

CARACTERIZACION PARCIAL DE UNA PROTEINASA PRESENTE EN LOS FRUTOS DE

Jacaratia dodecaphylla (Vell.)

PARTIAL CHARACTERIZATION OF PROTEINASE PRESENT IN THE FRUIT OF

Jacaratia dodecaphylla (Vell.)

Teresa Argüelles y Andrés¹

Graciela Fernández²

1. LInQuiF. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Nacional de Misiones. Calle Bertoní 124, (3382) Eldorado, Misiones.

2. Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján. Rutas 5 y 7, (6700) Pcia. de Buenos Aires.

SUMMARY

A proteolytic enzyme has been isolated from the pulp of fruits of *Jacaratia dodecaphylla*. Maximum protease activity was found at 52°C and at pH 7.5. The enzyme, like many previously studied proteases from plant sources, has a cysteinyl active center, as suggested by the inhibition of its activity by E-64 and PMSF. Divalent cations like Mn⁺⁺ and Mg⁺⁺ stabilize the enzyme activity, while Ni⁺⁺ and Cu⁺⁺ are inhibitors.

Key words: Proteolytic activity, fruits, *Jacaratia dodecaphylla*

RESUMEN

De la pulpa de frutos de *Jacaratia dodecaphylla* se ha aislado un enzima que muestra su máxima actividad proteolítica a una temperatura de 52°C, y a un pH de 7.5. El enzima, al igual que muchas proteinasas de origen vegetal, tiene un aminoácido cisteína en su centro activo, ya que su actividad es inhibida por el E-64 y el PMSF. Cationes divalentes como el Mg⁺⁺ y Mn⁺⁺ estabilizan su actividad, mientras que el Ni⁺⁺ y el Cu⁺⁺ la inhiben.

Palabras clave: Actividad proteolítica, frutos, *Jacaratia dodecaphylla*

INTRODUCCION

Desde hace cientos de años las plantas nos han suministrado productos que han sido utilizados en medicina, como alimentos, en cosmética (Chiej R., 1982). Es cierto que en la actualidad algunos productos sintéticos o semi sintéticos están reemplazando a los naturales, pero el reino vegetal aún nos provee de una gran cantidad de productos químicos, que se cosechan en los ecosistemas naturales o en los campos donde crecen las variedades "domesticadas" por el hombre.

En estos ecosistemas existen múltiples adaptaciones muy sutiles, entre las que se descubren mecanismos químicos para asegurar la supervivencia. La evidencia preliminar indica que la producción de proteinasas puede ser muy importante en algunas especies.

Los roles que las enzimas proteolíticas cumplen en los organismos vivos de los que tenemos conocimiento en la actualidad son múltiples:

Inhibidores y activadores de procesos (infectividad viral), inmunosupresores, reguladores por proteólisis limitada, etc., estas proteínas constituyen hoy en día uno de los modelos más utilizados para la aplicación de metodologías de manipulación y transformaciones genéticas y de ingeniería de proteínas (Avilés F.X., Guasch A. & Vendrell J., 1994).

El descubrimiento de nuevos enzimas proteolíticos y de los mecanismos donde intervienen sería de sumo interés para las biociencias en general y centraría el interés en la selva Alto Paranaense. Además de brindar nuevos conocimientos, una posible explotación industrial ayudaría a promover el desarrollo sustentable del ecosistema selva misionera.

El *Jacaratia dodecaphylla* (Vell.) es un árbol latescente y espinoso que puede alcanzar los 15 m de altura con un diámetro de 80 cm en el tronco, frecuente en el Parque Nacional Iguazú, donde se le puede encontrar con esas dimensiones. Es indígena del Brasil Paraguay y Nordeste argentino, extendiéndose hasta Santo Tomé en Corrientes (Santos Biloni J., 1990; Schultes R.E. & Raffauf R.F., 1990).

Este árbol posee una característica interesante. Debajo de su corteza se encuentra una pulpa blanda y comestible, que es fácil de obtener, porque el árbol, a pesar de su aparente robustez, no posee solidez, y es fácil derribarlo cuando se corta la corteza (Santos Biloni J., 1990). Sus frutos son bayas, muy cáusticas, que se pueden comer si primero se la tuesta, o cuando están muy, muy maduras.

