

ASLAMIENTO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS A PARTIR DE RESTOS DE COSECHA DE PIÑA

Martha Hernández[✉], Carol Carvajal, Margarita Márquez y María de los A. Chávez

ABSTRACT. Most of the worldwide enzyme production is destined to obtain proteases. Pineapple plants contain several cysteine proteases, the major isolated component of the stem is the so-called "stem bromelain" (EC 3.4.22.32), which has been traditionally used in food industry. However, in recent years, there is a renewed interest for this enzyme after its high antitumoral activity was reported. In the present study, bromelain extraction was obtained and patented through an experimental procedure. Yields of the optimized technology were 20.8 g of product.kg⁻¹ stems and 3.9 protein g.kg⁻¹ stems, with a specific activity of 1.36 U.mg⁻¹. The isolated product was very active (6 000 U.kg⁻¹) and stable, with a majority proteolytic fraction of 24 500 Da molar mass. The optimal pH is 7 and it is very stable in the pH range from 3 to 9 and temperatures till 50°C. The lyophilized product maintained 82 % of its activity at -20°C for one year.

RESUMEN. La mayor parte de la producción mundial de enzimas está destinada a la obtención de proteasas. Las plantas de piña contienen varias cisteino-proteasas, el componente mayoritario aislado del tallo es la "bromelina de tallo" (EC 3.4.22.32), que ha sido usada tradicionalmente en la industria alimentaria. Sin embargo, en los últimos años, existe un renovado interés por esta enzima a partir de la existencia de informes sobre su alta actividad antitumoral. En el presente estudio se diseñó y patentó un procedimiento de extracción de bromelina. La optimización de la tecnología demostró que se alcanzan rendimientos de 20.8 g de producto.kg⁻¹ de tallos y 3.9 g de proteínas.kg⁻¹ de tallos, con una actividad específica de 1.36 U.mg⁻¹. El producto aislado es muy activo (6 000 U.kg⁻¹) y estable, con una fracción proteolítica mayoritaria de masa molar 24 500 Da. Tiene pH óptimo 7 y buena estabilidad en un rango de pH de 3-9 y temperaturas de hasta 50°C. El preparado liofilizado mantiene el 82 % de actividad si se conserva a -20°C durante un año.

Key words: proteases, pineapples, extraction

Palabras clave: proteasas, piña, extracción

INTRODUCCIÓN

Las enzimas proteolíticas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de proteínas y participan en varios procesos fisiológicos, al estar involucradas en todo el ciclo de vida de las proteínas desde su biosíntesis, control de destino y activación, hasta su degradación (1). Se clasifican en clases y familias que están ampliamente distribuidas en animales, plantas y microorganismos. La bromelina (EC 3.4.22.32), miembro de la familia papaína, ha sido aislada de órganos de plantas de la familia Bromeliaceae. Se extrajo por primera vez del jugo de la piña a finales del siglo XIX. Es la más abundante de las cisteino-proteasas identificadas en extractos de órganos de la piña (2).

Las aplicaciones de estas biomoléculas con fines alimenticios y terapéuticos son muy variadas, algunas se reconocen como remedios naturales, otras como

fármacos modificadores de la respuesta biológica (3). La mayor y más antigua aplicación de la bromelina es como ablandador de carnes (4). Es también efectiva en la producción de hidrolizados y medios de cultivo (5). Tiene varias acciones farmacológicas: aumenta la absorción de otros medicamentos, inhibe la agregación plaquetaria y se ha utilizado como digestivo, antiinflamatorio, así como en la formulación de vacunas. En estudios recientes se demostró su actividad antitumoral y se ha informado que la bromelina induce respuestas del sistema inmune (6, 7).

La producción mundial de piña (*Ananas comosus* (L) Merr) ascendió en el 2000 a más de 13 millones de toneladas; de ellos 19 mil t se cosecharon en Cuba (8), una vez realizada la cosecha del fruto: las coronas, hojas y tallos se usan como abono, harinas para la alimentación animal, en la obtención de fibras para tejidos y papel, y fuentes de extracción de enzimas vegetales. Ciego de Ávila es la mayor región productora de piña del país, lo que posibilita contar con un alto potencial de residuos de cosechas. En el territorio se evalúan diferentes usos de estos desechos, con el interés de aprovecharlos en diversos sectores de la economía nacional. La obtención de bromelina representa una alternativa atractiva de aprovechamiento de esos residuos.

