina volviera a requerir la atención de los investigadores: Brockbank y Lynn, en 1979, separan dos grupos de proteasas a partir del látex de tallos de *A. syriaca* L., por

aplicación de cromatografía de afinidad órganomercurial-agarosa. Cada una de las fracciones enzimáticas (A y B) se resuelve en cinco componentes por cromatografía en CM-Sepharose CL-6B, de los cuales eligen dos (A_3 y B_5) para someterlos a purificación y posterior caracterización. Ambos componentes son representantes de dos grupos de enzimas claramente diferentes: los valores de los pesos moleculares son 21.000 (B_5) y 23.000 (A_3), los pH óptimos frente a caseína son 7-7,5 (B_5) y 7,5-8,5 (A_3) y la composición de aminoácidos es distinta, aún cuando en ambos el extremo N-terminal es leucina. Las propiedades de A_3 y B_5 son de todos modos comparables con las de otros miembros del grupo de proteasas sulfhidríficas, así como la presencia de múltiples formas enzimáticas es también común cuando el látex es el material de donde proceden (c.f. papaína, quimopapaína y ficina).

Recientemente (Lynn *et al.*, 1980) los mismos investigadores han analizado cada uno de los cinco componentes que integran tanto la asclepina A como la asclepina B, demostrando que los miembros de cada grupo están estrechamente relacionados entre sí, difiriendo unos de otros sólo en algunos residuos aminoacídicos. Sin embargo el grupo de componentes de la asclepina A es distinto al de la asclepina B tanto en la cantidad de residuos de aminoácidos ácidos como básicos y neutros. No hay, empero, grandes diferencias en el contenido de residuos aromáticos, pero mientras que los miembros de la serie A contienen dos residuos de metionina por molécula, los de la serie B contienen uno solo.

CALOTROPINA

Atal y Sethi (1962) denominan "calotropina" a una proteasa presente en el látex de *Calotropis procera* Dry (Asclepiadaceae) en una proporción del 2-3%. En realidad se tra-

ta de una mezcla de cinco proteínas, una de las cuales representa el 80-90% del peso total. Los autores afirman que es proteolíticamente más activa que papaína, ficina o bromelina y que es capaz de digerir carne, gelatina y caseína y de coagular la leche (pH óptimo 5,5; temperatura óptima 80°C).

Con el mismo nombre ya en 1958 Bose y Madhavakrishna habían designado a una proteasa sulfhidrúlica aislada del látex del "madar" (*Calotropis gigantea* R.Br.), a la que posteriormente (Madhavakrishna y Bose, 1960) consiguieron cristalizar y determinar su composición aminoacídica. Más recientemente Abraham y Joshi (1979a) aíslan dos proteinasas del látex de la misma especie, estando ambas unidas a una fracción glucídica. El látex fresco se mezcla con buffer fosfato de pH 7 y el sobrenadante que resulta se precipita con acetona, con lo que la fracción hidrocarbonada se reduce en un 80%. Por cromatografía sobre CM-Sephadex C-50 consiguen separar dos fracciones con actividad proteolítica, a las que denominan "calotropina FI" y "calotropina FII", homogéneas por recromatografía en CM-Sephadex C-50, gel-filtración en Sephadex G-100 y electroforesis en gel de poliacrilamida. Ambas proteasas son similares en ciertos aspectos, tales como la temperatura óptima (65-70°C), la estabilidad térmica (15 minutos a 60-65°C sin pérdida apreciable de actividad) y los valores de pH óptimos ante hemoglobina (pH 4,3 y 8,1 para ambas enzimas). Sin embargo la actividad específica es menor en calotropina-FI, quien a su vez contiene mayor proporción de carbohidratos (4%). También difieren en el residuo N-terminal y en el pH óptimo para hidrolizar caseína.

Dado que los valores de los pesos moleculares (Abraham y Joshi, 1979b) obtenidos por gel-filtración y electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio (SDS)-poliacrilamida son bastante coincidentes (25.700 y 27.230 para calotropina-FI y

24.550 y 23.300 para calotropina-FII, respectivamente) es lícito suponer que ambas enzimas están constituídas por una única cadena polipeptídica. El ensayo de distintos activadores e inhibidores comprueba que se trata de enzimas sulfhidrúlicas pero que además poseen un segundo sitio activo, representado posiblemente por histidina. La composición aminoacídica de las dos proteasas es muy similar y recuerda bastante a la de papaína. La actividad amidásica, esterásica y caseinolítica de calotropina-FII es mayor que la de calotropina-FI, pero esta última exhibe una mayor actividad coagulante de la leche. En tal sentido calotropina-FII se parece a papaína, en tanto que calotropina-FI se asemeja a quimopapaína.

Ultimamente y también a partir del látex de *C. gigantea*, Pal y Sinha (1980) consiguen separar y cristalizar otras dos proteasas sulfhidrúlicas a las que denominan "calotropina-DI" y "calotropina-DII". Para ello el látex se mezcla con un volumen igual de una solución 1 mM de EDTA y 10 mM de tetraciónato de sodio, se enfría y centrifuga y el sobrenadante se precipita con sulfato de amonio y se redisuelve en buffer fosfato de pH 7. Cuando este extracto crudo se pasa a través de una columna de CM-celulosa resultan 4 fracciones con actividad enzimática, de las cuales una de ellas (fracción D) representa el 60% del total. Esta fracción se resuelve en dos componentes activos (calotropinas DI y DII) por cromatografía en SP-Sephadex C-50, que pueden cristalizarse por enfriamiento de una solución buffer de fosfatos de pH 7,5 que contiene además EDTA y tetraciónato de sodio.

Las dos proteínas cristalizadas son homogéneas tanto por cromatografía de intercambio como por electroforesis en gel de poliacrilamida o SDS-poliacrilamida y sedimentación en ultracentrífuga. Los pesos moleculares son semejantes: 23.800 para calotropina-DI y 24.200 para calotropina-DII. Su composición

aminoacídica es similar y al igual que papaína no están asociadas a una fracción glucídica. Frente a azoalbúmina las condiciones óptimas de acción se logran a pH 7,5-8 y 55°C. La actividad caseinolítica es un tercio de las de ficina y papaína, pero a diferencia de éstas no son activas frente a BAEE, BAPA, BAA, *p*-tosil-L-arginina metil éster (TAME) y carbobenzoxiglicina-*p*-nitrofenil éster.

EDESTINASA

La edestina, proteína de reserva del "cáñamo" (*Cannabis sativa* L., Cannabinaceae), se encuentra formando parte del cristaloides de los granos de aleurona, partículas subcelulares del tejido de reserva de la semilla (St. Angelo *et al.*, 1968). En un intento de aislar la enzima responsable de la hidrólisis de la edestina durante la germinación, St. Angelo *et al.* (1969a) consiguen separar una proteinasa ácida localizada en los propios granos de aleurona, que alcanza su máxima actividad a pH 3,2 con hemoglobina como sustrato y a pH 4,3 con su sustrato natural, la edestina. La enzima tiene una temperatura óptima de 53°C, pero resiste temperaturas de hasta 75°C.

La proteasa es purificada 25 veces por fraccionamiento con sulfato de amonio (St. Angelo *et al.*, 1969b) y aparece homogénea por ultracentrifugación, con un peso molecular de 20.000. No obstante, el análisis electroforético en gel de poli-acrilamida revela la presencia de al menos 3 componentes. Los autores proponen el nombre de "edestinasas" para denominar a esta enzima proteolítica, desatendiendo la sugerencia de Greenberg y Winnik (1940) de agregar el sufijo "ina" al nombre del género o del epíteto específico de la especie de la cual ha sido aislada la enzima.

La edestinasas no es activa por encima de pH 6 y es inhibida por concentraciones de sustrato (hemoglobina) supe-

riores a 0,24 mM. Por otra parte, la enzima no es activada por el agregado de cisteína o EDTA ni es inhibida por acetato mercúrico o NEM, por lo que no se trata de una proteasa sulfhidrífica. Tampoco pertenece al "tipo serínico", ya que el agregado de DFP no altera su actividad. El ácido fenilpirúvico, inhibidor de proteasas ácidas como pepsina o catepsina B, no ejerce efecto sobre ella. Todas estas características hacen que la edestinasa resulte semejante a la catepsina D, que pertenece a un grupo de proteasas ácidas intracelulares alojadas en los lisosomas de las células del cuerpo de los mamíferos, hecho que brinda franco apoyo a la idea de considerar a los granos de aleurona de las células vegetales análogos a los lisosomas de las células animales, por lo que la edestinasa equivaldría entonces, en cuanto a localización y función, a una hidrolasa lisosómica (St. Angelo *et al.*, 1970).

EUFORBINA

Con este nombre Ellis y Lennox (1942) designan a una proteasa sulfhidrífica separada del látex de *Euphorbia lathyris* L. (Euphorbiaceae) por precipitación acetónica del mismo. Los autores señalan que la nueva proteasa es tan activa como la papaína y la tripsina comerciales. La enzima tiene un pH óptimo de 6 y es capaz de degradar caseína, ovalbúmina y hemoglobina desnaturalizada. Casi al mismo tiempo Castañeda-Agulló *et al.* (1943) describen con el mismo nombre a una proteasa aislada del látex de una especie del mismo género, *Euphorbia cerifera* Alcocer. También se trata aquí de una tiol-proteinasa, ya que es activada por cisteína y cianuro e inactivada por peróxido de hidrógeno.

La ausencia de trabajos posteriores impide en este caso conocer el grado de similitud que pudiera existir entre ambas preparaciones enzimáticas.

HURINA

Cuando se separa la corteza de los tallos o se cortan las raíces de *Hura crepitans* L. (Euphorbiaceae), conocida en Venezuela como "jabillo", exuda un líquido marrón, turbio y cáustico. Por centrifugación de este exudado y agregado de acetona al sobrenadante, Jaffé (1943a) consigue separar una proteasa a la que denomina "hurina", capaz de digerir gelatina y peptona y de coagular la leche. El punto isoeléctrico de la enzima se halla dentro del rango de pH 4 a 5 y su actividad es máxima en medio alcalino, no resultando activada por el agregado de cisteína pero sí fuertemente inhibida por la incorporación de iodo, nitrato de plata o cloruro mercúrico.

La hurina también es capaz de degradar albúmina de huevo y sustratos sintéticos tales como la benzoil-L-arginina metil éster (BAME), donde la actividad hidrolítica se ve fuertemente incrementada por adición de hierro al estado ferroso (Seidl y Gaede, 1961). El efecto del ion ferroso parece ser específico, pues los iones calcio, magnesio, manganeso y férrico no ejercen ninguna acción, en tanto que cinc, cadmio y níquel inhiben la acción proteolítica. El hierro forma un complejo reversible con la enzima, del cual aquél puede ser desplazado tanto por iones inhibidores de su acción (cinc) como por complejantes (EDTA).

MEXICAINA

Con este nombre se designó a una proteinasa aislada y posteriormente cristalizada (Castañeda-Agulló *et al.*, 1945) del látex de los frutos del "cuaguayote" (*Pileus mexicanus* I.M. Johnston), árbol que crece en estado silvestre en las regiones subtropicales de México y que pertenece a la misma familia (Caricaceae) que la especie productora de papaína.

Para extraer la enzima (Soriano *et al.*, 1975) se parte del látex fresco, al que se le adiciona cloruro de sodio 0,1 M. Luego de centrifugar a 10.000 g, el sobrenadante es sometido a gel-filtración sobre Sephadex G-75, con lo que se obtienen dos fracciones, la primera de las cuales retiene la actividad proteolítica y cuyo pI es 9,12. Una posterior purificación se logra por cromatografía de intercambio iónico sobre CM-celulosa, consiguiendo de esta forma una actividad específica 5 veces superior a la del látex desecado. La enzima es homogénea, de peso molecular 31.100, siendo lisina el aminoácido N-terminal y alanina el C-terminal, careciendo de metionina.

La posibilidad de que la mexicana participe en reacciones reversibles de asociación ya había sido postulada al determinar el peso molecular de la misma por dosaje de grupos tioles (Cruz *et al.*, 1974), donde la diferencia entre los valores obtenidos fue atribuida al promedio de una cierta proporción de monómeros y dímeros, hecho luego confirmado por gel-filtración; entre pH 3,8 y 8 el grado de asociación está aparentemente limitado a la formación de dímeros (Ramírez *et al.*, 1976).

El pH óptimo de acción enzimática de la mexicana frente a caseína es de 8,5 a 9, aumentando la actividad al doble en presencia de cisteína, lo que confirma su condición de enzima de tipo sulfhidrílico (Inei-Shizukawa *et al.*, 1976). También se ha efectuado un detallado estudio en relación al efecto que ejercen el pH, la temperatura y los agentes reductores en la estabilidad de la enzima (Romero Castilla *et al.*, 1976).

POMIFERINA

A partir de los frutos verdes de la "naranja osage" ("osage orange"), un arbusto muy difundido en el oeste de

los Estados Unidos de Norteamérica (*Maclura pomifera* Schneid., Moraceae), Tauber y Laufer (1949) separan una proteasa no sulfhidrúlica a la que denominan "pomiferina". La enzima se extrae tanto del látex como del jugo de los frutos verdes. En el primer caso el látex es extraído con cloroformo para eliminar gomas y luego desecado (rendimiento: 0,08% con respecto a los frutos verdes). Por su parte el jugo se trata con dos volúmenes de etanol de 95% y el precipitado obtenido se seca al vacío y a temperatura ambiente (rendimiento: 2,14% con relación al jugo). La enzima es activa entre pH 4,32 y 8,45 y su pH óptimo frente a gelatina es 6,45. Es menos activa que papaína y no es inhibida por el sulfito de sodio.

SOLANINA

En 1940 Greenberg y Winnik comunican la separación de una proteasa presente en los frutos de *Solanum elaeagnifolium* Cav. (Solanaceae), a la que denominan "solanina"^{*}. La enzima se extrae macerando los frutos en una solución diluída de fosfatos de pH 7,5 y precipitando luego el sobrenadante que resulta de la centrifugación del extractivo con sulfato de amonio. El pre-

* En el trabajo mencionado los autores recomiendan el uso de la terminación "ain" agregada al nombre de la especie para designar a las proteasas vegetales. Es necesario señalar que en la presente revisión se ha adoptado el criterio de convertir la terminación "ain" del nombre inglés en el sufijo "ina" al traducirlo al castellano. La adopción de la terminación "ina" en lugar de "aína" es materia opinable y pueden esgrimirse argumentos consistentes tanto a favor como en contra de una u otra alternativa. De todos modos y al haberse optado por la primera de ellas, el vocablo inglés *solanain* escogido por los autores para designar a la proteasa aislada de *Solanum elaeagnifolium* debe traducirse *solanina*, aún a sabiendas de la confusión a la que puede dar lugar con el alcaloide homónimo. En todo caso y atendiendo a la prioridad que le corresponde al alcaloide por haber sido aislado (y así denominado) con anterioridad, quizás convendría utilizar la designación *solanina-proteasa* u otra equivalente para evitar posibles equívocos.

cipitado que se obtiene se redisuelve en agua y se reprecipita con 4 volúmenes de acetona (rendimiento: 0,8 g de enzima por 100 g de frutos frescos). Se trata de una enzima no sulfhidrónica que actúa frente a caseína, hemoglobina y ovalbúmina a pH óptimo 8,5 y que resulta estable por calentamiento a 75°C durante 51 minutos.

TABERNEMONTANINA

Del jugo obtenido por expresión de los frutos de *Tabernaemontana grandiflora* Jacq. (Apocynaceae), un arbusto que crece en Venezuela, Jaffé (1943b) informa haber separado por precipitación acetónica una tiol-proteasa diez veces más activa que la papaína cruda y con un pH óptimo 5-6, determinado sobre gelatina. El autor consigna asimismo que el jugo recogido durante el mes de abril es activado tanto por cisteína como por cianuro, pero que no ocurre lo propio si es recolectado en julio, hecho que atribuye a la presencia hipotética de un activador de aparición estacional.

PROTEASAS DE CEREALES

ARROZ

Recientemente se ha detectado la presencia de actividad proteásica en hojas de "arroz" (*Oryza sativa* L. cv. Ratna), manifestada a través de la capacidad para hidrolizar hemoglobina y en menor medida seroalbúmina bovina. La actividad es mayor cuando la enzima es extraída y ensayada con buffer tris-malato de pH 7 que cuando se hace lo propio con buffer fosfato o citrato de pH 7. La preparación enzimática exhibe una marcada dependencia con respecto a los grupos sulfhidrilos, sin los cuales no es activa. Las condiciones óptimas se obtienen a pH 7 y 40°C. La actividad específica en hojas separadas de la planta aumenta a medida que

progresa la senescencia de la misma, al mismo tiempo que disminuye el contenido en proteínas totales (Kar y Mishra, 1977).

Doi *et al.* (1980a) han conseguido separar 3 carboxipeptidasas de semillas y plántulas de *Oryza sativa* L. cv. Nihonbare, todas activas sobre carbobenzoxi-L-fenilalanina-L-alanina (Z-Phe-Ala). Una de ellas (pH óptimo 4,5) se encuentra principalmente en semillas en dormancia y en el endosperma de semillas germinadas, la segunda (pH óptimo 5,5) no está presente en semillas, aparece durante la germinación y predomina en las hojas de la planta madura, mientras que la última (pH óptimo 7) es detectada únicamente en raicillas y talluelos de plantas jóvenes.

La carboxipeptidasa de semillas es luego purificada por cromatografía en CM-Sephadex y gel-filtración. Tiene un peso molecular de 110.000 pero por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida aparecen dos subunidades de pesos moleculares 35.000 y 21.000. La enzima es inhibida por DFP a pH 7 y es muy estable en el rango de pH 2,5 a 8,5 (Doi *et al.*, 1980b).

AVENA

La senescencia de las hojas de "avena" se evidencia a través de una pérdida de clorofila y de proteínas, acompañada en este último caso por un incremento proporcional del contenido de aminoácidos libres, hecho que está evidentemente relacionado con la presencia y actividad de enzimas proteolíticas.

Mediante un laborioso proceso de extracción y purificación que incluye una combinación de técnicas tales como precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de afinidad sobre hemoglobina-Sepharose y de intercambio iónico sobre DEAE-Sephadex, Drivdahl y Thimann (1977) consiguen separar dos proteasas de las hojas senescentes de *Avena sativa* L. cv, Victory, así como pequeñas cantidades de una tercera enzima de pH óptimo 3,5.

El peso molecular de las dos principales proteasas es cercano a 76.000 y ambas resultan sorprendentemente estables ante condiciones térmicas exigentes, siendo su temperatura óptima de 50°C. Se trata sin embargo de dos proteasas diferentes, una de ellas neutra (pH óptimo 6,6) y aparentemente de tipo sulfhidrílico (la concentración óptima de mercaptoetanol es 10 mM) y la otra ácida (pH óptimo 4,2); en este caso la actividad disminuye notablemente con concentraciones de mercaptoetanol superiores a 1 mM.

Estudios posteriores (Drivdahl y Thimann, 1978) demuestran que la proteasa ácida es inhibida por fluoruro de fenilmetilsulfonilo pero no por iodoacetamida, en tanto que la proteasa neutra es inhibida por ambos. Estos resultados, junto con el comportamiento observado frente al mercaptoetanol, sugerirían que la enzima neutra es efectivamente una proteasa sulfhidrítica y que en cambio la enzima ácida pertenece al tipo serínico.

Las dos proteasas degradan una serie de sustratos proteicos, pero su velocidad de digestión es diferente: la proteasa ácida (que es una endopeptidasa) es más activa frente a hemoglobina, en tanto que la proteasa básica presenta mayor actividad frente a seroalbúmina bovina, gelatina, caseína y azocoll y la caracterización de sus productos de digestión indican que se trata de una exopeptidasa.