Para averiguar el origen de la causticidad del

fruto y teniendo en cuenta la similitud que presenta el fruto y las semillas con el de la papaya (*Carica papaya*), se ensayó la actividad proteolítica en los tejidos del fruto, y hojas adultas.

MATERIALES Y METODOS

Durante los meses de febrero y marzo de 1997 se recogió material de árboles de *Jacaratia* ubicados en el arboretum de la Facultad de Ciencias Forestales, de la Universidad Nacional de Misiones, en Eldorado, Misiones.

Se recogieron bayas verdes y en distintos estados de maduración. Los estados de maduración del fruto se clasificaron en tres rangos:

Estadio 1: fruto de carne firme, de color amarillo - naranja, con algunas zonas verdosas.

Estadio 2: fruto de consistencia firme, con color uniformemente amarillo - naranja fuerte.

Estadio 3: exo y mesocarpio desintegramos, de un color naranja muy fuerte.

Se recogieron hojas jóvenes que habían alcanzado tamaño adulto.

Inmediatamente de recogido, el material fue lavado, secado en superficie, procediéndose a la determinación del contenido en proteína total mediante el método de Bradford (1976). Para la determinación de actividad proteolítica los tejidos fueron conservados en forma de polvo acetónico (Fernández G. y Lorenzo E. 1996). Cuando el tejido estuvo finamente dividido, se eliminó la acetona mediante succión suave.

Se estudió la actividad proteolítica de las distintas fracciones mediante su acción sobre caseína tipo Hammarsten (Sigma). La solución de caseína se utilizó recién preparada (López L.M.I., 1995).

Doscientos cincuenta miligramos de polvo acetónico se extrajeron durante tres horas a 4°C (5). El extracto crudo se filtró a través de tela, se centrifugó y el sobrenadante se utilizó recién preparado como "extracto de enzima".

La caracterización del enzima fue efectuada mediante el método de Kunitz (1977). La temperatura de reacción fue de 37°C en baño termostático, y la reacción fue detenida después de un tiempo de incubación de 20 minutos.

Se midió la absorbancia del sobrenadante en espectrofotómetro Camspec (U.K.) a 280 nm, después de haber diluido la muestra 2/10 en tampón fosfato, en todos los casos (Beynon R.J. & Bond J.S., 1989).

Para la determinación del pH óptimo de actividad se hizo variar el pH del tampón fosfato 0.1 M utilizado, desde el punto 5.0 al 8.0, con intervalos

de 0.5 unidades de pH, y una vez conocido el óptimo se procedió a trabajar con dicho pH para las otras determinaciones.

La estabilidad del enzima a 50°C se determinó manteniendo éste a dicha temperatura hasta un tiempo límite de 120 minutos. Con intervalos de 10 minutos, se sacaron las muestras y se colocaron en baño de hielo hasta que se ensayó la actividad caseinolítica como se describió anteriormente.

Los ensayos de inhibición se efectuaron según el método descrito por Beynon y Bond (1989). El control sin inhibidor fue tratado de la misma manera. Subsecuentemente las muestras fueron analizadas para actividad proteolítica de la forma descrita. Como inhibidores se utilizaron pepstatina A, fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), E-64 y orto fenantrolina.

Se ensayó la influencia de cinco cationes divalentes (Mn^{++} , Mg^{++} , Ca^{++} , Ni^{++} , Cu^{++}) sobre la actividad del enzima, añadiendo dichos cationes, a distintas concentraciones, al medio de incubación. Se ensayó también la influencia de la concentración salina del medio de incubación sobre la actividad caseinolítica del enzima.

Teniendo en cuenta la posibilidad de utilización del enzima en procesos industriales se considero pertinente conocer el comportamiento del enzima frente a distintas temperaturas y durante periodos de tiempo prolongados, en estos ensayos se mantuvieron las condiciones anteriormente citadas, ajustando el pH al óptimo, y variando la temperatura o el tiempo de incubación en los rangos que muestran los resultados.

Los ensayos de actividad con la papaína se efectuaron a 37°C y a pH 7.5 utilizando papaína comercial marca Anedra. Todas las condiciones fueron las fijadas.