Dr.C. Martha Hernández, Investigador Agregado y Carol Carvajal, Especialista del Laboratorio de Ingeniería Metabólica, Centro de Bioplantas (UNICA), carretera a Morón, km. 9, Ciego de Ávila; Margarita Márquez, Especialista y Dra.C. María de los A. Chávez, Profesor Titular de la Facultad de Biología. Universidad de La Habana, calle 25 # 455, Vedado, ciudad de La Habana, Cuba.

✉ mhernandez@bioplantas.cu

Las proteasas de piña tienen un amplio espectro de aplicaciones ya establecidas. Sin embargo, estudios actuales que informan sobre su actividad antitumoral, la han convertido en una de las cisteino-proteasas más estudiadas. Estos resultados han renovado el interés por el desarrollo de nuevos métodos de aislamiento y purificación de la enzima, que posibiliten implementar estas novedosas aplicaciones en la esfera de la Biomedicina. Es por eso que el presente estudio se realizó con el objetivo de desarrollar un nuevo procedimiento de obtención de extracto crudo de bromelina a partir de desechos agrícolas, así como demostrar que la bromelina de tallo es la cisteino-proteasa mayoritaria en los extractos de tallos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las investigaciones se realizaron en el Centro de Bioplantitas (Universidad de Ciego de Ávila) y en el Centro de Estudios de Proteínas de la Facultad de Biología (Universidad de La Habana). El tratamiento estadístico se realizó con el empleo del utilitario 'Statistical Package for Social Sciences' (SPSS, versión 8.0 para Windows). Se realizaron pruebas paramétricas [análisis de varianza (ANOVA) y Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$] y pruebas no paramétricas (Mann-Whitney, Kruskal-Wallis y Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$). Además, se realizaron análisis de regresión. En todos los experimentos se procesaron nueve réplicas como mínimo. Las tablas y figuras incluyen la información de las pruebas realizadas.

Material biológico. Como fuente de obtención de bromelina se utilizaron tallos, coronas y hojas de plantas adultas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr) cv. Española roja, después de su tercera cosecha. En los experimentos se utilizaron reactivos de grado analítico SIGMA o similar.

Procedimiento de extracción. Se utilizaron 0.5 kg de material vegetal lavado y cortado en pequeños fragmentos. La molienda se realizó en una batidora comercial WARING (2 L). La proporción utilizada de la solución de extracción que contenía agua acidulada (pH 3) y un protector de los grupos SH del centro activo (sulfuro de sodio) fue 1:1.5 para los tallos y 1:2 para hojas y coronas (m/v). Al preparado enzimático se le determinó la concentración de proteínas y la actividad enzimática. El extracto crudo se llevó a sequedad por liofilización. Se procesaron 100 lotes de tallos.

Caracterización del extracto crudo de tallos

Concentración de proteínas. Se cuantificó por el método de Lowry *et al.* (9) y se expresó en $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ o $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de masa fresca referidos a una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA).

Actividad enzimática. Se determinó por el método de Anson (10) y se expresó en $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ o $\text{U}\cdot\text{kg}^{-1}$ de masa fresca (mf). Se empleó como sustrato hemoglobina desnaturada (Hb) al 2 %, pH 6.8. Una unidad (U) es la cantidad de enzima que cataliza la formación de $1\ \mu\text{mol}$ de tirosina por minuto a 37°C y pH 6.8. La actividad específica (A Esp) se calculó como el cociente de la AE entre la CP ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteínas).