CEBADA

Hace algunos años Burger y Siegelman (1966) comprobaron la presencia de actividad BAPA-ásica en la capa aleuronífera de cariopses de "cebada" (*Hordeum vulgare* L.) y de un inhibidor de la misma en tejidos embrionarios y en plántulas. Posteriormente Burger *et al.* (1968) caracterizan dos peptidasas a

partir de granos germinados: una de ellas "cebada-peptidasa A" se muestra activa frente a BAPA, es poco resistente al calor y a valores bajos de pH, requiere concentraciones relativamente altas de calcio y de magnesio y tiene baja especificidad de sustrato; la otra ("cebada-peptidasa B") tiene acción sobre BAEE, es inactivada a valores altos de pH, es más resistente al tratamiento térmico que la anterior, no requiere iones metálicos para su activación y presenta una mayor especificidad de sustrato. Sin embargo ninguna de las dos hidroliza proteínas, por lo que no parecerían responsables de la hidrólisis de las proteínas del endosperma durante la germinación.

Una electroforesis posterior en gel de poli-acrilamida permite purificar la cebada-peptidasa A, que además muestra actividad frente a BAEE. Asimismo se revisa la especificidad de sustrato de la misma, observando que es mayor cuando el grupo carboxilo es aportado por un aminoácido aromático y el grupo amino por lisina (Moeller *et al.*, 1969). Se señala asimismo la presencia de otras enzimas, entre las cuales hay una con actividad sobre acetato de α -naftilo (ANA), para la que se propone la designación de "cebada-peptidasa C" (Burger *et al.*, 1970).

En granos de cebada germinados, Mikola y Kolehmainen (1972) mencionan la existencia de al menos 8 diferentes peptidasas: 3 carboxipeptidasas, 3 aminopeptidasas que actúan sobre L-aminoacil- β -naftilamidas y dos peptidasas que hidrolizan uniones Ala-Gli y Leu-Tir. De ellas, dos carboxipeptidasas han sido estudiadas con mayor detalle: una fue separada por cromatografía sobre Sephadex G-100 y CM-celulosa, no muestra actividad endopeptidásica ni dipeptidásica, es estable en un rango de pH de 3 a 6 en buffer succinato y la cisteína actúa como estabilizador de la actividad enzimática (Moeller *et al.*, 1970); la otra tiene un pH óptimo de 5,2 y carece de actividad sobre di o tripéptidos, es inactivada

por DFP y en base a su actividad sobre BAEE y al valor de Km se considera idéntica a la cebada-peptidasa B antes citada (Mikola y Pietilä, 1972). Asimismo, de las tres aminopeptidasas se purificó una de ellas (Kolehmainen y Mikola, 1971), con pH óptimos para la hidrólisis de L-aminoacil- β -naftilamidas y dipéptidos de 7,2 y 5,8 a 6,5, respectivamente. La actividad de la enzima, de peso molecular 65.000, aumenta con los reactivos sulfhidrúlicos, no es afectada por DFP ni EDTA y es inhibida por el p-cloromercu-ribenzoato (PCMB).

El endosperma del grano de cebada contiene alrededor de los dos tercios de las proteínas de reserva del mismo y el pH interno durante la germinación es de 5 a 5,2, un valor al cual las carboxipeptidasas son muy activas. Ya que estas enzimas están presentes en altas concentraciones en este tejido, es probable que jueguen un rol central en la movilización de las proteínas de reserva durante la germinación.

CENTENO

Las semillas de "centeno" (*Secale cereale* L.) contienen una enzima proteolítica capaz de hidrolizar BAPA (Dunaevsky y Belozersky, 1974). La enzima fue purificada 140 veces por fraccionamiento por DEAE-Sephadex A-50, sulfato de amonio, gel-filtración por Sephadex G-75 y diálisis frente a agua destilada. La proteinasa es homogénea por ultracentrifugación y electroforesis en gel de poliacrilamida y es inhibida totalmente por DFP, por lo que aparentemente se trata de una hidrolasa serínica. Estudios posteriores (Dunaevsky y Belozersky, 1980) comprobaron que la enzima es sintetizada *de novo* durante el curso de la germinación.

MAIZ

Los cereales contienen en sus granos un grupo

de proteínas de reserva (prolaminas) que se caracterizan por su naturaleza hidrofóbica y cuyos representantes más conocidos son la gliadina del trigo, la hordeína de la cebada y la zeína del maíz. El contenido en proteínas de reserva disminuye rápidamente durante la germinación del grano, proceso en el cual están obviamente involucradas proteasas específicas.

Harvey y Oaks (1974) señalan la presencia de enzimas proteolíticas en el endosperma de "maíz" (*Zea mays* L.), determinando que la preparación enzimática tiene un pH óptimo de 3,8 y una temperatura óptima de 46°C frente a hemoglobina, consiguiendo que se trata de endopeptidasas capaces además de degradar gliadina, edestina, seroalbúmina bovina y en forma parcial zeína y glutelina.

La degradación de zeína es investigada específicamente por Fujimaki *et al.* (1977) en relación con la actividad proteásica, que se incrementa notablemente durante la germinación del grano de maíz. El extracto crudo obtenido muestra un máximo de actividad a pH 3 frente a caseína y a pH 4,5 frente a zeína. Dado que la adición de 2-mercaptoetanol incrementa sensiblemente la capacidad hidrolítica, los autores presumen que las proteasas responsables son de tipo sulfhidrílico.

Continuando el trabajo anterior, Abe *et al.* (1977) logran purificar la enzima por medio de precipitación fraccionada con sulfato de amonio, cromatografías sobre CM- y DEAE-celulosa, gel-filtración con Sephadex G-100 y electroforesis en gel de poliacrilamida. La proteasa purificada tiene un peso molecular de 21.000 y un pI de 2,3 o menor, mientras que el pH óptimo usando hemoglobina desnaturalizada como sustrato es cercano a 3. No obstante ello la enzima no es, de acuerdo a la clasificación inicialmente propuesta (c.f. pág. 1), una proteinasa ácida, ya que no es inhibida por el diazo-acetil-DL-norleucina metil éster (DAN-0-

Ne). Tampoco es una proteasa serínica por ser insensible al DFP ni una metaloproteinasa porque tanto el EDTA como los iones metálicos ejercen sólo un ligero efecto sobre la actividad. Por el contrario, el agregado de compuestos con grupos tioles y de reactivos sulfhidrúlicos aportan una evidencia contundente de que se trata de una proteasa sulfhidrúlica, a pesar de la marcada acidez que requieren las condiciones óptimas de acción.

Un estudio posterior (Abe *et al.*, 1978) sobre la especificidad de sustrato de esta proteasa sulfhidrúlica permite determinar que la enzima hidroliza preferentemente los enlaces peptídicos adyacentes al grupo carboxilo de aminoácidos aromáticos, luego de lo cual las carboxipeptidasas atacarían las fracciones peptídicas formadas para liberar definitivamente aminoácidos aromáticos al medio, hecho que explicaría la temprana aparición de este tipo de aminoácidos durante las primeras etapas de la germinación (Fujimaki *et al.*, 1977). Este comportamiento abre un nuevo interrogante en cuanto a la clasificación de la enzima, ya que a pesar de ser de tipo sulfhidrúlico se asemeja por su especificidad de sustrato a pepsina, que como ya vimos constituye el "modelo" de proteasa ácida.

A título confirmatorio de las experiencias anteriores, los mismos autores (Abe *et al.*, 1980) aíslan del endosperma del grano un par de sustancias inhibitoras de la acción proteásica, de pesos moleculares 9.500 y 13.000, cuya especificidad inhibitoria es remarcable sobre proteasas sulfhidrúlicas como papaína, bromelina y ficina. Naturalmente que ello obligó a estudiar la relación entre actividad proteolítica y actividad inhibitoria durante la germinación del grano, comprobando que la última decrece rápidamente a medida que la primera aumenta. El hecho parece indicar que los inhibidores de proteasas impiden la degradación de las proteínas de reserva durante la dormancia de los

granos, regulando así la actividad proteolítica, la que sólo se pone de manifiesto cuando se dan las condiciones propias de la germinación.

La actividad proteolítica de extractos de hojas de maíz también ha sido estudiada. Por homogeneización en frío con buffer fosfato de pH 6,2 seguida de centrifugación a 2.500 rpm y ulterior diálisis frente a agua destilada, Klein y Harpaz (1965) obtienen una preparación con actividad proteolítica y esterolítica, medidas frente a caseína y carbobenzoxi-L-tirosina-*p*-nitrofenil éster, respectivamente. El extractivo crudo se purifica por pasaje a través de DEAE-celulosa aplicando un gradiente lineal de cloruro de sodio en buffer fosfato 0,01 M de pH 6,2, con lo que ambas actividades específicas (proteolítica y esterolítica) se incrementan 5 veces. Las condiciones óptimas de acción se consiguen a pH 6-6,4 y a 40-45°C y aparentemente un grupo sulfhidrilo estaría involucrado en la expresión de la actividad enzimática.

TRIGO

Prentice *et al.* (1968) demostraron que en los granos de "trigo" (*Triticum aestivum* L.) germinados se encuentran hidrolasas peptídicas similares a las descritas en granos de cebada. Al efectuar la comparación de las enzimas de trigo con estas últimas en cuanto a su estabilidad térmica, pH óptimos, estabilidad a diferentes valores de pH, constantes cinéticas y efecto de iones metálicos, pudo comprobarse que los granos de trigo contienen una peptidasa neutra muy similar a la cebada-peptidasa B. Del mismo modo y luego de una extensa purificación de la fracción que contiene las hidrolasas ácidas pudo establecerse que en granos de trigo existen dos entidades enzimáticas distintas: una de ellas similar a la cebada-peptidasa A y una segunda peptidasa ácida que es mucho más resistente a la acidez y a la desnaturalización por

calor. El pH óptimo de acción de esta última es aproximadamente pH 7, no hidroliza la hemoglobina ni la caseína y frente a una variedad de péptidos simples revela poseer un grado de especificidad bajo (Prentice *et al.*, 1969).

Posteriormente Preston y Kruger (1976) logran purificar dos enzimas proteolíticas de granos germinados, ambas con actividad carboxipeptidásica. Son capaces de liberar rápidamente aminoácidos de hemoglobina y de gluten e hidrolizan la carbobenzoil-fenilalanina (Z-Phe), son inhibidas por DFP pero no son afectadas por sales, EDTA ni bajas concentraciones de reactivos sulfhidrúlicos. Los pesos moleculares aproximados de las mismas son 55.000 y 61.000.

Con respecto a la actividad proteolítica en hojas, recientemente Frith *et al.* (1978) consiguen purificar tres proteinasas por cromatografía de afinidad sobre hemoglobina-Sepharose 4B que habían sido previamente aisladas en DEAE-celulosa. Los mismos autores (Peoples *et al.*, 1979) informan haber separado seis hidrolasas peptídicas con acción sobre ribulosa-1,5-difosfatocarboxilasa, que además son capaces de degradar hemoglobina.

PROTEASAS DE CUCURBITACEAS

CALABAZA BLANCA

Hace varios años Deb-Sarma (1942) consiguió extraer y caracterizar parcialmente una enzima proteolítica del sarcocarpo (mesocarpo carnoso) de la "calabaza blanca" ("white gourd"), nombre trivial de la especie monotípica *Benincasa cerifera* Savi, observando que las condiciones óptimas de acción frente a gelatina como sustrato se logran a pH 8,6 y a 60°C y que la enzima no es afectada por la presencia de cianuro, sulfuro de hidrógeno, glutatión o ácido ascórbico, por lo que no se trataría de una proteasa sulfhidrúlica.

Aplicando un procedimiento de extracción y purificación similar al utilizado para extraer la proteasa de *Cucumis melo*, Kaneda y Tominaga (1977) completan aquella primera información, al determinar que la enzima tiene un peso molecular de 50.000, con un pH óptimo de 9,2 frente a caseína y una temperatura óptima de 70°C. La enzima no es afectada por la adición de reactivos sulfhidrúlicos ni por metales y sí lo es por DFP, confirmando que se trata de una proteinasa serínica de propiedades notablemente semejantes a las de la enzima de melón.

MELON

En 1975 Kaneda y Tominaga purifican una proteinasa presente en el sarcocarpo de una variedad de "melón" muy cultivada en Japón, *Cucumis melo* L. cv. Prince, que proviene de la hibridación de *C. melo* L. cv. Makuwa Makino x *C. melo* L. var. *reticulatus* Naud. Para obtener la enzima utilizan un tratamiento con fibras de CM-celulosa, seguido de una precipitación fraccionada con sulfato de amonio, cromatografía sobre CM-celulosa y gel-filtración con Sephadex G-75. La preparación enzimática obtenida se presenta homogénea por electroforesis en gel de poliacrilamida, el peso molecular se estima en 50.000 y el análisis de aminoácidos indica la presencia de 475 residuos y de al menos 7 moles de hexosa.

Utilizando caseína como sustrato se puede establecer que el máximo de actividad se localiza en la región alcalina (pH 9-11) y que la temperatura óptima es de 70°C (determinada a pH 7,1). La enzima es inhibida por DFP pero no es afectada por compuestos tales como cisteína y mercaptoetanol, por lo que se trataría de una proteinasa serínica.

Frente a la cadena B-insulínica reducida y carboximetilada muestra una destacada especificidad de sustrato,

ya que desdobra preferentemente las uniones peptídicas en las que el grupo carboxilo es aportado por un aminoácido ácido, especificidad confirmada a través de la hidrólisis de péptidos sintéticos. La liberación de alanina y de lisina desde el extremo C-terminal de la cadena B-insulínica sugiere además la presencia de una carboxipeptidasa en la preparación enzimática de melón.

ZAPALLO

Mediante un complejo sistema de extracción y purificación que incluye tratamientos con sulfato de protamina y cromatografía en Sephadex G-50 y DEAE-celulosa, Ashton y Dahmen (1967a) consiguen separar dos aminopeptidasas similares de los cotiledones de *Cucurbita máxima* Duch. cv. Hubbard, con similar especificidad. Frente a L-leucinamida el pH óptimo es 7, mientras que la actividad aumenta linealmente de 25°C a 45°C, llegando a triplicarse dentro de ese rango. Ambas aminopeptidasas son activadas por iones magnesio y manganeso e inhibidas por EDTA, sulfato de amonio y cloruro de sodio en elevada concentración. La preparación enzimática así obtenida, con un grado de purificación de 110 veces en relación al extracto crudo, muestra dos picos por ultracentrifugación y también dos bandas por electroforesis en gel de poli-acrilamida, revelando la existencia de dos enzimas de estrecha similitud, situación que no logra resolverse por aplicación de gradientes lineares y no lineares de cloruro de sodio sobre DEAE-celulosa ni por gel-filtración a través de Sephadex G-100 o G-200 ni Biogel P-100 o P-200. Por otra parte se comprueba la existencia de una tercera aminopeptidasa que es separada durante el proceso de purificación.

La inclusión de una etapa de precipitación acetónica permite a los autores (Ashton y Dahmen, 1967b) purificar 1962 veces una de las dos aminopeptidasas de la mezcla no resuelta

en la experiencia anterior. La enzima resulta ser una dipeptidasa, estable hasta 85°C y con un rango de pH óptimo de 8 a 8,5.

Finalmente Ashton y Dahmen (1968) consiguen aislar la tercera peptidasa antes mencionada, que a diferencia de la anterior no es activa frente a dipéptidos y resulta inactivada por el agregado de magnesio, cobalto, cinc, EDTA y cisteína. Tiene un pH óptimo de 8 frente a glicil-glicil-glicina y es estable durante cinco minutos a 45°C.

PROTEASAS DE LEGUMINOSAS

ARVEJAS

A partir de una variedad de "arveja" muy cultivada en Australia (*Pisum sativum* L. cv. Greenfeast), Elleman (1974) ha conseguido separar dos aminopeptidasas y una prolina-aminopeptidasa. Las enzimas se extraen a pH 7,5 con una solución de EDTA 2 mM, se someten a fraccionamiento con sulfato de amonio y se separan por CM- y DEAE-celulosa. Las tres son capaces de hidrolizar uniones peptídicas de L-aminoacil- β -naftilamidas. Las dos aminopeptidasas (AP1 y AP2) han sido purificadas y parcialmente caracterizadas; tienen pesos moleculares de 58.000 (AP1) y 74.000 (AP2), considerablemente menores que los que habitualmente muestran las de origen animal, de las cuales difieren además por no ser metalopeptidasas. Una de ellas (AP1) exhibe una alta especificidad de sustrato, ya que hidroliza únicamente enlaces en los que el grupo carboxilo es aportado por un aminoácido con residuo hidrofóbico, recordando en este sentido a la aminopeptidasa de cebada separada por Kolehmainen y Mikola (1971).

Dos años más tarde y del mismo material vegetal Caldwell y Sparrow (1976) consiguen separar mediante un intenso proceso de purificación con DEAE-celulosa dos hidrolasas, ambas activas frente a BAPA. Las propiedades de ambas enzimas son prác-

ticamente las mismas: tienen un peso molecular de 65.000 y un pH óptimo cercano a 7 y sus constantes de velocidad difieren sólo mínimamente. No hidrolizan caseína pero son activas frente a pequeños péptidos que contengan aminoácidos básicos en el extremo carboxílico de la cadena. Las evidencias recogidas durante el ensayo con varios inhibidores parecerían indicar que se trata de enzimas de tipo serínico.

Mediante una cuidadosa investigación sobre la actividad aminopeptidásica de extractos de arvejas, los mismos autores (Caldwell y Sparrow, 1980) separan una aminopeptidasa de alto peso molecular (alrededor de 500.000) con alta especificidad para péptidos en los que el residuo N-terminal es ácido glutámico o ácido aspártico. Utilizando como sustrato glutaril-fenilalanina-*p*-nitroanilida (GrPPA) comprueban que la reacción transcurre en dos etapas: 1) GrPPa \rightarrow ácido glutámico + fenilalanina-*p*-nitroanilida y 2) fenilalanina-*p*-nitroanilida \rightarrow fenilalanina + *p*-nitroanilida, siendo la segunda de ellas catalizada por la aminopeptidasa AP2 de Elleman (1974) y la primera por la nueva aminopeptidasa aislada, para la que proponen la denominación AP3, que al igual que las otras dos aminopeptidasas de arvejas parece ser de tipo sulfhidrílico.

MANI

De las semillas no germinadas de "maní" (*Arachis hypogaea* L.) Cameron y Mazelis (1971) consiguen aislar una peptidasa que denominan "araquina" y a la que logran purificar 325 veces a partir de un extracto seco acetónico. La enzima presenta una banda principal y de una a tres bandas secundarias menores cuando se examina por electroforesis sobre gel de poliacrilamida. No actúa sobre caseína, dimetil-caseína ni seroalbúmina bovina, pero hidroliza los sustratos sintéticos BAPA (K_m 10 mM, pH óptimo 8,1) y BAEE (K_m 110 mM, pH óptimo 7,5).

Algo más tarde Mainguy *et al.* (1972) separan del extracto de cotiledones de plántulas de 6 días de germinación una enzima con actividad BAPA-ásica, a la que purifican por tratamiento con sulfato de amonio, ajuste de pH y cromatografía de intercambio aniónico. El peso molecular es de 60.000 (Sephadex G-200) y las condiciones óptimas de actividad se logran dentro de un rango de temperaturas de 25°C a 36°C, a pH 7,4. Las experiencias con sustancias inhibidoras indican que en el sitio activo de la enzima no hay grupos sulfhidrilos, pero por ser inactivada por DFP podría tratarse de una peptidasa serínica.