Al tratar de medir la eficiencia relativa del enzima, para poder compararla con algún parámetro conocido, se efectuaron dos test paralelos utilizando en uno de ellos el extracto de enzima y en el otro soluciones de concentración conocida de papaína

RESULTADOS Y DISCUSION

El ensayo de actividad que se efectuó en las hojas y frutos de la planta dio como resultado una mayor actividad proteolítica en el fruto maduro, de buen color, que conserva la firmeza de su carne (gráfico 1, estadio 2). Dicha actividad decae bruscamente cuando la pulpa del fruto comienza a desintegrarse (gráfico 1, estadio 3). Al determinar que el fruto maduro, en el estadio 2, era el que presentaba

mayor actividad proteolítica, todas las demás determinaciones se hicieron utilizando dicho tejido, en forma de polvo acetónico

En las condiciones de nuestro ensayo, la actividad proteolítica detectada en las hojas (que representó el 2% de la detectada en el estadio 2 del

fruto maduro) se consideró despreciable (gráfico 1).

El gráfico 2 ilustra los resultados de la determinación del pH óptimo sobre el sustrato caseína, encontrándose el mismo claramente delimitado en un valor de 7,5.

Gráfico 1.- Actividad proteolítica en distintos tejidos de la planta

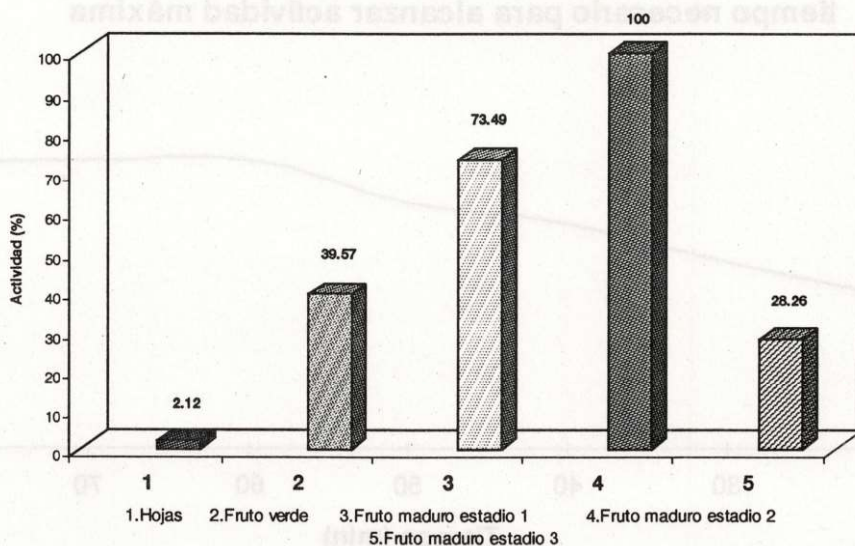


Gráfico 2. Variación de la actividad proteolítica en función del PH

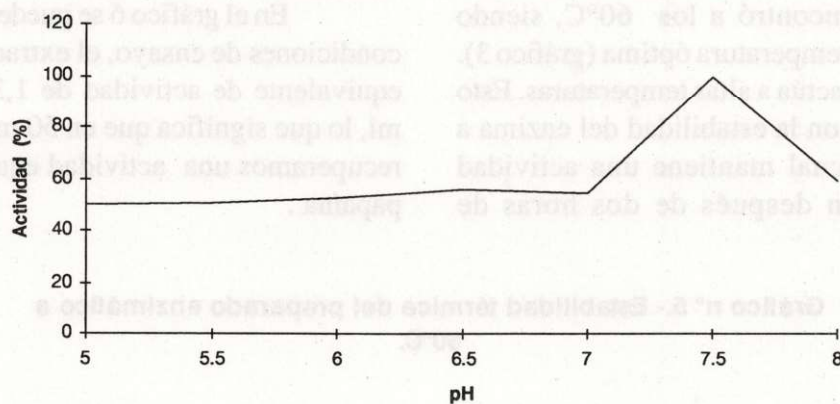
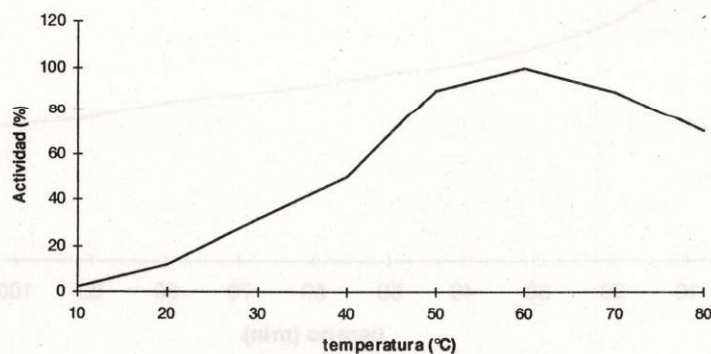