Caracterización cinética. En los experimentos cinéticos se mantuvieron constantes todos los factores que afectan la velocidad de la reacción enzimática menos uno, que representó el factor variable. El ensayo se realizó a diferentes tiempos hasta 30 minutos para garantizar la determinación de la velocidad inicial ($[\text{E}]=0.2\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; $[\text{S}]=2\ \%$; pH 6.8; $T=37^\circ\text{C}$) y a diferentes concentraciones de enzima ($[\text{E}]=0.025\text{-}0.6\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 20 minutos de tiempo de ensayo. El estudio de la velocidad en función del pH se realizó desde pH 2 hasta 10 a una $[\text{E}]=0.1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; $[\text{S}]=2\ \%$; $T=37^\circ\text{C}$ y 20 minutos de tiempo de ensayo. En el caso de la temperatura, se procedió de igual forma pero a pH 6.8 en un rango de temperaturas de 5 a 70°C .

Estabilidad. Para la determinación de la estabilidad en función del pH, al extracto crudo se le ajustó el pH a valores de 2 a 10. Se determinó la AE frente a Hb (2 %, pH 6.8, 37°C , 20 min) cada 10 minutos para cada pH durante una hora. En el caso de la estabilidad térmica, el preparado se preincubó a 30, 37, 40, 50, 60 y 70°C . Se determinó la AE (Hb al 2 %, pH 6.8, 37°C , 20 min) cada 10 minutos durante una hora. Para la estabilidad de conservación, lotes de extracto crudo se conservaron congelados a -20°C y liofilizados (-5 y -20°C) durante un año. Se estudió el comportamiento de la A Esp en el tiempo.

Análisis electroforético

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se realizó por el método de Laemmli (11). Las muestras y los patrones desnaturados se aplicaron a geles al 12.5 %.

Electroforesis bi-dimensional. Se desarrolló de acuerdo al protocolo de Posada (12). Se utilizó como patrón gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH, MM 36 000 Da).

Masa molar. La masa molar (MM) de la proteína aislada se estimó por cromatografía de exclusión en geles de sephadex G-100 (1.3.7.2) y por electroforesis (1.3.5).

Determinación de la secuencia amino terminal de bromelina de tallo. El extracto crudo fue primeramente purificado por cromatografía de intercambio iónico en CMC-52 y luego por filtración en gel, el pico activo se aplicó a la columna RP-18-HPLC.

Cromatografía de intercambio iónico (CII). Se utilizó un sistema *semibatch* en pequeña escala. La CMC-52 se lavó varias veces con tampón NaAc $0.005\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5, se utilizaron 2 g de soporte por cada 10 mL de extracto. La enzima se fijó al soporte en *batch*. El extracto y la matriz se mezclaron en agitador magnético durante 30 minutos, tiempo en el cual se filtró a vacío y se desechó el sobrenadante. El soporte con la enzima se adicionó a una columna de $1.5\times 5\ \text{cm}$. Para eluir la proteína se utilizó NaAc $0.5\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a velocidad de flujo de $20\ \text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$. Se colectaron fracciones de 2 mL. A los máximos de $A_{280\ \text{nm}}$ se les determinó la AE, el pico mayoritario fue purificado nuevamente por cromatografía de exclusión en gel.

Cromatografía de filtración en Ge (CFG): La columna (1.6x90 cm) de Sephadex G-100 se equilibró con tampón acetato de sodio (NaAc), 0.005 mol.L⁻¹, pH 5. La velocidad de flujo se mantuvo constante a 10 cm.h⁻¹. Las muestras a aplicar se concentraron hasta 15-20 mg.mL⁻¹ de proteínas. Se colectaron 60-80 fracciones de 2 mL. A las fracciones recuperadas con máximos de A_{280 nm} se les determinó la CP y la AE.

Las muestras de bromelina purificada por la combinación intercambio iónico y filtración en gel se analizaron por HPLC (LKB-Pharmacia) en columna 100 RP-18 (4x250 mm, 5 µm tamaño de partícula). En cada caso se aplicaron como mínimo tres muestras a la columna. El sistema de solventes consistió en un gradiente 0-80 % de acetonitrilo: ácido trifluoroacético 0.1 % a velocidad de flujo de 0.5 mL.min⁻¹ durante 65 minutos. Se registró la A_{280 nm} y se compararon los tiempos de retención con un estándar de bromelina pura (SIGMA). Se colectaron las fracciones con máxima A_{280 nm} y se liofilizaron en SAVANT.