MUNG

El "mung" o "poroto mung de la India" corresponde a la especie *Phaseolus aureus* Roxb., para la que se acepta también la sinonimia *Phaseolus radiatus* L. (Burkart, 1952). Por ser *Phaseolus* un género muy afín a *Vigna*, no es de extrañar el uso de una nueva combinación para el "mung", de acuerdo con lo que establecen las reglas de nomenclatura botánica: *Vigna radiata* (L.) Wilczek, que resultaría sinónimo de las anteriores.

A partir de semillas de *Phaseolus aureus*, Chu (1963) extrae una proteasa que luego de ser purificada por fraccionamiento con sulfato de amonio y precipitación acetónica incrementa 35 veces su actividad. La enzima es capaz de degradar BAA (pH óptimo 5,2-6,5) y hemoglobina (pH óptimo 4,5), es inhibida por el DFP y no es afectada por cisteína, iodoacetamida o EDTA, debiendo incluírsele entonces dentro de las proteasas serínicas.

Recientemente Baumgartner y Chrispeels (1977) comunican haber aislado una endopeptidasa de cotiledones de *Vigna radiata*, de peso molecular 23.000, pI 3,75 y de naturaleza sulfhidrónica. La enzima es especialmente apta para la degradación de vicilina, que constituye el principal reservorio proteico del mung.

POROTOS

Como consecuencia de la necesidad de confirmar resultados obtenidos al investigar los residuos C-terminales de virus aislados de "porotos" (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Prince), Wells aísla en 1965 una enzima proteolítica de plántulas de esta especie. El extracto enzimático se obtiene macerando la planta y practicando un fraccionamiento con sulfato de amonio sobre el líquido de expresión. La enzima se purifica luego por cromatografía sobre DEAE-celulosa, demostrando tener una actividad carboxipeptidásica definida, dando negativos los tests para metaloproteasas y proteasas sulfhidríticas.

La presencia de otras entidades enzimáticas que acompañan a la carboxipeptidasa parcialmente purificada es confirmada en un trabajo posterior (Wells, 1968), en el que a partir de las hojas se aíslan tres enzimas con actividad sobre caseína a pH 6. Por pasaje a través de DEAE-celulosa se separa una de ellas (proteínasa "a"), pero la mezcla de las otras dos requiere el uso de gel-filtración sobre Sephadex G-75. Una de ellas (proteínasa "b") tiene un peso molecular de 45.000, mientras que la segunda, de peso molecular 120.000, es la única con actividad carboxipeptidásica comprobada, proponiéndose denominarla "faseolina".

La velocidad de liberación de los residuos C-terminales de los sustratos susceptibles a la acción de la faseolina depende en parte de la calidad del residuo C-terminal, pero más aún de la naturaleza del penúltimo aminoácido, que en caso de tratarse de un aminoácido aromático provoca un notorio aumento de la actividad carboxipeptidásica (Carey y Wells, 1972).

Utilizando DFP³², que inhibe la actividad de la faseolina, se demuestra que el sitio de reacción está representado por un único residuo de serina y que la secuencia de aminoácidos adyacentes al sitio activo es Glu-Ser-Tir. Esta secuencia

es diferente a la de otras enzimas del mismo tipo, confirmándose asimismo que faseolina es una típica carboxipeptidasa serínica (Shaw y Wells, 1972).

También a partir de hojas de la misma especie, Racusen y Foote (1970) aíslan una endopeptidasa activa sobre caseína y hemoglobina, con un rango de pH óptimo entre pH 9 y 10, un pI de 8,8 y un peso molecular de alrededor de 100.000, lo que descarta una similitud con la proteinasa "b" de Wells.

De las semillas de otra variedad cultígena (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Perlicka) se ha conseguido también aislar una proteasa sulfhidrúlica de bajo peso molecular (26.000 a 31.500), cuyo aminoácido C-terminal es isoleucina (Vavreinova y Turkova, 1975).

SOJA

Laufer *et al.* (1944) son los primeros en demostrar la presencia de un sistema proteásico en granos de "soja" (*Glycine max* (L.) Merrill), para el que proponen el nombre de "soyira", determinando que las proteasas no son extraíbles con agua pero sí con mezclas acuosas de glicerol al 30-50% y que el pH óptimo de acción sobre caseína es pH 7.

Posteriormente Ofelt *et al.* (1955) postulan que la fracción enzimática está unida en el grano a algún componente insoluble y que sometiendo la harina dispersa en agua a vibraciones ultrasónicas o a un tratamiento mecánico de extracción se consigue un extracto acuoso activo que no es afectado por la presencia de una serie de agentes oxidantes y reductores entre los que se encuentra la cisteína, por lo que sorprende su afirmación posterior de que las proteasas presentes en harina de soja son de "tipo papaína". El pH óptimo de acción sobre caseína es algo menor (pH 4-6) al consignado por los primeros autores.

Weil *et al.* (1966) confirman estos últimos valores (pH óptimo 5,5 con caseína como sustrato), determinando además que las condiciones óptimas se logran a 50°C, si bien la enzima es estable durante 30 minutos a temperaturas que no excedan los 40°C. Comprueban en este caso un ligero aumento sobre la actividad al incorporar cisteína, así como el efecto inhibitorio del iodoacetato y la carencia de acción del cianuro sobre la actividad proteásica, hechos que parecerían dar algún sustento a la idea de clasificarla como una proteasa sulfhidrúlica. Por cromatografía sobre DEAE-celulosa y usando un gradiente de elución con buffer acetato consiguen separar 6 fracciones activas que en conjunto representan el 78% de la proteína, lo que significa un incremento de 95 veces la actividad inicial. Las propiedades de cada una de las fracciones es investigada a continuación (Pinsky y Grossman, 1969), comprobando que los valores de pH óptimo varían dentro de un rango estrecho (pH 5-5,4), que son ligeramente inferiores a los del extracto crudo (pH 5,5). No obstante los valores de K_m frente a poli-L-glutámico muestran mayores diferencias (de 50 a 333 mM), en tanto que el comportamiento frente a varios sustratos sintéticos es sustancialmente distinto.

Algunos años después Katsimpoilas *et al.* (1971), partiendo de un extracto seco acetónico obtienen una "fracción proteica soluble de pH 4,5" que contiene una proteasa capaz de hidrolizar BAPA y L-aminoacil- β -naftilamidas. La enzima es purificada por enfoque isoeléctrico y su pI es 4,8. La máxima actividad frente a BAPA se manifiesta a pH 8,2-8,5 y es ligeramente activada por iones calcio y magnesio. Recientemente (Dumitru, 1973) se ha informado el aislamiento de una L-argininamida hidrolasa cristalizada a partir de una solución etanólica y con un peso molecular de 138.000.

VEZA

Las enzimas proteolíticas de la "arvejilla" o "veza común" (*Vicia sativa* L.) han recibido preferente atención de parte de investigadores rusos. En 1973 Koroleva *et al.* estudian la correlación entre el pH y la actividad proteásica en cotiledones, determinando que en los granos de aleurona existe actividad manifiesta, con máximos a pH 3,8 y 7,2 y que en la fracción citoplasmática los valores óptimos se hallan a pH 4,8 y 5,8.

Zemchik *et al.* (1973) purifican un extractivo de semillas por cromatografía sobre hidroxapatita, DEAE-celulosa y Sephadex G-100, con lo que la actividad inicial sobre BAPA aumenta 950 veces. La peptidasa parcialmente purificada presenta una actividad máxima a pH 8, tiene un peso molecular de 70.000 y es de tipo sulfhidrílico. La preparación contiene otra enzima que hidroliza fenilalanina-*p*-nitroanilida (PPA) y su especificidad de sustrato es semejante a la de las peptidasas de soja y de cebada. La BAPA-asa presente tanto en cotiledones como en plántulas parece ser la misma (Zemchik *et al.*, 1973). Estudios posteriores (Zemchik *et al.*, 1975) han comprobado que la enzima tiene estructura cuaternaria y que está compuesta de cuatro subunidades de idéntico peso molecular.

CARBOXIPEPTIDASA DE ALGODON

Interesados en determinar los mecanismos reguladores del desarrollo y maduración de los cotiledones de semillas de algodón durante la embriogénesis y la germinación, Ihle y Dure (1972a) constatan la aparición de actividad proteolítica a las 24 horas de iniciada la germinación, que aumenta hasta el cuarto día y luego disminuye progresivamente. Dado que no hay división celular en los tejidos cotiledonarios durante ese lapso, concluyen que la proteasa se sintetiza *de novo* durante la germinación, si bien

el mRNA responsable de su síntesis ya habría sido transcripto durante la embriogénesis.

Para extraer la enzima se hacen germinar semillas de "algodón" (*Gossypium hirsutum* L. cv. Coker 413, Malvaceae) y se retiran los cotiledones a los cuatro días, que son desengrasados y extraídos luego con buffer fosfato de pH 6,6. De esta forma se obtiene el extracto crudo, que puede purificarse 2.000 veces por fraccionamiento con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio sobre DEAE-celulosa, diálisis y gel-filtración por Sephadex G-150.

La proteasa extraída resulta ser una carboxipeptidasa con actividad esterásica, de peso molecular aproximado 85.000 y que por electroforesis en gel de poliacrilamida evidencia estar compuesta de tres subunidades polipeptídicas no idénticas, de pesos moleculares 24.000, 31.000 y 33.000. Es capaz de hidrolizar BAEE y otros varios sustratos estéricos, polipéptidos pequeños y proteínas desnaturalizadas y parece carecer de especificidad en cuanto al aminoácido C-terminal de la cadena peptídica, ya que incluso prolina puede ser hidrolizada.

Tanto la actividad esterásica como la carboxipeptidásica son inhibidas por DFP, indicando que la enzima emplea un mecanismo hidrolítico "tipo serina". Se requieren dos moléculas de DFP por mol de enzima y si se incorpora DFP radioactivo se comprueba que son dos las cadenas afectadas, confirmando la existencia de dos sitios activos en cadenas separadas. La digestión de la enzima produce un sólo péptido con radioactividad, indicando que la secuencia de aminoácidos alrededor de ambos sitios activos es la misma (Ihle y Dure, 1972b).

CARBOXIPEPTIDASA DE FRUTOS CITRICOS

En 1973 Kubota *et al.* aíslan del exocarpo de *Citrus natsudaidai* Hayata (Rutaceae) una carboxipeptidasa a la que denominan "carboxipeptidasa C_N" y que es capaz de liberar aminoácidos neutros, ácidos, básicos e incluso prolina del extremo C-terminal de dipéptidos N-sustituídos. La enzima posee una débil actividad esterásica pero carece de actividad aminopeptidásica o endopeptidásica. Tiene un pH óptimo de 5,5 sobre carbobenzoxi-L-glutámico-L-fenilalanina (Z-Glu-Phe), es fuertemente inhibida por DFP y el cloruro mercúrico pero no por otros iones metálicos, EDTA, *o*-fenantrolina, NEM, DTT ni MIA. El PCMB ejerce una ligera activación a pH 7. La enzima es homogénea por electroforesis en gel de poliacrilamida y ultracentrifugación y tiene un peso molecular estimado en 93.000.

CARBOXIPEPTIDASA DE TOMATE

Por remoción de las hojas inferiores de plantas de "tomate" (*Lycopersicum esculentum* Mill., Solanaceae), Walker-Simmons y Ryan (1980) consiguen incrementar tres veces el contenido normal en carboxipeptidasa de las hojas superiores. La enzima se purifica por precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de afinidad y gel-filtración y es homogénea tanto por electroforesis a pH 4,3 como por enfoque isoeléctrico. El punto isoeléctrico es 5,2 y el peso molecular 105.000.

Además de la actividad carboxipeptidásica, evidenciada a través de la hidrólisis secuencial del extremo C-terminal de la cadena B de la insulina, la enzima posee también actividad esterásica (pH óptimo 6-7) y peptidásica (pH óptimo 8). La enzima es inhibida por DFP e incorpora una mol de DFP-(H³) por mol de enzima, lo que revela la presencia de un único residuo de seri-

na en el centro activo. La actividad peptidásica y la esterásica son fuertemente inhibidas por el cloruro mercúrico pero no por PHMB o iodoacetamida.

ENDOPEPTIDASA DE LOTO

A partir de semillas de "loto" (*Nelumbo nucifera* Gaertn., Nymphaeaceae) Shinano *et al.* (1966) obtienen un extracto crudo con actividad proteolítica por fraccionamiento de los extractivos con sulfato de amonio y posterior tratamiento con fosfato ácido de calcio. El extracto crudo es capaz de hidrolizar caseína (pH óptimo 2,5) y hemoglobina (pH óptimo 3,5) y es muy termolábil (la actividad original disminuye al 17% al cabo de diez minutos a 50°C y al 11% a 60°C en el mismo lapso). Por cromatografía en CM-celulosa y gel-filtración con Sephadex G-100 se logra aumentar 278 veces la actividad inicial, pero de todos modos la preparación no es homogénea.

Por tratamiento ácido, seguido de fraccionamiento con sulfato de amonio, precipitación alcohólica, cromatografía en DEAE-celulosa y gel-filtración sobre Sephadex G-100, Shinano y Fukushima (1969) logran purificar 870 veces la enzima, que ahora resulta homogénea por electroforesis y ultracentrifugación. Se trata de una proteasa ácida, activa frente a caseína y hemoglobina, en tanto que otras proteínas tales como edestina, zeína y las globulinas de la propia semilla de loto son sólo débilmente hidrolizadas. Las condiciones de máxima estabilidad se logran a pH 4, por debajo de 40°C. No es una enzima sulfhidrónica y su actividad es completamente inhibida por el permanganato de potasio, marcadamente inhibida por dodecilsulfato de sodio (SDS) y acelerada por el peróxido de hidrógeno.

Los valores estimados para el peso molecular por el método de sedimentación-difusión y Sephadex G-100 fueron

de 36.800 y de 35.500, respectivamente y el punto isoeléctrico se encuentra dentro del rango de pH 3-4. La acción inhibitoria del permanganato de potasio y la acetilación revelan que el residuo tirosina juega un papel importante en la actividad enzimática (Shinano y Fukushima, 1971).

ENDOPEPTIDASA DE TABACO

A partir de hojas senescentes de "tabaco" (*Nicotiana tabacum* L., Solanaceae), Hochkeppel (1973) consigue separar una endopeptidasa que hidroliza uniones peptídicas entre residuos aminoacídicos hidrófobos. Se trata de una molécula pequeña, de peso molecular 9.000 a 10.000, cuyas condiciones óptimas de acción se logran a pH 5 y 40°C. La enzima es homogénea por electroforesis en gel de poliacrilamida y es capaz de degradar el 30% de las proteínas presentes en el sistema lamelar. Las hojas aún verdes, por el contrario, muestran actividad proteolítica escasa o nula.

PROTEASA ACIDA DE SORGO

Por extracción acetónica y posterior purificación del extracto crudo por medio de fraccionamiento con sulfato de amonio y cromatografía en DEAE-celulosa, Garg y Virupaksha (1970a) logran cristalizar una proteasa presente en cotiledones de "sorgo" (*Sorghum vulgare* Pers., Gramineae). La proteasa no contiene serina ni cisteína en el sitio activo ni tampoco tiene requerimiento de iones metálicos para poner de manifiesto su actividad proteolítica, que es máxima a pH 3,6 y desaparece por encima de pH 5 cuando se ensaya sobre seroalbúmina bovina, por lo que los autores estiman que se trata de una "proteasa ácida". La enzima es homogénea por electroforesis en gel de poliacrilamida y tiene

un peso molecular estimado en 80.000 (Sephadex G-150).

Los mismos investigadores (Garg y Virupaksha, 1970b) también estudian la especificidad de sustrato de la enzima, determinando que hidroliza con exclusividad los enlaces peptídicos en los que está involucrado el grupo carboxílico de los ácidos aspártico o glutámico, cuyas cadenas laterales no deben estar sustituidas (uniones en las que participan asparagina o glutamina no resultan hidrolizadas). La proteasa ácida de sorgo podría resultar un reactivo valioso en el análisis secuencial de proteínas.

PROTEINASAS DE PAPA

En una investigación orientada a determinar la presencia y magnitud de la actividad proteolítica en tejidos vegetativos de "papa" (*Solanum tuberosum* L. cv. Russet Burbank), Santarius y Belitz (978) establecen que los niveles enzimáticos más altos se detectan en raíces y en hojas, de donde separan y caracterizan tres diferentes proteinasas. Una de ellas está presente únicamente en hojas y es activa frente a BAPA, resultando máxima la actividad a pH 8,6-9 y temperatura de 25°C; tiene un peso molecular estimado en 70.000, un pI de 4,25 y se trataría de una enzima serínica. La segunda no está presente en hojas sino en raíces (y en menor medida en tubérculos), es activa frente a benzoil-L-tirosina-*p*-nitroanilida (BTPA), tiene un pH óptimo de 8,6 y una temperatura óptima de 40°C; su peso molecular es mucho mayor (150.000 a 200.000), el punto isoeléctrico es más alto (pH 4,8 a 5,3) y es inhibida por agentes reductores como cisteína, cianuro y mercaptoetanol. Finalmente la tercera proteasa se encuentra preferentemente en raíces, aún cuando también está presente en concentraciones menores en tubérculos y en escasa cantidad en hojas. Sus características son las siguientes: es activa frente a alanina-

p-nitroanilida (APA) y leucina-*p*-nitroanilida (LPA), el pH óptimo es cercano a 9, la temperatura óptima es también de 40°C, el peso molecular y el punto isoeléctrico son similares a los de la BAPA-asa (70.000 y pH 4,5), pero en este caso se trata de una enzima sulfhidrónica.

PROTEINASAS DE RICINO

En endosperma de la semilla de "ricino" o "castor" (*Ricinus communis* L., Euphorbiaceae) contiene dos aminopeptidasas de tipo sulfhidrónico que hidrolizan la L-leucina- β -naftilamida (LNA) a pH óptimos de 7 y 7,5. Durante la germinación aparecen además en el endosperma una proteasa sulfhidrónica capaz de digerir la hemoglobina, una carboxipeptidasa serínica y al menos dos BANA-*asas* (*N*-benzoil-DL-argininamida- β -naftilamidadas) también sulfhidrilo-dependientes. La carboxipeptidasa es especialmente activa frente a *N*-carbобензоxi-L-fenilalanina-L-Leucina (Z-Phe-Leu) y a *N*-carbобензоxi-L-tirosina-L-leucina (Z-Tir-Leu). Los valores de pH óptimos para las proteasas, la carboxipeptidasa y las BANA-*asas* son 3,5-4, 5-5,5 y 6-8, respectivamente. Los datos obtenidos indican que las aminopeptidasas están involucradas en la movilización temprana de las proteínas de reserva del endosperma, en tanto que las demás actuarían luego de producida la germinación (Tully y Bevers, 1978).

PROTEINASAS DE TRIGO SARRACENO

De las semillas de "trigo sarraceno" (*Fagopyrum esculentum* Moench., Polygonaceae), Belozersky *et al.* aíslan una proteínasa serínica del tipo de la tripsina, capaz de hidrolizar BAPA. Posteriormente Jordan y Belozersky (1975) consiguen purificar 315 veces una tiol-proteínasa por tratamiento con acetona, precipitación fraccionada con sulfato de amonio, cromatografía sobre CM-

Sephadex y enfoque isoeléctrico. La enzima es homogénea por electroforesis en gel de poliacrilamida, es activada por cisteína e inhibida por PCMB y tiene un peso molecular de 75.000, determinado por gel-filtración a través de Sephadex G-100. La activación de la misma por cisteína, 2-mercaptoetanol y DTT, la inhibición por PCMB y la ausencia de inhibición por DFP y EDTA confirman que se trata de una proteasa sulfhidrúlica. Las fracciones glutelina y globulina de la semilla son hidrolizadas por la enzima, por lo que la principal función de la misma sería la de degradar las proteínas de reserva (Jordan y Belozersky, 1976).