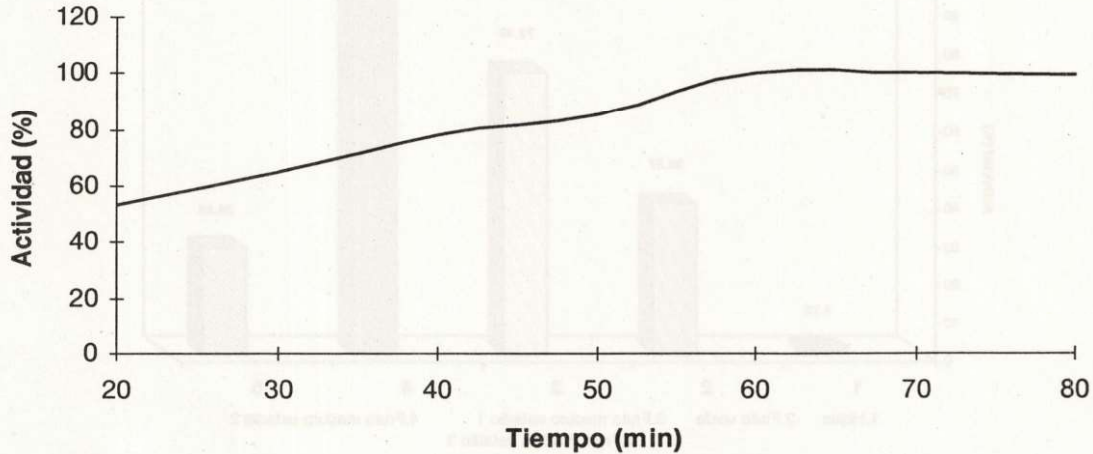
Gráfico 3.- Variación de la actividad proteolítica en función de la temperatura



Se midió la actividad del enzima respecto al tiempo en un baño de agua a 37°C igualmente sobre el sustrato caseína, en las mismas condiciones de incubación, al pH óptimo encontrado, y hasta el tiempo de duración del experimento (una hora y veinte

minutos) el enzima conservó su actividad, doblando a los sesenta minutos la actividad que presenta después de 20 minutos, decayendo muy ligeramente después (gráfico 4).

Gráfico 4. Actividad proteolítica y tiempo de incubación: tiempo necesario para alcanzar actividad máxima



La temperatura a la cual el enzima presenta mayor actividad se encontró a los 60°C, siendo aparentemente ésta su temperatura óptima (gráfico 3). Es pues un enzima que actúa a altas temperaturas. Esto está en concordancia con la estabilidad del enzima a 50°C (gráfico 5), la cual mantiene una actividad relativa del 30% aún después de dos horas de

tratamiento con una temperatura constante de 50°C.

En el gráfico 6 se puede observar que en estas condiciones de ensayo, el extracto de enzima tiene el equivalente de actividad de 1,3 mg de papaína por ml, lo que significa que en 50 mg de polvo acetónico recuperamos una actividad equivalente a 1,3 mg de papaína.

Gráfico n° 5.- Estabilidad térmica del preparado enzimático a 50°C.