RESULTADOS

Procedimiento de extracción

Extracción de bromelina a partir de restos de cosecha. Las técnicas y los procedimientos utilizados para la obtención de enzimas proteolíticas, son costosos y complejos, lo que dificulta su producción a escala industrial. Con el fin de solucionar estos inconvenientes, se realizaron varios experimentos hasta diseñar una tecnología novedosa, sencilla y económica para la producción de bromelina en Cuba, a partir de restos de cosecha de las plantaciones piñeras (13). La estrategia desarrollada se basó, por una parte, en la utilización de un agente protector de los grupos SH del centro activo de la enzima que son fácilmente oxidables. El reactivo seleccionado fue el sulfuro de sodio (Na₂S, 1-3 mmol.L⁻¹) que combina una buena capacidad reductora con un bajo costo. Por otra parte, el uso de un rango de valores de pH ácido (2-4) para la extracción contribuye a minimizar la autoproteólisis.

En la Figura 1 se muestra la actividad proteolítica, concentración de proteínas y actividad específica de los extractos obtenidos a partir de diferentes desechos. La extracción se realizó a valores de pH 3, tanto para tallos como coronas y hojas.

Los mayores valores de AE se registraron para las extracciones de tallos (5357.9 U.kg⁻¹ de masa fresca), seguidos por los de coronas y hojas (879.8 y 72.7 U.kg⁻¹ de masa fresca), respectivamente. Al analizar la CP se distinguen valores similares en las cuantificaciones para tallos, coronas y hojas (3939.0; 3749.9 y 3633.6 mg.kg⁻¹ de masa fresca). Los mayores índices de A Esp (2.2 U.mg⁻¹ de proteínas) se observaron para el control (bromelina purificada), que se diferencia significativamente del resto de las preparaciones crudas de la enzima. De los preparados enzimáticos analizados, los mayores valores de actividad específica fueron de los tallos (1.36 U.mg⁻¹ de proteínas), seguidos de las coronas y hojas (0.23 y 0.02 U.mg⁻¹ de proteínas, respectivamente).

Rendimientos de la tecnología de extracción. En la Tabla I aparecen los rendimientos de la tecnología para los distintos restos de cosecha.

Tabla I. Rendimientos de la tecnología de extracción de bromelina para diferentes restos de cosecha

	Tallos	Coronas	Hojas
Masa fresca (kg)	0.5 a	0.5 a	0.5 a
Masa del extracto liofilizado (kg)	0.010 c	0.015 b	0.018 a
Rendimientos (g de producto.kg ⁻¹ de masa fresca)	20.8 c	30.4 b	37.0 a
Actividad enzimática (U.mL ⁻¹)	6.6 a	0.6 b	0.07 c
Actividad enzimática (U.kg ⁻¹ de masa fresca)	5357.9 a	879.8 b	72.67 c
Concentración de proteínas (mg.mL ⁻¹)	4.8 a	2.7 b	2.9 b
Rendimiento (g de prot.kg ⁻¹ de masa fresca)	3.9 a	3.7 a	3.6 a
Proteínas (%)	18.8 a	12.2 b	10.0 b
Actividad específica (U.mg ⁻¹ de proteínas)	1.36 a	0.23 b	0.02 c

* Medias con letras iguales para cada parámetro no difieren (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, p<0.05)

Los rendimientos en términos de producto sólido por kilogramo de material fresco son mayores para los extractos de hojas, seguidos de coronas y tallos. Sin embargo, independientemente de la parte de la planta utilizada, se logran valores de rendimientos de proteínas similares (3.6 a 3.9 g de proteínas.kg⁻¹).