Posteriormente Emtseva y Belozersky (1977) consiguen purificar 400 veces una BAPA-asa de peso molecular 60.000-70.000 y pI 4,5 que es homogénea por enfoque isoeléctrico y electroforesis en gel de poliacrilamida. Se trata de una endopeptidasa que hidroliza fuertemente protaminas, débilmente histonas y caseína o glutelinas y resulta inactiva frente a albúminas y globulinas seminales.

ENZIMAS PROTEOLITICAS DE PLANTAS INSECTIVORAS

La fantasía popular ha alimentado el mito de la existencia de "plantas carnívoras", cuando en rigor son unas pocas las especies capaces de aprovechar nitrógeno orgánico, generalmente aportado por pequeños insectos. Estas plantas están provistas de un sistema enzimático proteolítico que preferentemente actúa en medio ácido. Amagase (1972) comprobó que la secreción de *Nepenthes* spp. (Nepenthaceae) contiene cuatro componentes proteásicos por análisis electroforético en gel de poliacrilamida, que puede ser purificada para separar un solo constituyente principal. Esta preparación posee propiedades estrechamente relacionadas con la enzima aislada de *Drosera peltata* Smith (Droseraceae), que muestra

un máximo de actividad sobre caseína a pH 3, es insensible a la acción de DFP y PCMB y muestra una singular especificidad de sustrato, desdoblado selectivamente aquellos enlaces en los que el grupo carboxilo es aportado por ácido aspártico, alanina o lisina.

Lobareva *et al.* (1973) aíslan a partir de *Nepenthes* spp. una proteasa a la que denominan "nepentesina" y que tiene un pH óptimo de 1,8 a 2,4 (sustrato: hemoglobina). La inactivación total de la enzima por inhibidores específicos de proteasas ácidas (*N*-diazacetil-*N'*-2',4-dinitrofeniletildiamina en presencia de iones cobre) indica una marcada similitud con pepsina.

Toekes *et al.* (1974) también denominan "nepentesina" a una preparación enzimática separada de las estructuras secretoras de *Nepenthes macfarlanei* Hamsl., que resulta estar integrada por al menos dos componentes enzimáticos, de pesos moleculares 59.000 (el de mayor proporción) y 21.000. También se señala en este caso el notorio parecido con pepsina.

Ultimamente Clancy y Coffey (1977) comprueban la secreción de una proteasa ácida que no es inhibida por NEM al "alimentar" ejemplares de *Drosera rotundifolia* L. con gelatina. La secreción comienza el primer día y alcanza su máximo a los cuatro días.

III. ANTECEDENTES, OBJETIVOS Y ALCANCES DEL TRABAJO

Bromelia es un género americano originario de zonas tropicales, integrado por unas sesenta especies que desde las Antillas y México se extiende por Sudamérica hasta el norte de Argentina, adonde llegan solamente cuatro especies: *Bromelia balansae* Mez, *B. hieronymi* Mez, *B. laciniosa* Mart. y *B. serra* Griseb.

Las especies argentinas han sido objeto de un detallado estudio en la Cátedra de Botánica: al análisis de las estructuras secretoras presentes en los frutos, responsables de la producción de gomas (Nájera, 1974), le sucedieron trabajos sobre anatomía foliar (Castells y Nájera, 1974) y sobre quimiotaxonomía de flavonoides (Galdeano y García, 1975) y de los propios exudados gomosos (Caffini *et al.*, 1976).

Precisamente al estudiar las propiedades de las gomas que en todos los casos aparecen entre los frutos (Pfirter y Cozzarin, 1971; Pfirter *et al.*, 1973 a y b), se advirtió la presencia de actividad caseinolítica en el jugo obtenido por expresión de los mismos. Esta prematura observación de la actividad enzimática

exhibida por preparaciones obtenidas en condiciones precarias nos alertó acerca de la posibilidad de encontrarnos frente a nuevas fuentes de enzimas proteolíticas vegetales, constituyendo el principal justificativo de la elección del tema.

En esta oportunidad se ha procedido a aislar y caracterizar los productos enzimáticos provenientes de tres de las especies citadas, en razón de las dificultades habidas para obtener frutos de *B. serra* en condiciones apropiadas.

La información que se obtenga sobre la potencia enzimática y las condiciones de acción de estas proteasas podría sugerir la realización de ensayos referidos a la posibilidad de su aplicación en el campo farmacológico e industrial, en cuyo caso podría disponerse de sucedáneos adecuados para reemplazar productos que no se producen en el país.

IV. MATERIAL

DESCRIPCION BOTANICA Y DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS (Castellano, 1945)

Bromelia balansae Mez es una planta perenne, estolonífera, de aproximadamente medio metro de altura, provista de hojas alargadas y de consistencia coriácea, de 0,80 a 1,50 m de largo y armadas de fuertes agujones en el margen. La infrutescencia es cilíndrica y está constituida por numerosas bayas elipsoidales anaranjadas o amarillentas, de 4 a 5 cm de largo y 2 cm de diámetro, fibrosas y comestibles. La planta vegeta a la sombra de grandes macizos arbóreos ("islas"), extendiéndose desde Brasil y Paraguay (especialmente por la parte oriental) hasta Argentina (Corrientes y Misiones).

Bromelia hieronymi Mez es también estolonífera y forma matorrales, con hojas erguidas de 0,40 a 0,70 m de largo, glaucas, de punta prolongada y a veces esclerosada, con los bordes armados de agujones oscuros y curvos. Las flores, de 4 a 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, parecidas por su color y forma a los dátiles, de unos 5 cm de largo por 2 cm de diámetro. Se extiende desde Paraguay, por Bolivia, hasta Argentina, donde puede encontrársela en zonas de vegetación xerófila de Jujuy, Salta, Tucumán, Santiago del Estero y Chaco.

Bromelia laciniosa Mart. es similar a *B. balansae* pero su porte es ligeramente mayor. Presenta hojas externas que pueden superar los 2 m de largo, fuertemente armadas y sin tricomas en la cara inferior (Castells y Nájera, 1974); las internas poseen aguijones menos consistentes. La infrutescencia es cilíndrico-alargada, laxa en la parte inferior y densa en la superior. La especie se extiende desde Brasil hasta el NE de Argentina (Misiones).

PROCEDENCIA DEL MATERIAL Y EPOCA DE RECOLECCION

Bromelia balansae Mez

El material estudiado proviene de la localidad de Esquina (Corrientes) y fue recolectado en abril de 1978.

Bromelia hieronymi Mez

Los frutos proceden de las proximidades de la ciudad de Santiago del Estero y fueron recolectados en diciembre de 1977.

Bromelia laciniosa Mart.

La especie, citada para la Argentina por Mez y de la que Castellanos manifestara "no haber hallado ninguna especie parecida", ha sido recogida en la localidad de Tres Fronteras (Misiones) en mayo de 1978.

V. M E T O D O S

EXTRACCION DEL JUGO Y AISLAMIENTO DE LAS ENZIMAS CRUDAS

El método de obtención de las enzimas crudas corresponde al descrito por Heinicke y Gortner (1957), con las modificaciones introducidas por Ota *et al.* (1964). Los frutos, liberados de hojas y de brácteas, fueron pesados y exprimidos por medio de una prensa hidráulica (400 kg/cm^2), previa disección de los mismos en cuatro porciones mediante un corte transversal y otro longitudinal. Al jugo obtenido (pH 3,8 a 4,1), enfriado a 4°C , se le adicionó lentamente un volumen de acetona fría, originándose así un pesado precipitado de aspecto mucilaginoso que fue descartado. Al líquido sobrenadante se le agregaron dos volúmenes de acetona fría, con lo que se obtuvo un precipitado enzimáticamente activo, que fue separado por centrifugación a 3.000 g en centrífuga refrigerada, secado en desecador de vacío y pulverizado en un pequeño mortero. La solución sobrenadante no tiene actividad proteolítica detectable, por lo que fue descartada. Todas estas operaciones fueron llevadas a cabo en una cámara frigorífica a $0-4^\circ\text{C}$.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA

Para determinar la actividad proteolítica de las enzimas crudas se adoptó el método de Kunitz (1947) modificado por Ota *et al.* (1964). El mismo consiste básicamente en dejar actuar a la proteasa sobre la caseína, produciéndose así la hidrólisis parcial del sustrato con liberación de péptidos y aminoácidos; al agregar ácido tricloroacético al 5% precipita el resto de la caseína no degradada, quedando en solución los productos de la hidrólisis, que son evaluados espectrofotométricamente a 280 nm en una celda de 1 cm.

La solución de caseína se preparó suspendiendo 0,5 g de caseína (Hammarsten) en 100 ml de la solución reguladora elegida. Esta suspensión se calentó durante 15 minutos en baño hirviente hasta completar la disolución de la proteína.

A cada tubo se le adicionaron 0,5 ml de una solución de la enzima en agua bidestilada (0,8 mg/ml), un ml de caseína al 0,5% en buffer fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,8) y 0,5 ml de una solución del activador elegido. Después de 20 minutos a 40°C se agregaron 3 ml de ácido tricloroacético al 5%, se filtró por papel y se determinó espectrofotométricamente la absorbancia del líquido sobrenadante a 280 nm (Beckman M-26).

Las condiciones indicadas fueron luego modificadas en forma alternada para determinar los valores óptimos de pH, temperatura y concentración de distintos activadores.

Los resultados consignados en cada uno de los ensayos se obtuvieron al promediar por lo menos 8 determinaciones. A los valores de cada lectura espectrofotométrica se le descontaron los correspondientes a los blancos, realizados en las mismas condiciones.

a. Comportamiento frente a distintos activadores

Se aplicó la técnica anteriormente descrita, pero variando en cada caso tanto el activador empleado como la concentración del mismo, con el objeto de determinar en primer término si poseían o no capacidad activadora sobre las enzimas crudas y en caso afirmativo para establecer la concentración óptima de cada uno de ellos.

Se ensayaron los siguientes activadores: mercaptoetanol, cisteína, cianuro de sodio y EDTA en concentraciones crecientes (2,5 mM, 6,25 mM, 12,5 mM, 17,5 mM y 25 mM).

b. Determinación de la temperatura óptima

De acuerdo a los valores obtenidos en el ensayo anterior, se repitió la técnica indicada con el agregado del activador más eficaz a su óptima concentración, variando en este caso las temperaturas a las que se efectuaron las determinaciones (entre 20°C y 70°C).

c. Determinación del pH óptimo

Las determinaciones se llevaron a cabo teniendo en cuenta los resultados de los ensayos anteriores, es decir en condiciones óptimas de temperatura y de concentración de activador, por lo que los valores máximos obtenidos dentro del rango de pH cubierto fueron los que se utilizaron en el cálculo de la actividad específica respectiva.

Para valores de pH superiores a 8 se emplearon soluciones reguladoras de ácido bórico, cloruro de potasio e hidróxido de sodio y soluciones de fosfatos monopotásico y disódico para pH menores que el mencionado. La caseína no se solubiliza a pH inferiores a 5,8.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD AMIDASICA

Como sustrato se eligió α -N-benzoil-L-argininamida monohidrato (BAA, Fluka A. G. Chemische Fabrik), el que por acción de ciertas proteasas se hidroliza liberando arginina, que es susceptible de ser valorada espectrofotométricamente por medio de una reacción de color. Para determinar la cantidad de arginina liberada se recurrió a la técnica de Michel (1968), que utiliza ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno) como reactivo*.

La intensidad de la coloración y la estabilidad del complejo coloreado están determinadas por las condiciones fisicoquímicas del medio de reacción (pH y solvente orgánico con no más de 20% de agua) y en particular por la presencia de hidrindantina (ninhidrina reducida).

Para dosar la cantidad de arginina de cada muestra se colocó una gota de solución de ácido ascórbico (1 mg/ml, mediante una pipeta calibrada a 20 gotas por ml) en un tubo de 16 x 160 mm con un ml de la solución cuyo contenido en arginina se quiere determinar. Posteriormente se adicionó un ml del reactivo de Michel y se colocó el tubo en un baño de agua hirviente durante 15 minutos. Después de ser enfriado bajo agua corriente se agregaron 15 ml de etanol al 50% y, previa agitación para destruir el exceso de hidrindantina, se midió la intensidad del color desarrollado en un espectrofotómetro (Beckman M-26) a 570 nm.

* Reactivo de Michel (1968)

Ninhidrina	20,0 g
Propionato de sodio	201,8 g
Acido propiónico	93,0 ml
Metilcelosolve	500,0 ml

El metilcelosolve (2-metoxietanol) debe ser destilado a presión reducida antes de su empleo y conservado a 4°C y al abrigo de la luz para evitar la formación de peróxidos.

Previamente fue necesario construir una curva patrón de arginina, partiendo de una solución 10 mM del aminoácido en agua bidestilada (prácticamente exenta de amoníaco). Con ella se efectuaron diferentes diluciones, de modo de obtener 50, 100, 150, 200 y 300 nanomoles de arginina en cada tubo de reacción.

Al igual que en los ensayos realizados para determinar la actividad proteolítica, en todas las determinaciones que corresponden a la actividad amidásica los datos consignados representan el promedio de por lo menos ocho determinaciones espectrofotométricas a las que se les han descontado los blancos respectivos.

a. Determinación de la concentración óptima de activador

Dado que el mercaptoetanol resultó ser el más eficaz de los activadores al analizar la capacidad hidrolítica de las enzimas crudas frente a caseína, en el ensayo de la actividad amidásica se determinó la concentración óptima de este único activador. Para ello se adicionaron a un tubo de ensayo 0,5 ml de una solución 40 mM de BAA, 1 ml de buffer fosfato 0,1 M de pH 6 y 400 microgramos de la enzima cruda disueltos en 0,5 ml de una solución de mercaptoetanol de concentración variable (2,5 mM, 7,5 mM, 12,5 mM y 25 mM). Los tubos fueron mantenidos durante 20 horas a 25°C (Ota *et al.*, 1964) y al cabo de ese tiempo se diluyeron a un volumen final de 20 ml con agua bidestilada. Un ml de esta solución constituye la muestra a la que se le aplica la técnica colorimétrica antes descripta.

b. Determinación de la temperatura óptima

Una vez establecida la concentración óptima de mercaptoetanol se procedió a determinar la temperatura a la cual la acción enzimática es máxima, dentro de un rango de 20°C a 70°C.

c. Determinación del pH óptimo

Para su determinación se repitieron las condiciones óptimas del ensayo anterior, modificando en este caso el pH mediante el uso de las siguientes soluciones reguladoras: ácido acético y acetato de sodio (pH inferiores a 6), fosfatos monopotásico y disódico (pH 6 a 8) y ácido bórico, cloruro de potasio e hidróxido de sodio (pH superiores a 8).

d. Determinación de la concentración óptima de sustrato

Obtenidos ya los valores óptimos de pH, temperatura y concentración de activador, se efectuaron nuevos ensayos para evaluar el comportamiento de las enzimas crudas al variar la concentración inicial de sustrato (5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM y 25 mM). Los resultados obtenidos al determinar la concentración óptima de sustrato fueron los que se utilizaron para el cálculo de la actividad específica frente a BAA de cada una de las enzimas crudas.

PURIFICACION DE LAS ENZIMAS CRUDAS POR GEL-FILTRACION

Como paso previo a la purificación se determinó el contenido de nitrógeno proteico de las enzimas crudas en base a la microtécnica de Kjeldahl (Farmacopea Argentina, 6a. ed., pág. 1065).

a. Preparación de la columna

Se emplearon columnas cromatográficas de 15 mm por 30 cm (Pharmacia Fine Chemicals, K 15/30) rellenas con Sephadex G-200-40 para purificar las enzimas crudas de *B. laciniosa* y *B. hieronymi*, en tanto que para hacer lo propio con la enzima de *B. balansae* fue necesario recurrir al Sephadex G-200. Se pesaron 1,5 g de Sephadex G-200-40 (ó 1,2 g de Sephadex G-200) y se colocaron en un vaso de precipitado conteniendo 150 ml de agua

bidestilada, en reposo durante 72 horas a 4°C. A continuación se desgasificó la suspensión mediante aplicación de vacío y agitación suave y se la incorporó a la columna (ya instalada en una cámara frigorífica a 0-4°C) en forma continua desde un reservorio adecuado, conectado a un segundo reservorio conteniendo buffer fosfato 0,1 M de pH 6,3. Debe tenerse la precaución de que la presión de operación no supere los 16 cm de altura.

Una vez compactado el gel, que ocupa un volumen de aproximadamente 45 ml, se retiró el reservorio intermedio que contenía la suspensión y se dejó estabilizar el lecho con el buffer empleado en la separación, situación que se consigue permitiendo el paso de una cantidad equivalente a dos a tres veces el volumen ocupado por el gel.

b. Desarrollo cromatográfico

Previamente a la siembra de las enzimas se determinó el volumen muerto de la columna por el agregado de una solución de Blue-Dextran (Pharmacia Fine Chemicals). La solución de enzima cruda se preparó disolviendo 150 mg de la misma en 5 ml del buffer fosfato utilizado como solvente de desarrollo (*B. laciniosa* y *B. hieronymi*) ó 120 mg en 10 ml (*B. balansae*), debido en este caso a la mayor viscosidad de la solución de enzima cruda. Luego de homogeneizada, la solución se centrifugó a 7.000 g durante 30 minutos en centrífuga refrigerada y el sobrenadante se aplicó al extremo de la columna. Una vez eluída la cantidad correspondiente al volumen muerto de la columna se recogieron fracciones de aproximadamente 1 ml (grado de flujo: 10 microlitros por minuto).

c. Análisis de las fracciones obtenidas

El contenido proteico de cada fracción fue determinado por medida directa de la absorción a 280 nm. Para ello

fue necesario hacer diluciones adecuadas con el objeto de obtener lecturas inferiores a una unidad de absorbancia. En cada una de las fracciones en las que se comprobó la presencia de proteína se valoró la actividad proteolítica aplicando el método anteriormente descrito. La proporción de proteína activa se determinó en cada caso por integración de los respectivos perfiles de elución. De este modo pudo establecerse el porcentaje que representa la fracción proteica con actividad proteolítica en el contenido total de las enzimas crudas respectivas.

VI. RESULTADOS

RENDIMIENTO DE JUGO POR PESO DE FRUTOS

Especie	Muestra N°	Peso frutos (g)	Volumen jugo (ml)	Rendimiento (ml/100 g)
<i>B. balansae</i>	1	500	230,0	46,0
	2	500	200,0	40,0
	3	500	200,0	40,0
	4	500	180,0	36,0
	Promedio	500	202,5	40,5
<i>B. laciniosa</i>	1	500	197,0	39,4
	2	500	210,0	42,0
	Promedio	500	203,5	40,7
<i>B. hieronymi</i>	1	500	210,0	42,0
	2	500	190,0	38,0
	Promedio	500	200,0	40,0

RENDIMIENTO DE ENZIMA CRUDA POR VOLUMEN DE JUGO

Especie	Muestra N°	Volumen jugo (ml)	Enzima cruda (g)	Rendimiento (g/100 ml)
<i>B. balansae</i>	1	230,0	3,91	1,70
	2	200,0	3,83	1,92
	3	200,0	4,36	2,18
	4	180,0	3,60	2,00
	Promedio	202,5	3,93	1,94
<i>B. laciniosa</i>	1	197,0	3,62	1,84
	2	210,0	4,18	1,99
	Promedio	203,5	3,90	1,92
<i>B. hieronymi</i>	1	210,0	3,59	
	2	190,0	3,61	1,90
	Promedio	200,0	3,60	1,80

RENDIMIENTO PROMEDIO DE ENZIMA CRUDA POR PESO DE FRUTOS

Especie	Peso de frutos (g)	Enzima cruda (g)	Rendimiento (g/100 g)
<i>B. balansae</i>	500	3,93	0,79
<i>B. laciniosa</i>	500	3,90	0,78
<i>B. hieronymi</i>	500	3,60	0,72

ACTIVIDAD CASEINOLITICA

La unidad de actividad caseinolítica se define como la cantidad de enzima cruda que provoca un aumento de una unidad de absorbancia a 280 nm, por minuto, en las condiciones descritas. La actividad específica es el número de unidades de actividad enzimática por miligramo de enzima cruda.

a. Activadores

En la tabla I se hace constar el comportamiento de las enzimas crudas en ausencia de activador y en presencia de cada uno de ellos. La concentración de activador empleada en la determinación corresponde a la concentración óptima del mismo, de acuerdo a lo consignado en la tabla II.