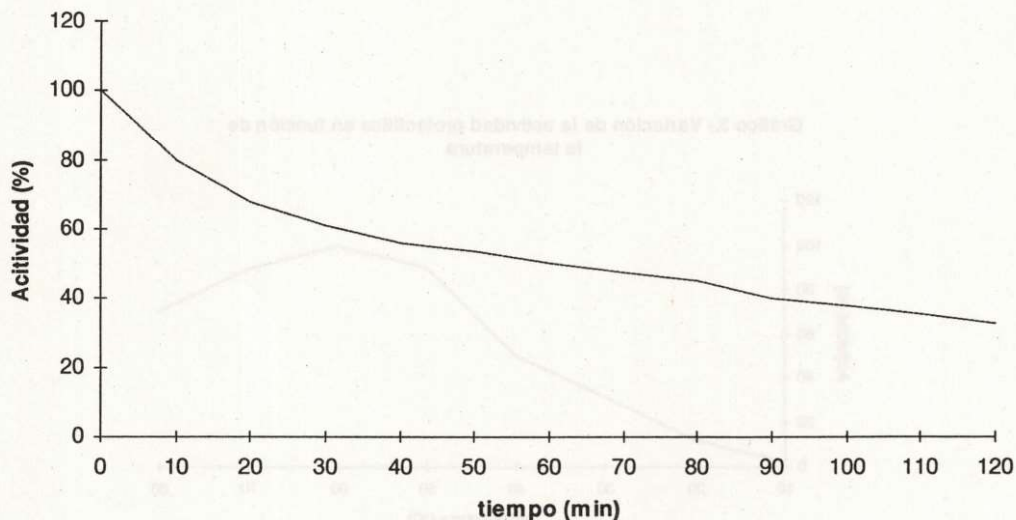
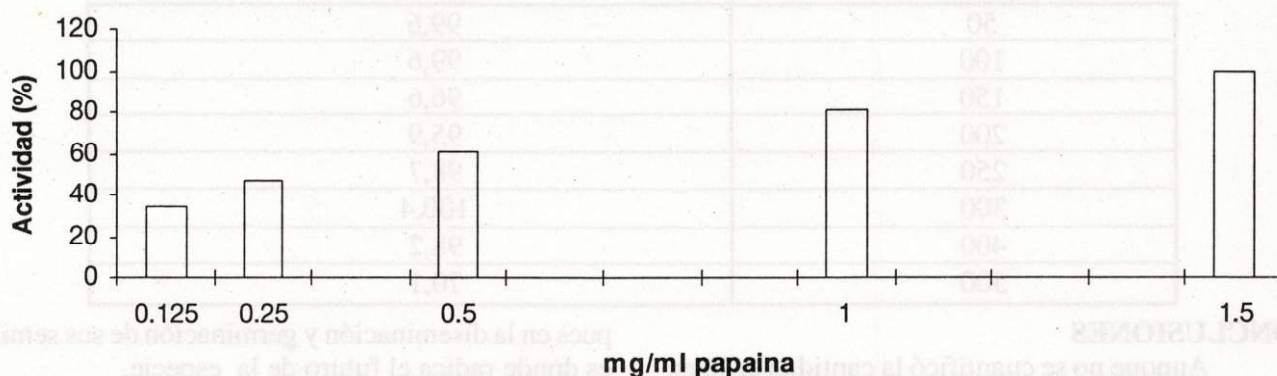


Gráfico 6.- Actividad caseinolítica de la papaina en función de su concentración.



Los datos de la tabla 1 nos muestran que la actividad enzimática es inhibida por el E-64 y el PMSF, inhibidores específicos del aminoácido cisteína, caracterizando el enzima en estudio como una cisteinil proteinasa.

Los resultados de la influencia de los cationes divalente ensayados, sobre la actividad proteolítica se resumen en la tabla 2. En dicha tabla se observa que los cationes Mn^{++} especialmente y Mg^{++} en menor proporción, no afectan la actividad del enzima en todas

las concentraciones ensayadas, mientras que dicha actividad se ve deprimida en presencia de iones Cu^{++} y de iones Ni^{++} .

Dentro de los rangos ensayados, la concentración salina del medio deprime la actividad del enzima a una concentración de 0.5M (tabla 3).

No se determinó si la actividad proteolítica estaba circunscripta al látex, en la pulpa del fruto (mesocarpio), o en ambos.

Tabla1.- Efecto de diferentes inhibidores sobre la actividad caseinolítica.

INHIBIDOR	CONCENTRACIÓN (mM)	ACTIVIDAD RELATIVA (en %)
Ninguno	-----	100
PMSF	1,00	0
Pepstatina A	0,010	100
O-fenantrolina	10,0	80
E-64	0,010	0

Tabla 2.- Influencia de los cationes divalentes sobre la actividad caseinolítica del extracto de jacaratina.