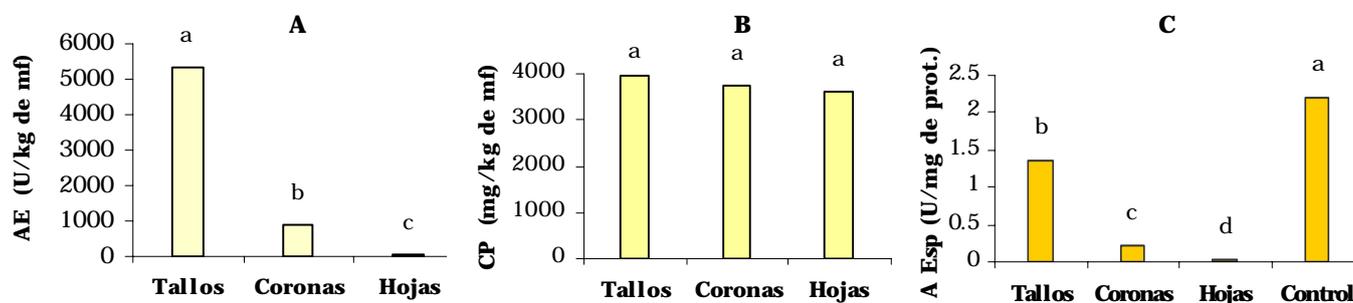


Figura 1. Comportamiento de la actividad proteolítica (A), la concentración de proteínas (B) y la comparación de la actividad específica (C) de extractos proteicos de diferentes órganos de piña comparados con bromelina purificada SIGMA. Medias con letras iguales no difieren (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, p< 0.05)

Por otra parte, los resultados más importantes, como criterio comparativo entre los órganos utilizados, son la AE en términos de $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ (6.6) y $\text{U}\cdot\text{kg}^{-1}$ (5357.9) y la A esp ($1.36 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteínas). Ambos valores son muy superiores en los extractos de tallos.

Caracterización del extracto crudo de tallos

Caracterización química y funcional. Se caracterizó el extracto crudo de tallos, por ser el órgano del que se obtienen preparados más activos y estables. Del estudio de la variación de la actividad con la temperatura, se obtuvieron los mejores resultados cuando la reacción ocurrió de 37 a 50°C , tal como aparece en la Figura 2.

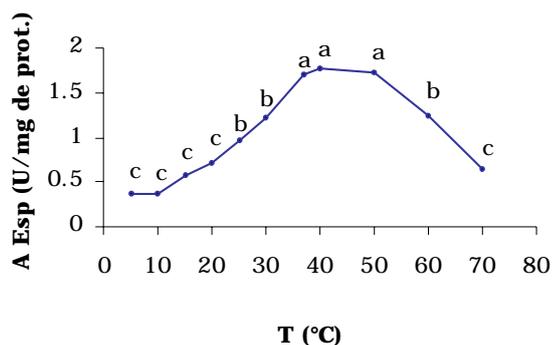


Figura 2. Efecto de la temperatura en la actividad de extracto crudo de tallos para la hidrólisis de hemoglobina (2%), pH 6.8, $[\text{E}]=0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 20 min. Medias con letras iguales no difieren (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$)

Al incubar el extracto enzimático a diferentes temperaturas y estudiar la variación de la actividad en el tiempo (Figura 3), se observó que la enzima es estable hasta 50°C ($\log \% \text{A Esp} = 2 - 0.001 \cdot t$), mientras que a 60°C ($\log \% \text{A Esp} = 2 - 0.009 \cdot t$) y 70°C ($\log \% \text{A Esp} = 2 - 0.019 \cdot t$) en el transcurso de una hora de incubada pierde aproximadamente el 30 y el 50 % de la actividad, respectivamente. Cuando se midió la variación de la actividad enzimática del extracto crudo incubado hasta 40 horas (resultados no mostrados), se comprobó que a 70°C pierde hasta el 90 % de la actividad entre una y dos horas, mientras que a 50°C es activa hasta las cuatro horas y a 40°C conserva la actividad durante 40 horas.

En la Figura 4 se representa el perfil de actividad en función del pH. El pH óptimo del extracto es alrededor de 7, si se utiliza Hb como sustrato y la reacción ocurre a 37°C durante 20 minutos. El preparado enzimático fue menos activo a valores de pH ligeramente ácidos; no se observaron diferencias significativas al conducir la reacción a pH 6.8 ó 7.

En la Figura 5 se observa el comportamiento de la estabilidad de la enzima en función del pH. El extracto enzimático es más estable en el rango de pH de 3 a 9.