	Actividad específica de enzima cruda		
	<i>B. balansae</i>	<i>B. laciniosa</i>	<i>B. hieronymi</i>
sin activador	0,015	0,021	0,025
EDTA	0,014	0,016	0,047
cianuro de sodio	0,028	0,037	0,052
mercaptoetanol	0,052	0,045	0,069
cisteína	0,044	0,043	0,073

Tabla I. Efecto del agregado de activadores sobre la actividad caseinolítica

	Concentración óptima (mM)		
	<i>B. balansae</i>	<i>B. laciniosa</i>	<i>B. hieronymi</i>
EDTA	12,5	25,0	12,5
cianuro de sodio	17,5	25,0	12,5
mercaptoetanol	17,5	17,5	12,5
cisteína	12,5	17,5	17,5

Tabla II. Concentraciones óptimas de distintos activadores

La variación de la actividad enzimática en función de la concentración de cada activador está expresada gráficamente en la fig. 1.

b. Temperatura óptima

Dado que el mercaptoetanol es el activador de mayor eficacia frente a las enzimas crudas de *B. balansae* y de

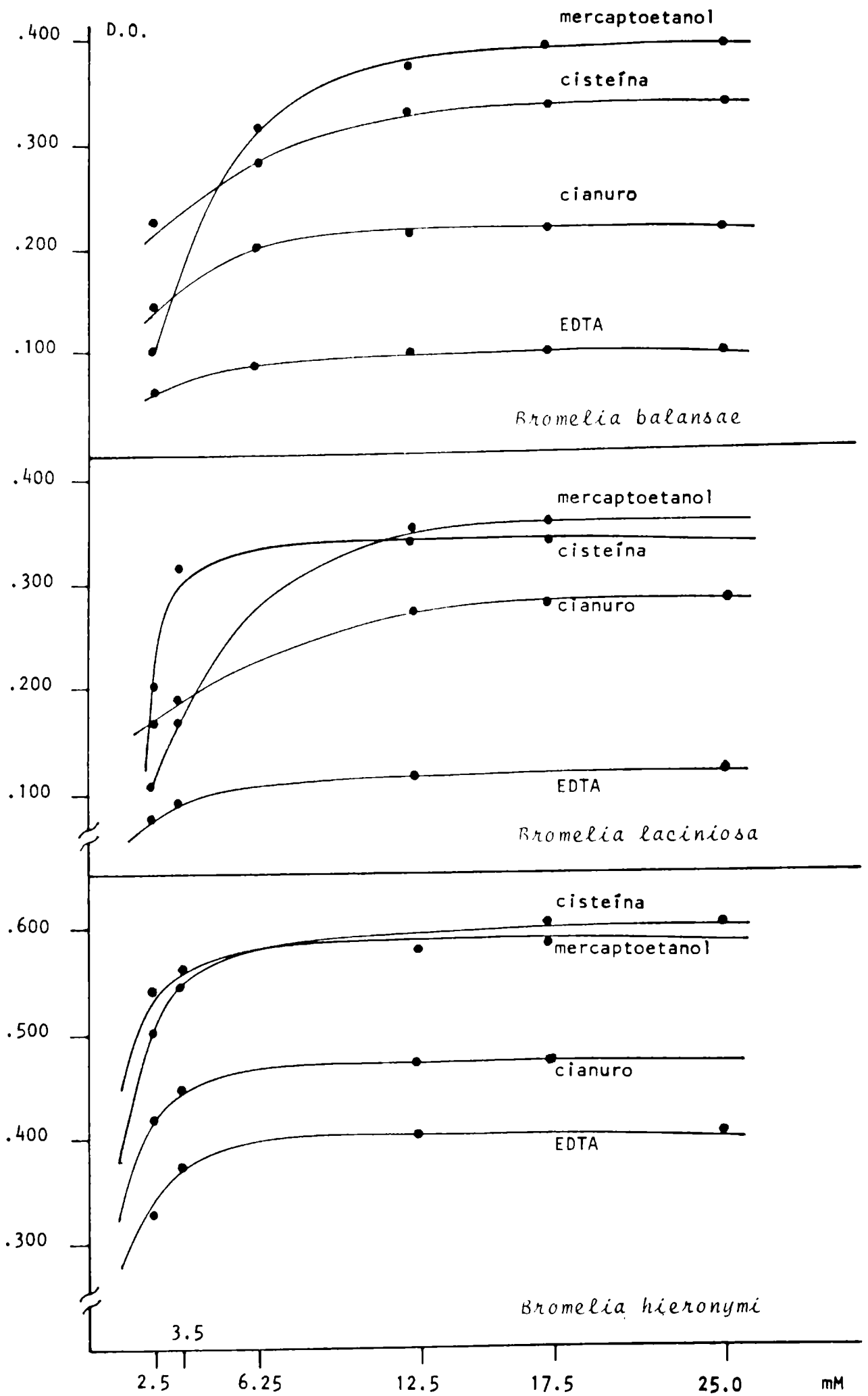


Figura 1. Variación de la actividad en función de la concentración de activador

B. laciniosa, aún cuando en el caso de *B. hieronymi* resulta ser ligeramente menos activo que la cisteína, en las determinaciones de temperatura óptima y de pH óptimo de cada enzima cruda se utilizó una solución 17,5 mM de mercaptoetanol. Los resultados se expresan gráficamente en la fig. 2. La temperatura óptima para la actividad caseinolítica de *B. hieronymi* y *B. laciniosa* es de 55°C y para la de *B. balansae* es de 45°C.

c. pH óptimo

La variación de la actividad caseinolítica de cada enzima cruda en relación al pH del medio de reacción se muestra en la fig. 3. Las determinaciones se realizaron a los valores de temperatura óptima antes citados.

El pH de máxima actividad enzimática de la proteasa de *B. balansae* se encuentra a pH 6,3 y disminuye ligeramente a medida que el medio se hace más alcalino. Por el contrario, tanto la enzima de *B. laciniosa* como la de *B. hieronymi* tienen un pico de máxima actividad a pH 6,3 y un segundo pico de menor poder hidrolítico a pH 7,8.

d. Actividades específicas de las enzimas crudas en condiciones óptimas

Todas las determinaciones tuvieron lugar a pH 6,3 en un medio que contenía mercaptoetanol en concentración 17,5 mM, a 45°C para la enzima cruda de *B. balansae* y a 55°C en los otros dos casos.

La enzima cruda de *B. hieronymi* es la de mayor actividad específica (0,104), seguida por la de *B. laciniosa* (0,091) y la de *B. balansae* (0,070).

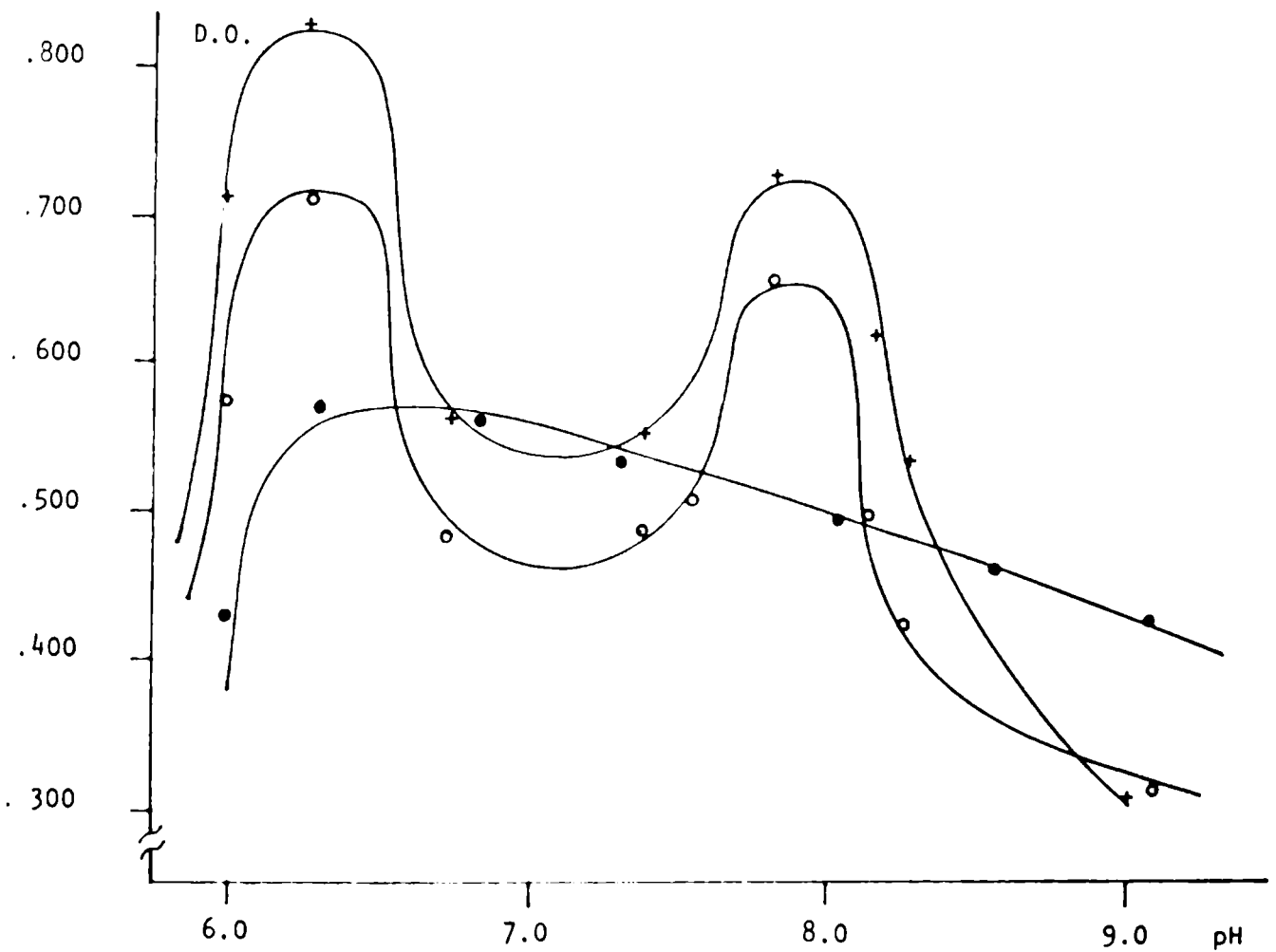
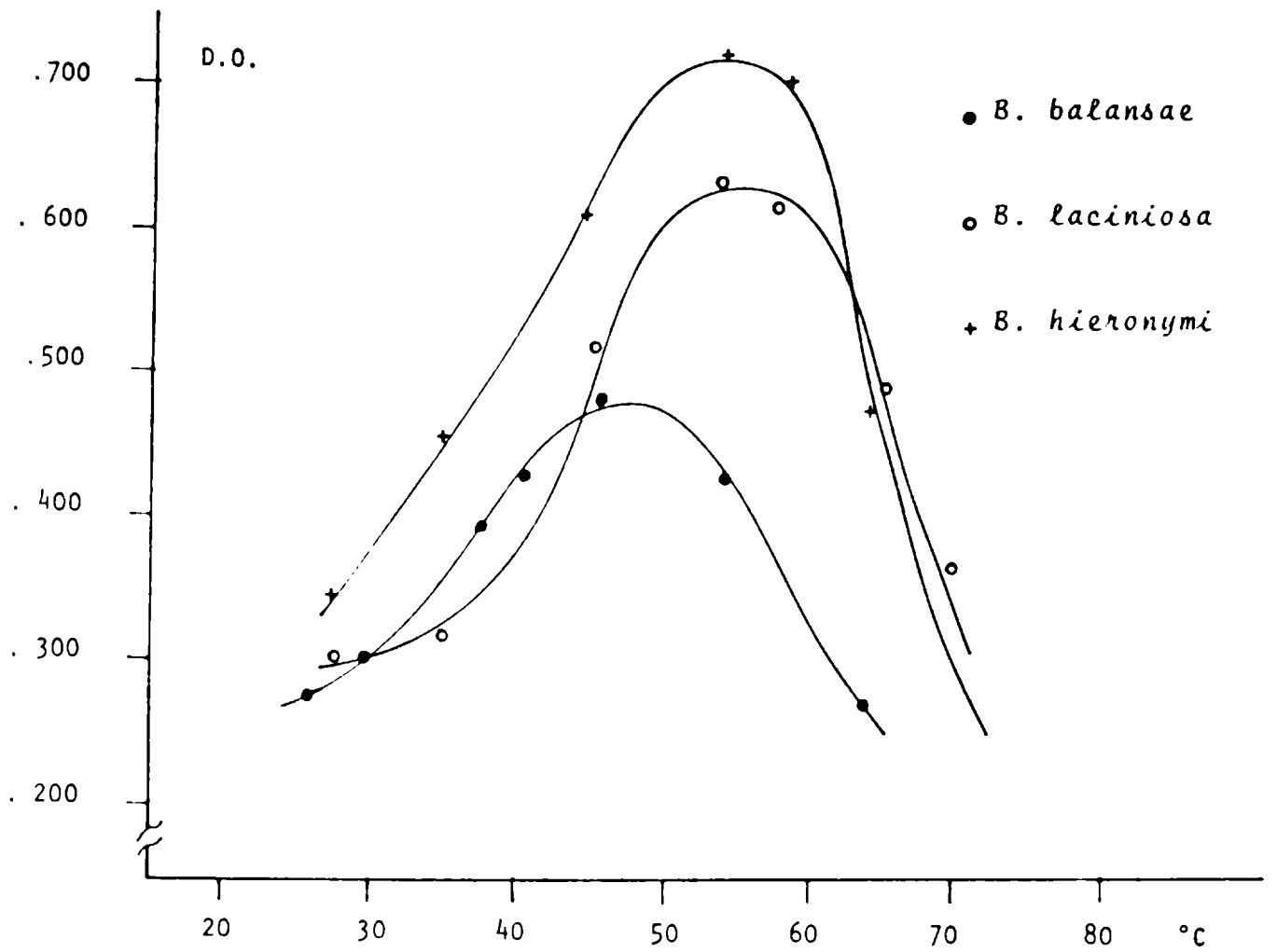


Figura 2 (arriba). Variación de la actividad en función de la temperatura

Figura 3 (abajo). Variación de la actividad en función del pH del medio

ACTIVIDAD AMIDASICA

La *unidad de actividad amidásica* se define como la cantidad de enzima cruda necesaria para hidrolizar un micromol de N- α -benzoil-L-argininamida (BAA) por minuto, en las condiciones óptimas de acción.

La *actividad amidásica específica* es el número de unidades enzimáticas por miligramo de enzima cruda.

a. Concentración óptima de activador

Como puede apreciarse en la fig. 4, la concentración óptima de mercaptoetanol es 25 mM para todas las enzimas crudas.

b. Temperatura óptima

Los valores óptimos de temperatura para la actividad amidásica de las enzimas crudas es de 30°C para la de *B. balansae* y de 40°C para las de *B. laciniosa* y *B. hieronymi* (fig. 5).

c. pH óptimo

En las figs. 6 y 7 se consigna la variación de la actividad enzimática en función del pH del medio de reacción. La enzima cruda de *B. balansae* muestra un valor máximo a pH 7,5. Las de *B. laciniosa* y *B. hieronymi* presentan dos picos de máxima actividad: uno de ellos, de actividad ligeramente superior, a pH 6,6 y el segundo a pH 6,0.

d. Concentración óptima de sustrato

La concentración óptima de BAA en los tres casos es 25 mM, como surge de los gráficos representados en la fig. 8

e. Actividades específicas de las enzimas crudas en condiciones óptimas

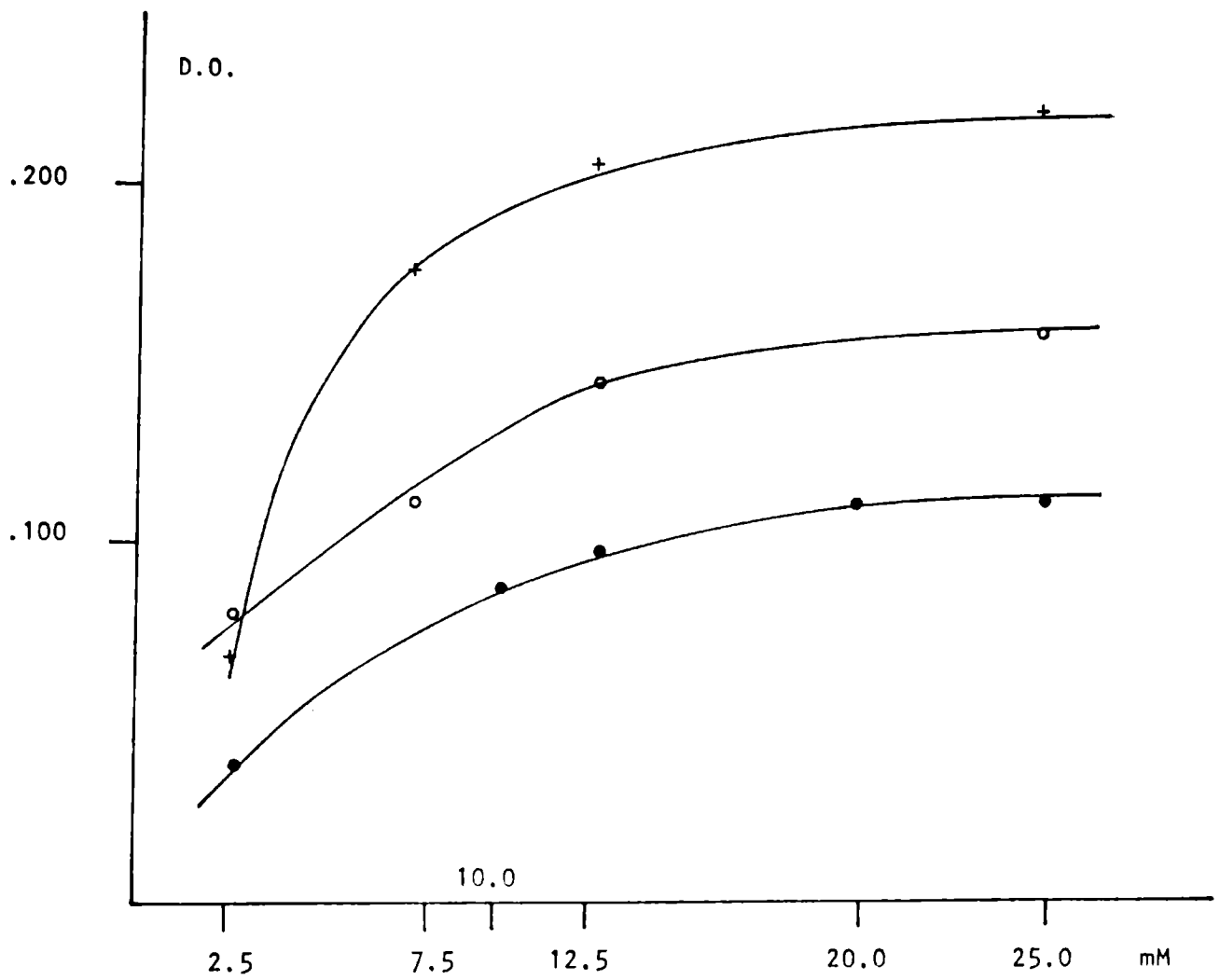


Figura 4. Variación de la actividad enzimática en función de la concentración de mercaptoetanol