CONCENTRACION (mM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA RELATIVA (en %)		
	Ca^{++}	Mg^{++}	Mn^{++}
5,0	70,2	82,9	90,0
3,0	75,7	86,6	90,1
1,5	80,0	88,0	91,7
1,0	94,4	100,4	94,8
	Ni^{++}	Cu^{++}	
5,0	29,7	15,0	
3,0	32,0	17,7	
1,5	34,1	19,5	
1,0	57,8	37,0	

Tabla 3.- Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad caseinolítica del extracto enzimático.

CONCENTRACION ClNa (mM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA RELATIVA (en %)
50	99,6
100	99,6
150	96,6
200	95,9
250	98,7
300	100,4
400	98,2
500	70,1

CONCLUSIONES

Aunque no se cuantificó la cantidad de látex que segregan los frutos, se notó que el fruto que ha alcanzado tamaño máximo, pero todavía verde cuando se lacera, segrega más látex que el fruto que ya ha adquirido color, lo cual indicaría que, o bien la actividad proteolítica no tiene relación con la cantidad de látex, o bien el enzima está presente en el látex en forma de un precursor inactivo. Una explicación más simple podría ser que en el fruto al madurar los canales laticíferos se vayan desintegrando y que el látex no pueda fluir del fruto.

Se ha encontrado un nuevo enzima proteolítico cuya actividad parece corresponder con las características del lugar donde ejerce su acción. Es un enzima adaptado a trabajar a altas temperaturas, que muestra estabilidad en el tiempo, y buena tolerancia a la concentración salina y los iones que puede contener la pulpa de un fruto. Sea lo que sea no parece que se autodigiera fácilmente. Suponemos que esto es una característica de especialización. Necesitamos un nombre para el nuevo enzima: para la cisteinil proteinasa del Jacaratiá proponemos el nombre de "jacaratina".

¿Cuál es el rol de la enzima en el metabolismo del fruto?. Es observación cotidiana que el fruto es alimento de pájaros, éste tiene un tamaño y un color que lo hacen conspicuo para los pájaros, pero éstos solo se alimentan de él cuando comienza a desintegrarse.

Las semillas sólo germinan si provienen de frutos muy maduros. Sea cual sea la causa que hace que las semillas tarden tanto en madurar, el mecanismo por el cual el árbol se asegura que el fruto quede intacto hasta que las semillas estén biológicamente aptas para germinar es la causticidad del fruto, y un componente (o la responsable) de esa causticidad es la presencia de la enzima.

Seguramente la jacaratina posee otras acciones importantes para el metabolismo del fruto, además de esta simple acción que se describe aquí. Sin embargo por lo simple, no deja de ser valiosa,

pues en la diseminación y germinación de sus semillas es donde radica el futuro de la especie.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte de la tesis para alcanzar el grado de Doctor de la primera autora, y ha sido llevado a cabo parte en la Universidad de Luján y parte en la Universidad de Misiones. Agradecemos a los Directivos y Personal del Departamento de Ciencias Básicas de la UNLu, y a los de la Facultad de Ciencias Forestales de la UNaM las facilidades puestas a nuestra disposición para su concreción.

BIBLIOGRAFÍA

- AVILÉS, F.X., A. Guasch, & J. Vendrell. 1994. Activación de precursores de proteínas. Investigación y Ciencia. Marzo. Pg: 74 - 81.
- BEYNON, R.J. & J.S. Bond. 1989. Proteolytic enzymes, a practical approach. Oxford Univ. Press. Oxford.
- BRADFORD, M.M., 1976. Anal. Biochem. 72: 248 - 254.
- CHIEJ, R. 1982. Piante medicinali. Mondadori Edit. Milan
- FERNÁNDEZ, G. & E. Lorenzo. 1996. Caracterización Química de proteinasas extraídas de hojas de Cardo de Castilla. (*Cynara cardunculus* (L.)) VIII Simp. Latinoamericano de Farmacobotánica. Montevideo, Uruguay. Marzo.
- KUNITZ, M.J. 1977, Gern. Physiol. 30, 291 - 310.
- LÓPEZ, L.M.I. 1995. Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas presentes en el látex de frutos de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. (Moraceae). Tesis de Doctorado. Univ. Nacional de la Plata. Argentina.
- SANTOS BILONI, J. 1990. Árboles autóctonos argentinos. Tip. Edit. Bs. As. Argentina.
- SCHULTES, R.E., & R.F. Raffauf. 1990. The Healing Forest. Medicinal and Toxic Plants of the North-west Amazonia. Dioscorides Press. Oregon.