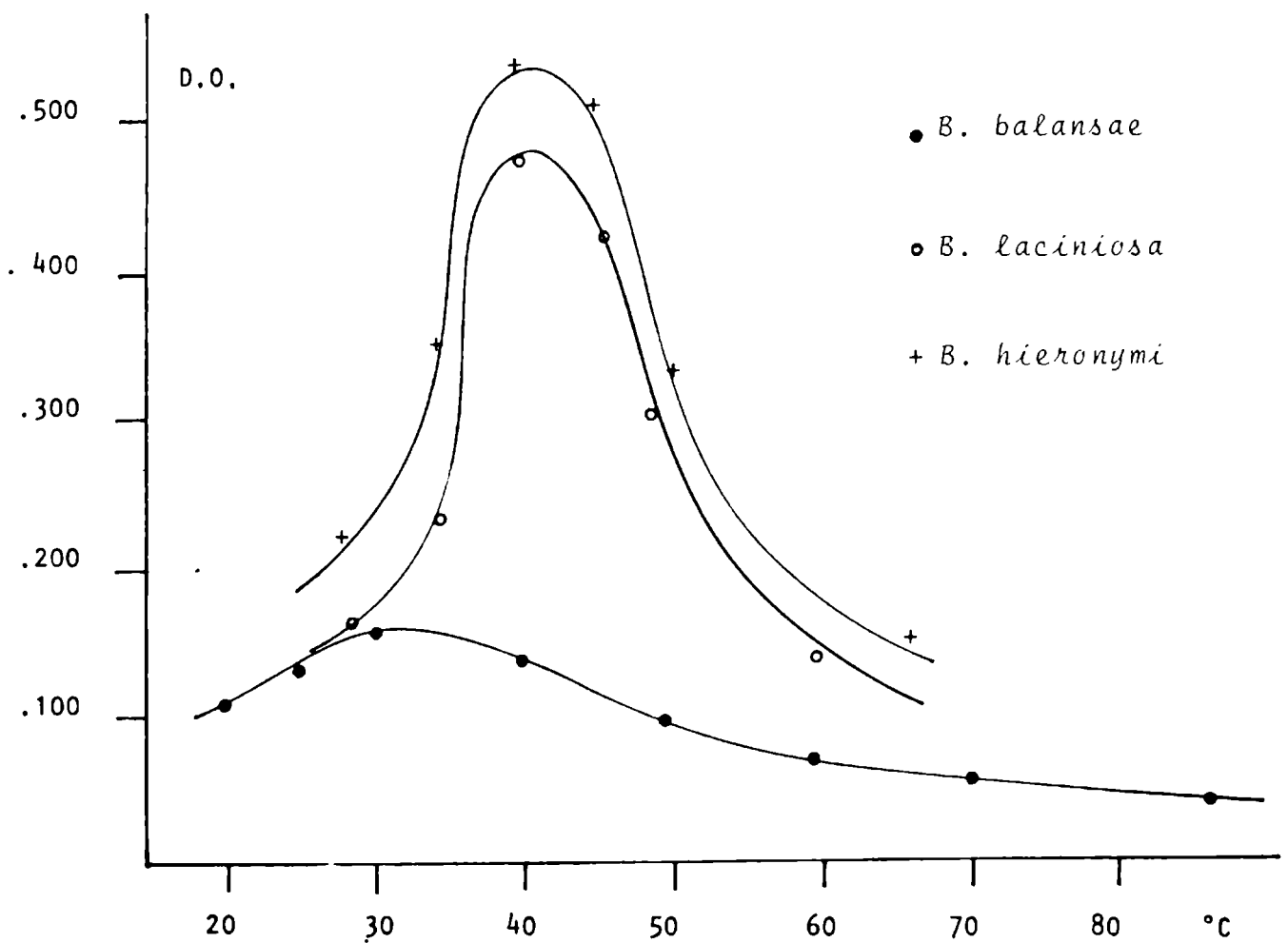


Figura 5. Variación de la actividad amidásica en función de la temperatura

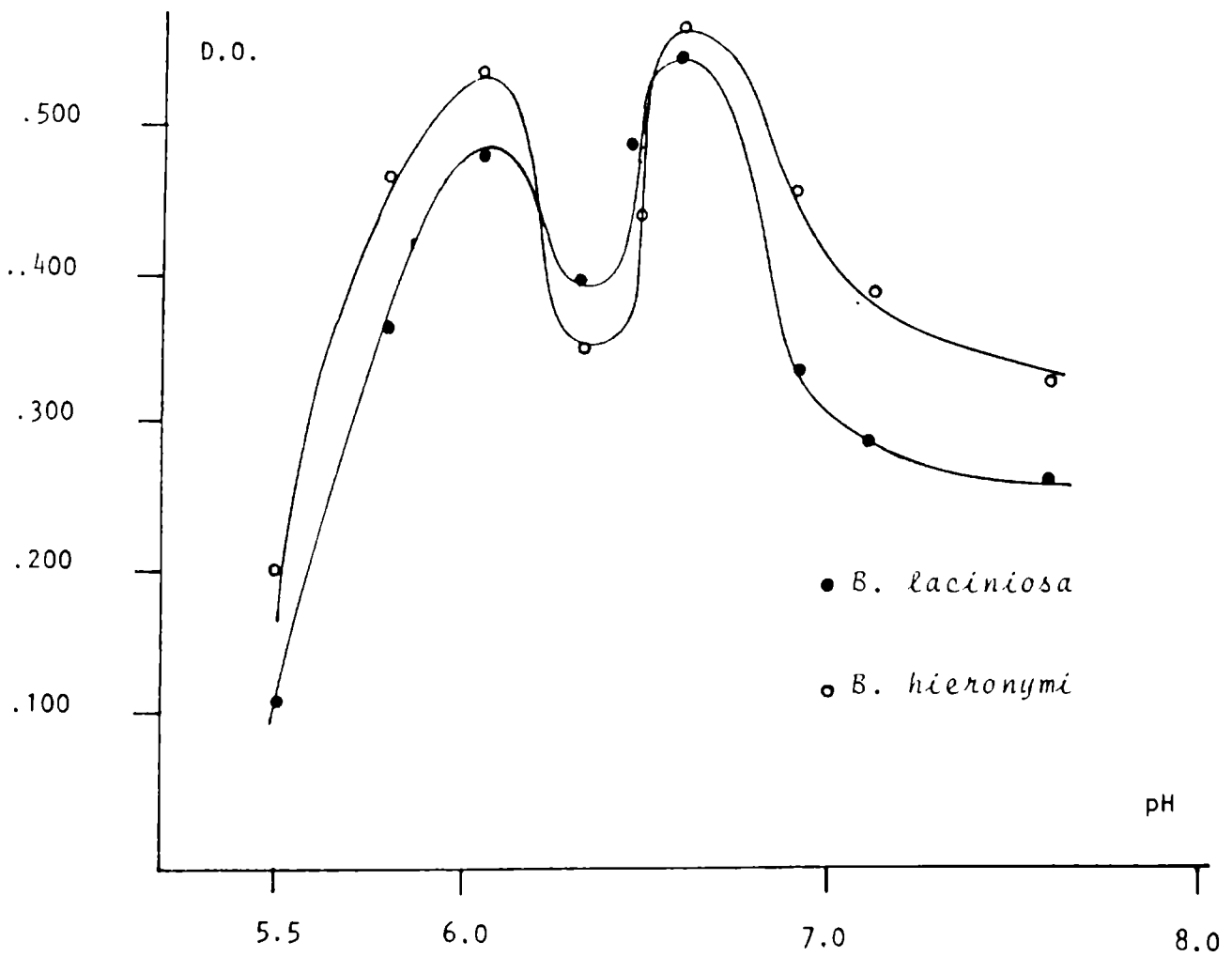
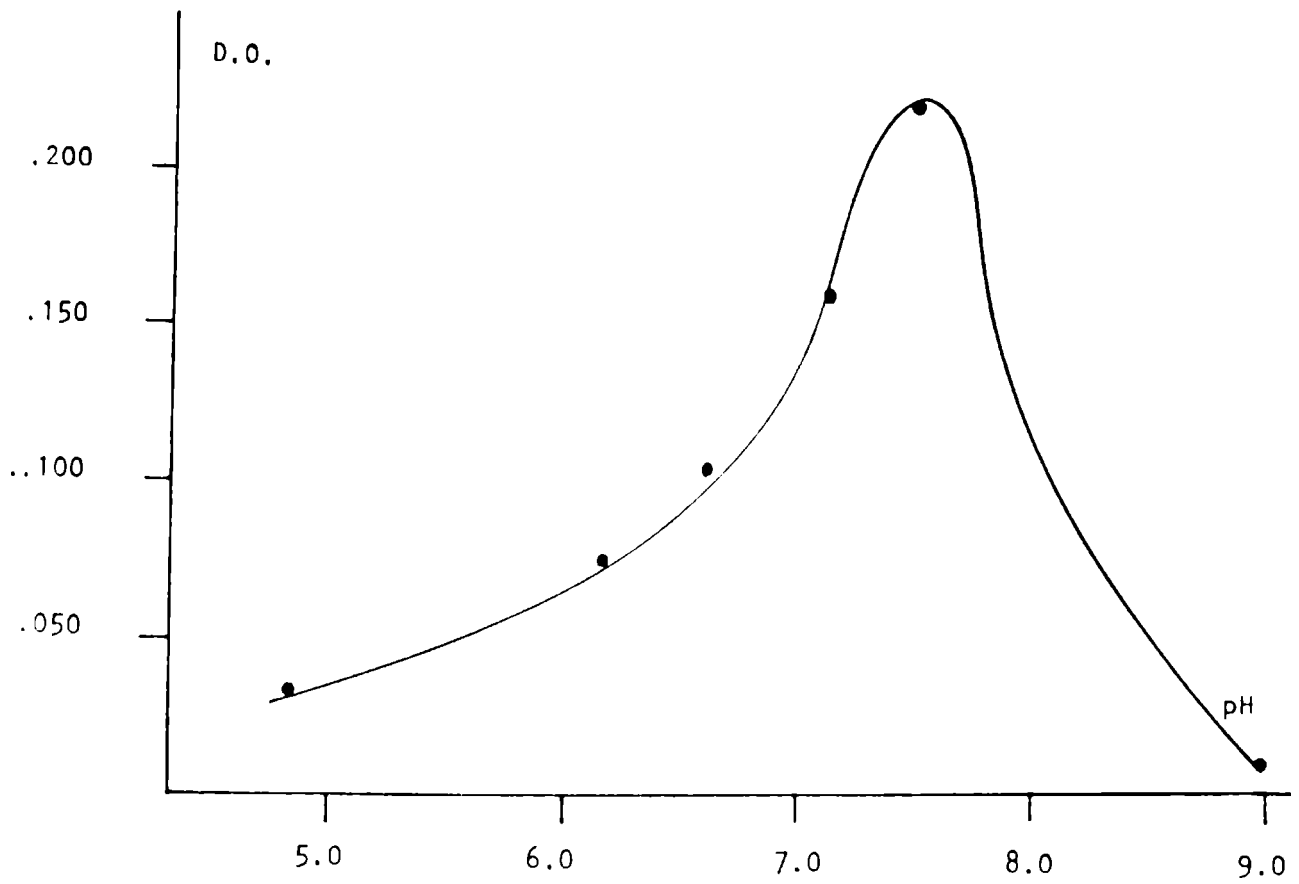


Figura 6 (arriba). Variación de la actividad de la enzima cruda de *B. balansae* en función del pH

Figura 7 (abajo). Variación de la actividad de las enzimas crudas de *B. laciniosa* y *B. hieronymi* en función del pH

Las determinaciones fueron realizadas en un medio conteniendo mercaptoetanol y BAA en concentración 25 mM, a pH 7,5 y 30°C en el caso de *B. balansae* y a pH 6,6 y 40°C para *B. laciniosa* y *B. hieronymi*.

La enzima cruda de *B. hieronymi* es la de mayor actividad amidásica específica (0,036), ligeramente mayor que la de *B. laciniosa* (0,033) y considerablemente superior a la de *B. balansae* (0,012).

PURIFICACION

Las enzimas crudas de las tres especies estudiadas tienen un bajo contenido proteico, que es del 13 % en *B. balansae*, ascendiendo al 21% en *B. laciniosa* y al 24% en *B. hieronymi*.

El análisis de los perfiles de elución cromatográficos revela que en las tres enzimas la porción proteica está integrada por al menos dos fracciones, que han logrado ser separadas totalmente en el caso de *B. laciniosa* (fig. 10) y en forma parcial en *B. balansae* (fig. 9) y en *B. hieronymi* (fig. 11). En todos los casos solamente una de ellas es la responsable de la acción proteolítica, que en *B. balansae* constituye el 69% de la proteína presente, en *B. laciniosa* el 79% y en *B. hieronymi* solamente el 37%.

En base a los resultados anteriores puede establecerse que la relación entre enzima cruda y proteína activa es igual a 11 tanto en *B. balansae* como en *B. hieronymi* y está reducida a 6 en el caso de *B. laciniosa*.

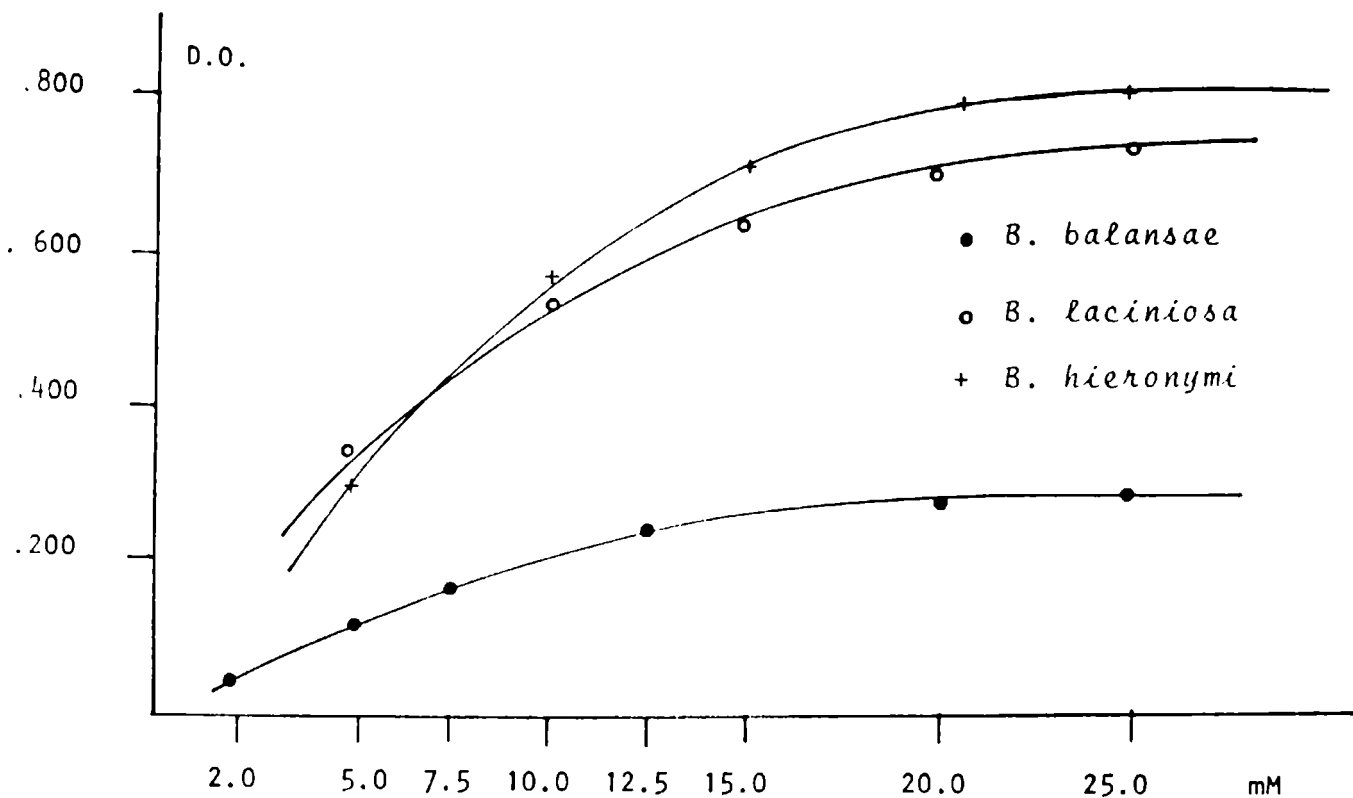


Figura 8. Variación de la actividad amidásica en función de la concentración de BAA

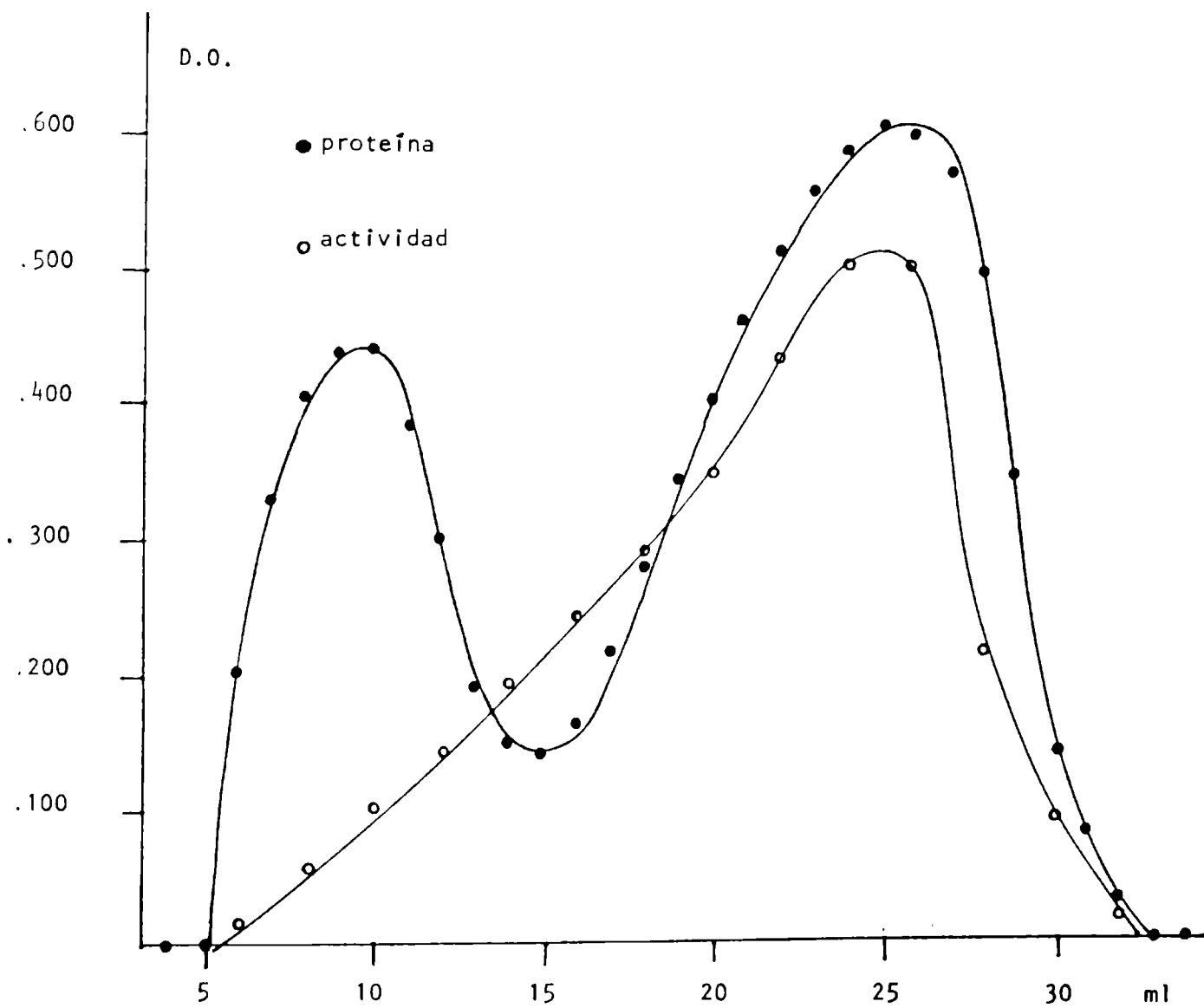


Figura 9. Perfil de elución de la enzima de *B. balansae* (Sephadex G-200, buffer fosfato de pH 6,3)

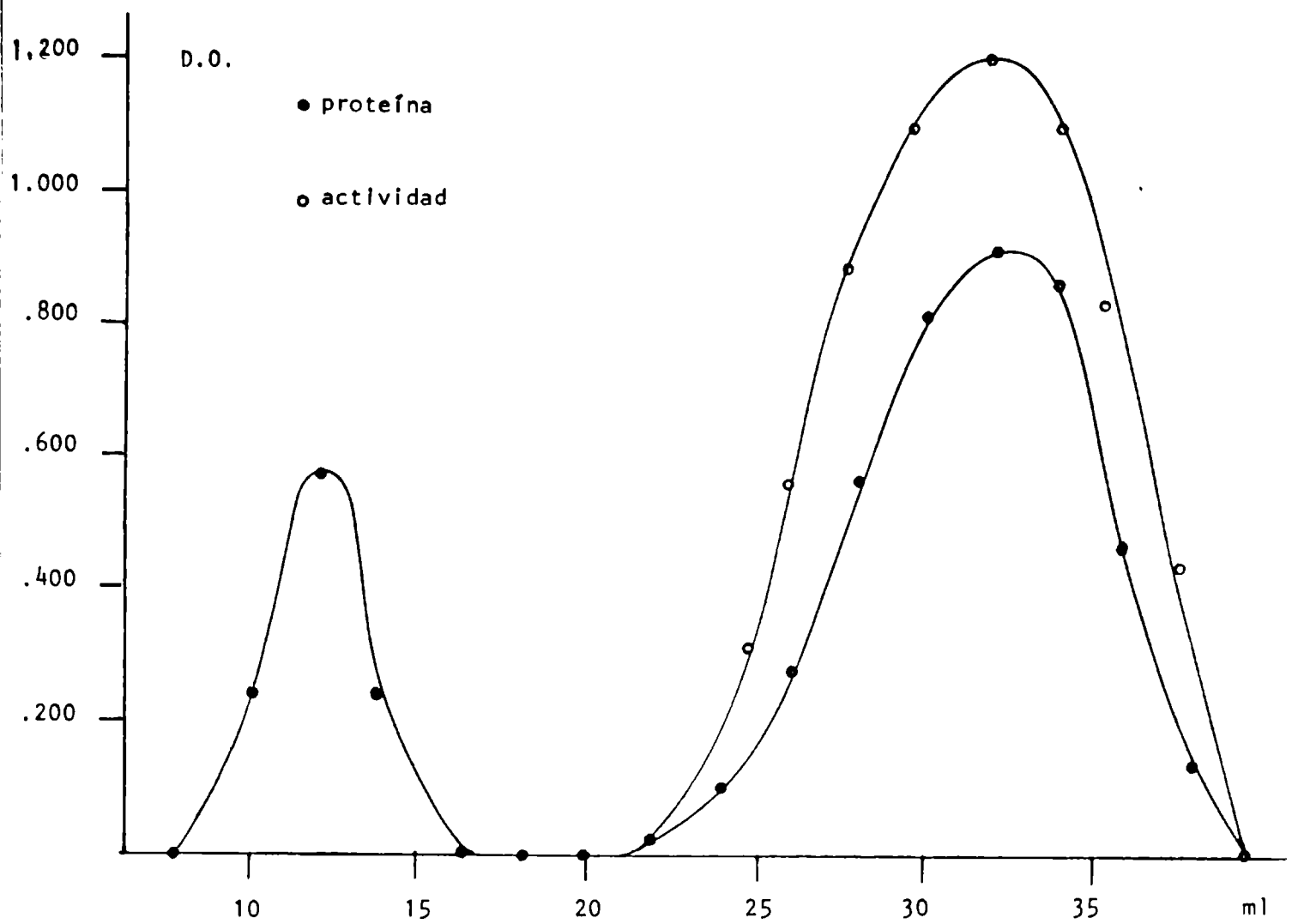


Figura 10. Perfil de elución de la enzima de *B. laciniosa* (Sephadex G-200-40, buffer fosfato de pH 6,3)

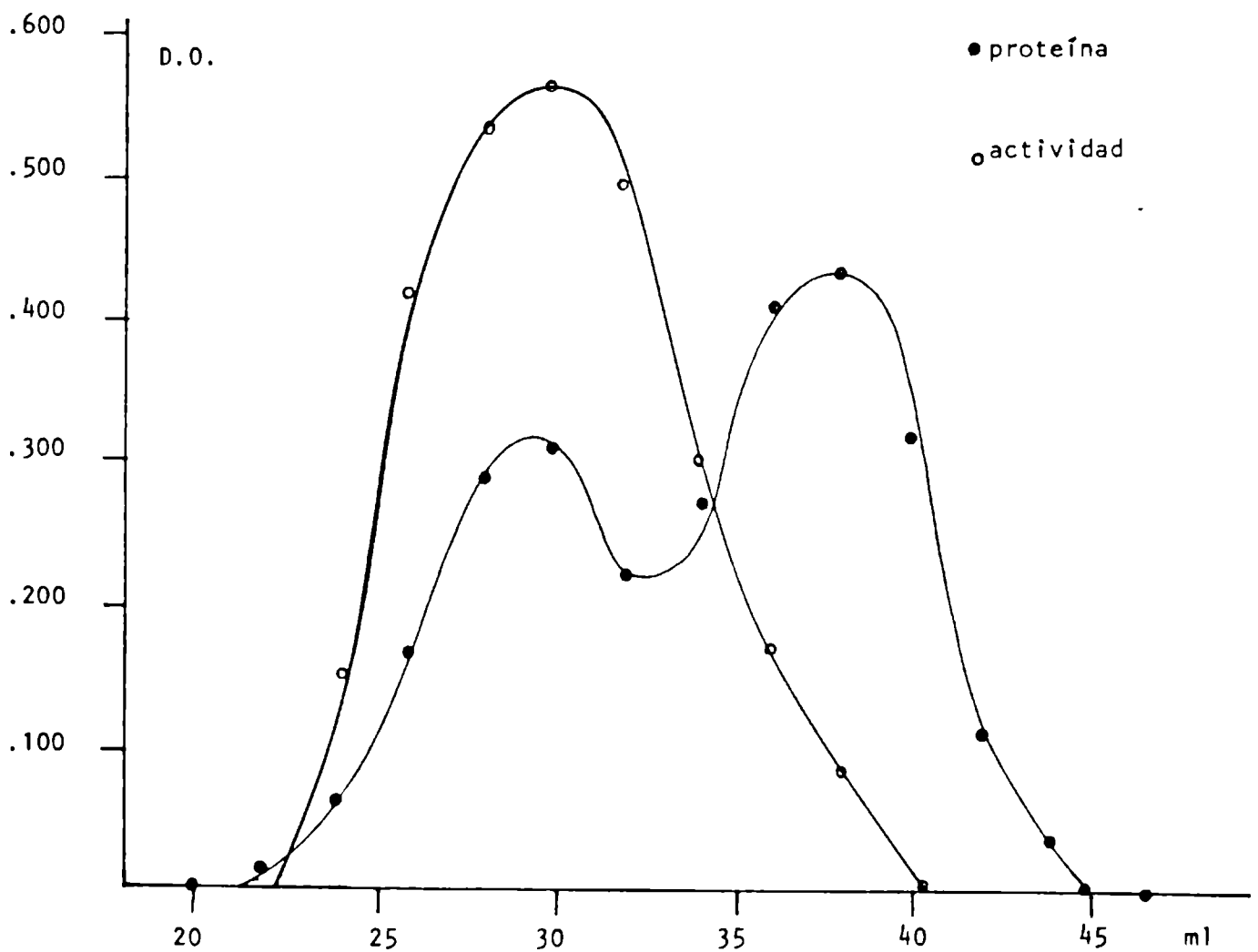


Figura 11. Perfil de elución de la enzima de *B. hieronymi* (Sephadex G-200-40, buffer fosfato de pH 6,3)

B. balansae *B. laciniosa* *B. hieronymi*

Rendimiento de jugo por peso de frutos (ml/100 g)	40,5	40,7	40,0
Rendimiento de enzima cruda por volumen de jugo (g/100 ml)	1,94	1,92	1,80
Rendimiento de enzima cruda por peso de frutos (g/100 g)	0,79	0,78	0,72
Actividad caseinolítica			
Concentración óptima de mercaptoetanol (mM)	17,5	17,5	12,5
Concentración óptima de cisteína (mM)	12,5	17,5	17,5
Temperatura óptima (°C)	45,0	55,0	55,0
pH óptimo [*]	6,3	6,3	6,3
Unidad de actividad	14,3	11,0	9,6
Actividad específica	0,070	0,091	0,104
Actividad amidásica			
Concentración óptima de mercaptoetanol (mM)	25,0	25,0	25,0
Temperatura óptima (°C)	30,0	40,0	40,0
pH óptimo ^{**}	7,5	6,6	6,6
Concentración óptima de BAA (mM)	25,0	25,0	25,0
Unidad de actividad	84,7	30,5	27,6
Actividad específica	0,012	0,033	0,036
Nitrógeno proteico (%)	13	21	24
Fracción proteica activa (%)	69	79	37
Relación entre enzima cruda y proteína activa	11	6	11

* en *B. laciniosa* y *B. hieronymi* hay un segundo pico a pH 7,8

** en *B. laciniosa* y *B. hieronymi* hay un segundo pico a pH 6,0

Tabla 3. Sinopsis de los resultados obtenidos

VII. CONCLUSIONES

Se han estudiado algunas propiedades de los productos enzimáticos crudos separados del jugo de los frutos de tres especies de *Bromelia* (Bromeliaceae) que crecen en el país: *B. balansae* Mez, *B. laciniosa* Mart. y *B. hieronymi* Mez.

El rendimiento de jugo es prácticamente el mismo en los frutos de las tres especies (40% V/P) y también lo es el de enzima cruda, que oscila entre 1,80 y 1,94 g/100 ml de jugo, valores superiores a los de bromelina de frutos (0,33-0,37%; Ota *et al.*, 1964), bromelina de tallos (1,68%; Toyama, 1969) y pingüinina (0,5-1%; Messing *et al.*, 1960).

Las enzimas son especialmente sensibles al agregado de activadores que contengan grupos sulfhidrilos y también su actividad se ve regularmente incrementada por la incorporación de cianuro al medio de reacción, pero -a diferencia de otras proteasas como papaína y ficina- los agentes quelantes como el EDTA no son eficaces como activadores en *B. balansae* y en *B. laciniosa*, aún cuando en *B. hieronymi* resulta casi tan efectivo como el cianuro. De todos modos el notorio incremento que manifiesta la actividad proteolítica ante la adición de mercaptoetanol y cisteína permiten

incluir decididamente a estas proteasas dentro del grupo de las enzimas proteolíticas de tipo sulfhidrílico.

Desde el punto de vista de su actividad caseinolítica y aún cuando el comportamiento de las preparaciones enzimáticas crudas de las tres especies es bastante similar, la de *B. balansae* se diferencia de las otras dos por su temperatura óptima algo menor (45°C), aún cuando las curvas de variación de la actividad con relación a la temperatura son coincidentes (en todos los casos existe un rango de 26 a 28°C alrededor de la temperatura óptima en el que la actividad no disminuye más de un 30%). Las diferencias son más notorias cuando se modifica el pH del medio, ya que la actividad de la enzima cruda de *B. balansae* -máxima a pH 6,3- declina suavemente al aumentar la alcalinidad del medio, en tanto que las curvas de pH de las otras dos especies exhiben dos picos abruptos de máxima actividad a pH 6,3 y 7,8.

Cuando se compara el comportamiento caseinolítico de las enzimas crudas estudiadas con los provenientes de otras especies de la familia Bromeliaceae, tales como bromelina de tallos y hemisfericina, se advierte un marcado parecido, que es más notorio en el caso de *B. laciniosa* y *B. hieronymi*. Efectivamente, la temperatura óptima de bromelina (Chen & Liu, 1972) es apenas superior al de éstas (57°C) y los pH óptimos tanto de bromelina (Chen & Liu, 1972) como de hemisfericina (Inei-Shizukawa *et al.*, 1976), cuyos valores respectivos son pH 7 y pH 8, también son cercanos.

Con respecto a la actividad amidásica y a diferencia del comportamiento de las enzimas frente a caseína, los perfiles de actividad que se obtienen al variar la temperatura son semejantes en *B. laciniosa* y *B. hieronymi*, con un valor óptimo a 40°C y un margen térmico estrecho en el que la actividad no es afectada significativamente (superior al 70% en un rango de 12 a 14°C en tor-

no a la temperatura óptima), pero en *B. balansae* adopta la forma de meseta poco elevada, con una temperatura óptima de 30°C y un margen más amplio (alrededor de 28°C) en el que la actividad se mantiene por encima del 70% del valor máximo. Al utilizar BAA como sustrato las enzimas crudas muestran un comportamiento frente a las variaciones de pH que es similar al observado con caseína, en el sentido que la correspondiente a *B. balansae* presenta un solo pico de máxima actividad (pH 7,5), mientras que en las de *B. laciniosa* y *B. hieronymi* hay un pico principal a pH 6,6 y un segundo pico a pH 6 donde la actividad hidrolítica es muy próxima al valor máximo. En todos los casos, pequeñas modificaciones en la escala de pH conducen a variaciones significativas en la actividad amidásica.

Al analizar la actividad BAA-ásica de bromelina nuevamente se puede constatar la semejanza que existe con las enzimas crudas de *B. laciniosa* y de *B. hieronymi* y en menor medida con la de *B. balansae*, ya que las condiciones óptimas de acción de la primera se logran a 50°C y pH 5-7 (Ota *et al.*, 1961). En cambio en el caso de pingüinina los valores de máxima actividad se obtienen a pH 4,3 (Toro-Goyco *et al.*, 1968).

Las enzimas crudas de las tres especies estudiadas presentan actividades caseinolíticas específicas que no difieren demasiado entre sí, ya que la de *B. hieronymi* -que es la más activa de las tres- supera sólo en un 50% a la de *B. balansae*, la de capacidad proteolítica menor.

Los valores de las actividades específicas de bromelina de frutos y de tallos, 0,150 y 0,350, respectivamente (Ota *et al.*, 1964), son 0,5 y 2,5 veces superiores a los de *B. hieronymi*.

En cuanto a la actividad amidásica específica las diferencias son más notorias, ya que tanto la enzima cruda de *B. hieronymi* como la de *B. laciniosa* son dos veces mayores que la de

B. balansae. Frente a BAA (Ota *et al.*, 1964), la bromelina de frutos es doblemente activa que la de tallos (0,125 y 0,064, respectivamente), por lo que en este sentido superan en 0,8 y 2,5 veces a las enzimas crudas mencionadas como más activas.

El contenido de nitrógeno proteico de los preparados enzimáticos crudos es bajo, donde las impurezas están principalmente representadas por hidratos de carbono. Por medio de gel-filtración se consigue separar en *B. laciniosa* y *B. balansae* un componente activo mayoritario de una fracción no activa de peso molecular más elevado. Lo contrario ocurre en *B. hieronymi*, donde la fracción activa está acompañada por un componente más abundante y de menor peso molecular. A pesar de las diferencias señaladas, las proteínas activas de *B. laciniosa* y *B. hieronymi* tendrían pesos moleculares del mismo orden, a juzgar por la similitud de sus volúmenes de elución en Sephadex G-200-40. La imposibilidad del fraccionamiento de la enzima cruda de *B. balansae* a través de dicho soporte impide efectuar la comparación equivalente.

Un hecho que debe tenerse en cuenta al evaluar las posibilidades de explotación de las especies estudiadas es su elevado rendimiento en enzima cruda, lo que compensaría en parte la aparentemente menor actividad de las mismas cuando se las compara con otras proteasas. De igual modo el bajo contenido proteico de los preparados crudos, así como la comprobación de la existencia de fracciones de esa naturaleza carentes de actividad proteolítica enfatizan acerca de la necesidad de insistir en la búsqueda de procedimientos que permitan la obtención de productos de mayor grado de pureza.

Finalmente y aún cuando no existen normas establecidas para la imposición de nombres triviales, siguiendo el criterio adoptado para otras enzimas proteolíticas aisladas de diferentes especies de *Bromelia* (Asenjo & Fernández, 1942; Cruz *et al.*,

1974) se proponen las denominaciones *balanseína*, *lacinosina* e *hieronymina* para las proteasas separadas del jugo de *Bromelia balansae* Mez, *Bromelia laciniosa* Mart. y *Bromelia hieronymi* Mez, respectivamente.

Meléndez

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS	
MESA DE ENTRADAS	
<input type="checkbox"/>	4 - DIC 1981
ENTRADA	
LETRA <u>100</u>	Nº <u>1475</u>

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abe, M., S. Arai y M. Fujimaki (1977) *Agric. Biol. Chem.* 41: 893-9
- Abe, M., S. Arai y M. Fujimaki (1978) *Agric. Biol. Chem.* 42: 1813-7
- Abe, M., S. Arai, H. Kato y M. Fujimaki (1980) *Agric. Biol. Chem.* 44: 685-6
- Abraham, K. I. y P. N. Joshi (1979a) *Biochim. Biophys. Acta* 568: 111-9
- Abraham, K. I. y P. N. Joshi (1979b) *Biochim. Biophys. Acta* 568: 120-6
- Amagase, S. (1972) *J. Biochem. (Tokyo)* 72: 73-81
- Arnon, R. (1965) *Immunochemistry* 2: 107-14
- Arnon, R. (1970) *Meth. Enzymol.* 19: 226-44
- Arnon, R. y E. Shapira (1967) *Biochemistry* 6: 3942-50.
- Asenjo, C. F. y M. del C. C. de Fernández (1942) *Science* 95: 48-9
- Ashton, F. M. y W. J. Dahmen (1967a) *Phytochemistry* 6: 641-53
- Ashton, F. M. y W. J. Dahmen (1967b) *Phytochemistry* 6: 1215-25
- Ashton, F. M. y W. J. Dahmen (1968) *Phytochemistry* 7: 189-97
- Atal, C. K. y P. D. Sethi (1962) *Planta Med.* 10: 77-90
- Baker, E. N. (1973) *J. Mol. Biol.* 74: 411-2
- Baker, E. N. (1980) *J. Mol. Biol.* 141: 441-84
- Balls, A. K., H. Lineweaver y R. R. Thompson (1937) *Science* 86: 379.
- Baumgartner, B. y M. J. Chrispeels (1977) *Eur. J. Biochem.* 77: 223-34
- Belozersky, M. A., I. B. Emtseva y T. A. Kursanova (1973) *Dokl. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Biol.* 209: 1215-8 (B.A. 57, 33983)

- Berger, J. y C. F. Asenjo (1939) *Science* 90: 2235.
- Berger, A. e I. Schechter (1970) *Phil. Trans. Royal Soc. (London)*
B 257: 249-64
- Bose, S. M. y W. Madhavakrishna (1958) *Enzymologia* 19: 186-200
- Brockbank, W. J. y K. R. Lynn (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 578: 13-22
- Brubacher, L. J. y M. L. Bender (1966) *J. Am. Chem. Soc.* 88: 5871-80
- Burger, W. X., N. Prentice, J. Kastenschmidt y M. Moeller (1968)
Rytochemistry 7: 1261-70
- Burger, W. C., N. Prentice y M. Moeller (1970) *Plant Physiol.* 46: 860-1
- Burger, W. C. y H. W. siegelman (1966) *Physiol. Plant.* 19: 1089-93
(B.A. 48, 56203)
- Burkart, A. (1952) "Las Leguminosas Argentinas Silvestres y Cultivadas"
Acme Agency, Bs. Aires, pág. 436
- Caffini, N. O., G. M. B. de Pfirter y M. S. B. de Cozzarin (1976) *Bol. Soc. Arg. Bot.* 17: 119-26
- Caldwell, J. B. y L. G. Sparrow (1976) *Plant Physiol.* 57: 795-8
- Caldwell, J. B. y L. G. Sparrow (1980) *Aust. J. Plant Physiol* 7: 131-40
- Cameron, E. C. y M. Mazelis (1971) *Plant Physiol.*48: 278-81
- Carey, W. F. y J. R. E. Wells (1972) *J. Biol. Chem.* 247:5573-9
- Carpenter, D. C. y F. E. Lovelace (1943) *J. Am. Chem. Soc.* 65: 2364-5
- Castañeda-Agulló, M., M. R. Balcazar y F. F. Gavarrón (1943) *Anales Escuela Nac. Cienc. Biol. México* 3: 65 (citado por Tauber (1949), pág. 173)
- Castañeda-Agulló, M., A. Hernández, F. Loaeza y V. Salazar (1945) *J. Biol. Chem.* 159: 751.
- Castellanos, A. (1945) en Descolle, M. R. "Genera et Species Plantarum Argentinarum", III, pág. 151

- Castells, A. R. C. de y M. T. Nájera (1974) Bol. Soc. Arg. Bot. 16: 66-78
- Catsimpoolas, N., S. K. Fund, J. Wang y J. Kenney (1971) J. Sci. Food Agric. 22: 79-82
- Cawley, L. P., L. Eberhardt y W. L. Goodwin (1964) Transfusion 4: 441-7
- Clancy, F. G. y M. D. Coffey (1977) Can. J. Bot. 55:480-8
- Cohen, W. (1958) Nature 182: 659-60
- Cruz, M. T., M. del C. Oliver, L. M. del Castillo y M. Castañeda-Aguiló (1974) Rev. Latinoam. Quím. 5: 18-25
- Chen, Y. y H. Liu (1972) Taiwanica 17: 266-76
- Chu, D. (1963) Acta Biochim. Biophys. Sinica 3: 139-46 (B.A. 46, 40447
- Deb-Sarma, G. D. (1942) Ann. Biochem. Exptl. Med. 2: 197-203
- Dimitri, M. J. (1978) "Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería", Tomo I. Vol. 1, Ed. Acme S.A.C.I., Bs. Aires, pág. 533
- Doi, E., N. Komori, T. Matoba y H. Morita (1980a) Agr. Biol. Chem. 44: 77-84
- Doi, E., N. Komori, T. Matoba y H. Morita (1980b) Agr. Biol. Chem. 44: 85-92
- Drenth, J., J. N. Jansonius, R. Koekoek, H. M. Swen y B. G. Wolthers (1968) Nature 218: 929-32
- Drivdahl, R. H. y K. V. Thimann (1977) Plant Physiol. 59: 1059-63
- Drivdahl, R. H. y K. V. Thimann (1978) Plant Physiol. 61: 501-5
- Dumitru, J. F. (1973) Acta Vitaminol. Enzymol. 27: 207-10
- Dunaevsky, Ya. E. y M. A. Belozersky (1974) Vestn. Mosk. Univ. ser. 6 Biol. Pochvoved. 29: 81-4

- Dunaevsky, Ya. E. y M. A. Belozersky (1980) *Biokhimiya* 45: 908-11
- du Toit, P. J. y J. C. Schabort (1978) *Phytochemistry* 17: 371-5
- du Toit, P.J., J. C. Schabort, P. G. Kempff y D. S. A. Laubscher (1978) *Phytochemistry* 17: 365-9
- Ebata, M. y K. T. Yasunobu (1962) *J. Biol. Chem.* 237: 1086-94
- Elleman, T. C. (1974) *Biochem. J.* 141: 113-8
- Ellis, W. J. y F. G. Lennox (1942) *Aust. J. Sci.* 4: 181 (citado por Tauber (1949) pág. 173)
- Emtseva, N. B. y M. A. Belozersky (1977) *Biokhimiya* 42: 726-34 (B.A., 65, 41864)
- Englund, P. T., T. P. King y L. C. Craig (1968) *Biochemistry* 7: 163-75
- Friedenson, B. e I. E. Liener (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 342: 209-12
- Frith, G. J. T., L. B. Swinden y M. J. Dalling (1978) *Plant Cell Physiol.* 19: 1029-42
- Fujimaki, M., M. Abe y S. Arai (1977) *Agric. Biol. Chem.* 41: 887-91
- Galdeano, H. L. y P. M. García (1975) *Bol. Soc. Arg. Bot.* 16: 413-9
- Garduño, R., M. Soriano, E. Chávez, M. T. Cruz, L. M. Del Castillo y M. Castañeda-Agulló (1974) *Rev. Latinoam. Quím.* 5: 243-8
- Garg, G. y T. K. Virupaksha (1970a) *Eur. J. Biochem.* 17: 4-12
- Garg, G. y T. K. Virupaksha (1970b) *Eur. J. Biochem.* 17: 13-8
- Greenberg, D. M. y T. Winnik (1940) *J. Biol. Chem.* 135: 761-87
- Hartley, B. S. (1960) *Ann. Rev. Biochem.* 29: 45-67
- Harvey, B. M. R. y A. Oaks (1974) *Plant Physiol.* 53: 449-52
- Hechkeppel, H. K. (1973) *Z. Pflanzenphysiol.* 69: 329-43
- Heinicke, R. M. y W. A. Gortner (1957) *Econ. Bot.* 11: 225-34

- Ihle, J. N. y L. S. Dure (1972a) J. Biol. Chem. 247: 5034-40
- Ihle, J. N. y L. S. Dure (1972b) J. Biol. Chem. 247: 5041-7
- Inei-Shizukawa, G., M. del C. Oliver, M. T. Cruz, L. M. Del Castillo y M. Castañeda-Agulló (1976) Rev. Latinoam. Quím. 7: 131-6
- Jordan, A. G. y M. A. Belozersky (1975) Vest. Mosk. Univ. Ser. 6. Biol. Pochvoved. 30: 115-7 (B.A. 62, 33925)
- Jordan, A. G. y M. A. Belozersky (1976) Biokhimiya 41: 673-8 (B.A. 63, 10958)
- Jaffé, W. G. (1943a) J. Biol. Chem. 149: 1-7
- Jaffé, W. G. (1943b) Rev. Brasil. Biol. 3: 149 (Citado por Greenberg (1955) Meth. Enzymol. 2: 54-64)
- Jansen, E. F. y A. K. Balls (1941) J. Biol. Chem. 137: 459-60
- Jones, I. K. y A. N. Glazer (1970) J. Biol. Chem. 245: 2765-72
- Joshi, P. N., V. Shankar, K. I. Abraham y K. Sreenivasan (1976) J. Chromatog. 121: 65-71
- Kaneda, M. y N. Tominaga (1975) J. Biochem. 78: 1287-96
- Kaneda, M. y N. Tominaga (1977) Phytochemistry 16: 345-6
- Kang, C. K. (1978) en "Encyclopedia of Food Science (M. S. Peterson y A. H. Johnson, eds.), The Avi Publishing Co. Inc., Westport, pág. 598
- Kar, M. y D. Mishra (1977) Biol. Plant. (Prague) 19: 365-9 (B.A. 65, 35929)
- Kimmel, J. R. y E. L. Smith (1954) J. Biol. Chem. 207: 515-31
- Klein, M. e I. Harpaz (1965) Phytochemistry 4: 327-32
- Kolehmainen, L. y J. Mikola (1971) Arch. Biochem. Biophys. 145: 633-42

- Koroleva, T. N., M. V. Aleskseeva, A. D. Shuton e I. A. Vaintraub
(1973) *Fiziol. Rast.* 20: 769-72 (B.A. 58, 4765)
- Kortt, A. A., S. Hamilton, E. C. Webb y B. Zerner (1974) *Biochemis-
try* 13: 2023-8
- Kubota, Y., S. Shoji, T. Fukanoshi y H. Ueki (1973) *J. Biochem. (To-
kyo)* 74: 757-70
- Kunimitsu, D. K. y K. T. Yasunobu (1967) *Biochim. Biophys. Acta*
139: 405-17
- Kunitz, M. (1947) *J. Gen. Physiol.* 30: 291-310
- Laufer, S., H. Tauber y C. F. Davis (1944) *Cereal Chem.* 21: 267-74
- Liener, I. E. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* 53: 332.
- Liener, I. E. y B. Friedenson (1970) *Meth. Enzymol.* 19: 261-73
- Lobareva, L. S., G. N. Rudenskaya y V. M. Stepanov (1973) *Biokhi-
miya* 38: 640-2 (B.A. 57, 45704)
- Lynn, K. R. (1973) *J. Chromatog.* 84 423-5
- Lynn, K. R. (1977) *Anal. Biochem.* 77: 33-8
- Lynn, K. R. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 569: 193-201
- Lynn, K. R., W. J. Brockbank y N. A. Clevette (1980) *Biochim. Bio-
phys. Acta* 612: 119-25
- Madhavakrishna, W. y S. M. Bose (1960) *Enzymologia* 22: 251-61
- Mainguy, P. N. R., R. B. Van Huystee y D. B. Hayden (1972) *Can. J.
J. Bot.* 50: 2189-95
- McDowall, M. A. (1970) *Eur. J. Biochem.* 14: 214-21
- Messing, R. A. (1960) *Enzymologia* 22: 117-25
- Messing, R. A., A. F. Santoro y A. Bloch (1960) *Enzymologia* 22: 110-6
- Michel, M. C. (1968) *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 8: 557-63

- Mikola, J. y L. Kolehmainen (1972) *Planta (Berl.)* 104: 167-77 (B.A. 54, 62947)
- Mikola, J. y K. Pietilä (1972) *Phytochemistry* 11: 2977-80
- Minami, Y., E. Doi y T. Hata (1971) *Agric. Biol. Chem.* 35: 1419-30
- Moeller, M., W. C. Burger y N. Prentice (1969) *Phytochemistry* 8: 2153-6
- Moeller, M., G. S. Robbins, W. C. Burger y N. Prentice (1970) *J. Agr. Food Chem.* 18: 886-90
- Murachi, T. (1970) *Meth. Enzymol.* 19: 273-84
- Murachi, T. y M. Yasui (1965) *Biochemistry* 4: 2275-82
- Murachi, T., M. Yasui y Y. Yasuda (1964) *Biochemistry* 3: 48-55
- Nájera, M. T. (1974) *Bol. Soc. Arg. Bot.* 15: 384-92
- Ofelt, C. W., A. K. Smith y J. M. Mills (1955) *Cereal Chem.* 32: 53-63
- Oliver, M. del C., L. M. Del Castillo y M. Castañeda-Agulló (1977) *Rev. Latinoamer. Quím.* 8: 155-60
- Ota, S., K. Horie, F. Hagino, C. Hashimoto y H. Dat (1972) *J. Biochem.* 71: 817-30
- Ota, S., S. Moore y W. H. Stein (1964) *Biochemistry* 3: 180-5
- Ota, S., T. Fu y R. Hiroata (1961)
- Pal, G. y N. K. Sinha (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 202: 321-30
- Peoples, M. B., G. T. Frith y M. J. Dalling (1979) *Plant Cell Physiol.* 20: 253-8
- Pfirter, G. M. B. de y M. S. B. de Cozzarin (1971) *Rev. Farm. (Buenos Aires)* 113: 226-8
- Pfirter, G. M. B. de, M. S. B. de Cozzarin y N. O. Caffini (1973a) *Rev. Farm (Buenos Aires)* 115: 98-9

- Pfirter, G. M. B. de, N. O. Caffini y M. S. B. de Cozzarin (1973b)
Rev. Farm. (Buenos Aires) 115: 48-50
- Pinsky, A. y S. Grossman (1969) J. Sci. Food Agric. 20: 374-5
- Prentice, N., W. C. Burger y M. Moeller (1968) Phytochemistry 7:
1899-905
- Prentice, N., W. C. Burger, M. Moeller y J. Kastenschmidt (1969)
Phytochemistry 8; 1897-900
- Preston, K. R. y J. E. Kruger (1976) Plant Physiol. 58: 516-20
- Racusen, D. y M. Foote (1970) Can. J. Bot. 48: 1017-21
- Ramírez, C., D. Osorio, R. Garduño, M. Castañeda-Agulló y L. M. Del
Castillo (1976) Rev. Latinoam. Quím. 7: 126-30
- Romero Castilla, J., M. del C. Oliver, M. T. Cruz, M. Castañeda-
Agulló y L. M. Del Castillo (1976) Rev. Latinoam. Quím. 7:
137-41
- Sair, L. (1974) en "Encyclopedia of Food Technology" (A. H. Johnson
y M. S. Peterson, eds.) The Avi Publishing Co. Inc., Westport,
pág. 513.
- Santarius, K. y H. D. Belitz (1978) Planta (Berl.) 141: 145-53
- Seidl, D. S. de y K. Gaede (1961) Nature 190: 1112.
- Sgarbieri, V. C, S. M. Gupte, D. E. Kramer y J. R. Whitaker (1964)
J. Biol. Chem. 239: 2170-7
- Shaw, D. C. y J. R. E. Wells (1972) Biochem. J. 128: 229-35
- Shinano, S. y K. Fukushima (1969) Agr. Biol. Chem. 33: 1236-43
- Shinano, S. y K. Fukushima (1971) Agr. Biol. Chem. 35: 1488-94
- Shinano, S., Y. Shimada y G. Tamura (1966) Nippon Nogei Kagaku
Kaishi 40: 185-9 (B.A. 47, 109358)

- Smith, E. L. y J. R. Kimmel (1954) J. Biol. Chem. 207: 533-61
- Amith, E. L. y M. J. Parker (1958) J. Biol. Chem. 233: 1387-91
- Soriano, M., M. T. Cruz., Y. Bustamante, L. M. Del Castillo y M. Castañeda-Agulló (1975) Rev. Latinoam. Quím. 6: 143-51
- St. Angelo, A. J., R. L. Ory y H. J. Hansen (1969a) Phytochemistry 8: 1135-8
- St. Angelo, A. J., R. L. Ory y H. J. Hansen (1969b) Phytochemistry 8: 1873-7
- St. Angelo, A. J., R. L. Ory y H. J. Hansen (1970) Phytochemistry 9: 1933-8
- St. Angelo, A. J., L. Y. Yatsu y A. M. Altschui (1968) Arch. Biochem. Biophys. 124: 199-205
- Sugiura, M. y M. Sasaki (1974) Biochim. Biophys. Acta 350: 38-47
- Takahashi, N., Y. Yasuda, K. Goto, T. Miyake y T. Murachi (1973) J. Biochem. (Tokyo) 74: 355-73
- Tauber, H. (1949) "The Chemistry and Technology of Enzymes", J. Wiley & Sons, N. York, pág. 165.
- Tauber, H. y S. Laufer (1949) en Tauber (1949) "The Chemistry and Technology of Enzymes, J. Wiley & Sons, N. York, pág. 171'
- Tipton, K. F. (1964a) Biochim. Biophys. Acta 92: 334-40
- Tipton, K. F. (1964b) Biochim. Biophys. Acta 92: 341-50
- Tipton, K. F. (1965) Biochim. Biophys. Acta 110: 414-22
- Toekes, Z. A., Wang Chee Woon y S. M. Chambers (1974) Planta (Berl.) 119: 39-46
- Toro-Goyco, E. y M. Matos (1964) Nature 203: 82-3
- Toro-Goyco, E. y M. Matos (1966) Nature 210: 527-9

- Toro-Goyco, E., A. Marezki y M. L. Matos (1968) Arch. Biochem. Biophys. 126: 91-104
- Toyama, S. (1969) Ryukyu Dagaku Nogakubu Gakujutsu Hokoku 16: 141-6
- Tsunoda, J. N. y K. T. Yasunobu (1966) J. Biol. Chem. 241: 4610-15
- Tully, R. E. y H. Beevers (1978) Plant Physiol. 62: 746-50
- Vavreinovas, S. y J. Turkova (1975) Biochim. Biophys. Acta 403: 506-13
- Walker-Simmons, m. y C. A. Ryan (1980) Phytochemistry 19: 43-8
- Walti, A. (1938) J. Am. Chem. Soc. 60: 493.
- Weil, J., A. Pinsky y S. Grossman (1966) Cereal Chem. 43: 392-9
- Wells, J. R. E. (1965) Biochem. J. 97: 228-35
- Wells, J. R. E. (1968) Biochim. Biophys. Acta 167: 388-98
- Williams, D. C., V. C. Sgarbieri y J. R. Whitaker (1968) Plant Physiol. 43: 1083-8
- Williams, D. C. y J. R. Whitaker (1969) Plant Physiol. 44: 1574-83
- Winnik, T., A. R. Davis y D. M. Greenberg (1940) J. Gen. Physiol. 23: 275-308
- Yamaha, F., N. Takahashi y T. Murachi (1976) J. Biochem. (Tokyo) 79: 1223-34
- Yasuda, Y., N. Takahashi y T. Murachi (1970) Biochemistry 9: 25-32
- Zemchik, E. I., M. T. Pham, A. D. Shuton e I. A. Vaintraub (1973b) Biokhim. Kul't. Rast. 5: 257-9 (B.A. 57, 45716)
- Zemchik, E. I., M. T. Pham, A. D. Shuton e I. A. Vaintraub (1975) Biokhimiya 40: 746-50 (B.A. 61, 69041)
- Zemchik, E. I., A. D. Shuton e I. A. Vaintraub (1973a) Biokhimiya 38: 964-70 (B.A. 58, 22157)

F E D E E R R A T A S

pág.	línea	dice	debe decir
5	29	terapéutica	terapéutico
17	17	ianctivada	inactivada
22	28	y la electroforesis	y electroforesis
27	5	enximas	enzimas
29	8	1978), en	1978) en
32	6	oir	por
41	1	"cebada-peptidasa A"	("cebada-peptidasa A")
42	19	hidjrolizar	hidrolizar
49	2	rnago	rango
50	19	propoenen	proponen
60	14	(978)	(1978)
88	10, 17	unidad de actividad	unidad de actividad (mg)

Acta N.º 581 —

— En la fecha se reunió el Jurado para dictaminar sobre el trabajo de tesis presentado por el ex-alumno de la carrera de Doctorado en Ciencias Biológicas (Orientación Biológica Clínica), señorita Marta Susana Pettazzoni titulado: "Ergisnos proteolíticas de frutos de algunas especies de Bromelia (Bromeliaceae) que crecen en el país", tema oportunamente oprobado. —

— Habiendo analizado el trabajo se procede a discutir la nota que el mismo merece, resolviéndose por unanimidad del Jurado oprobado, calificarlo con la nota de sobresaliente diez (10) —

En la fecha 15 de diciembre de 1981 —

Presentes: Dr. Eloy Canavale

Dr. Néstor Caffini

Dr. Santiago Storilo

Dr. Marta Najera

Dr. Procelio Boupioma