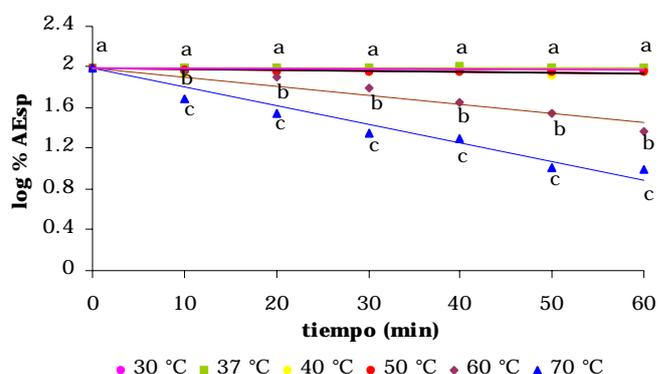


Figura 3. Comportamiento de la estabilidad térmica del extracto crudo de tallos ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) incubado a diferentes temperaturas. La actividad proteolítica frente a Hb (2%), pH 6.8, 37°C , 20 min. Se realizó análisis de regresión lineal para cada T ($n=21$) y pruebas paramétricas, en cada tiempo de evaluación. Medias con letras iguales no difieren [ANOVA (Análisis de Clasificación Simple), Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$]

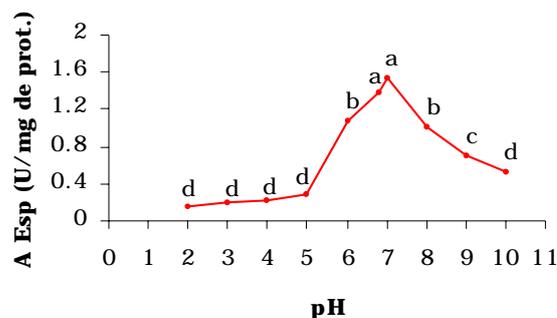


Figura 4. Comportamiento de la actividad específica ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteínas) de extracto crudo de tallos en función del pH, $[\text{S}]=2\%$, $[\text{E}]=0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 37°C , 20 min. Medias con letras iguales no difieren (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$)

La ecuación de regresión en el rango de pH 3 a 8 es: $\log \% \text{A Esp} = 2 - 0.001 \cdot t$. El valor de la constante de inactivación ($k=0.001 \cdot \text{min}^{-1}$) demuestra la alta estabilidad del preparado en ese rango, en las condiciones ensayadas. A pH 9 ($\log \% \text{A Esp} = 2 - 0.004 \cdot t$) solo al cabo de 60 minutos se observa un 10 % de pérdidas de la actividad inicial. El extracto es menos estable a pH 2 y 10 ($\log \% \text{A Esp} = 2 - 0.013 \cdot t$ y $\log \% \text{A Esp} = 2 - 0.009 \cdot t$), aunque entre estos dos valores hay diferencias. A pH 2 pierde el 40 % de la actividad en una hora, mientras que a pH 10 solo pierde el 20 %. En un estudio paralelo realizado, al incubar el extracto a pH 2, pierde el 92 % de actividad transcurridas 24 h; a pH 3, 4 y 5 la actividad se mantiene constante en este período, no así a pH de 6 a 9, donde se pierde hasta el 80 % de la actividad (resultados no mostrados).

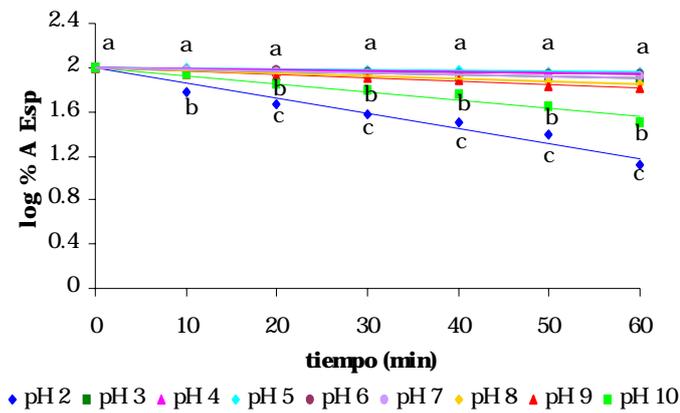


Figura 5. Comportamiento de la estabilidad del extracto crudo de tallos (0.1 mg.mL^{-1}) incubado a diferentes pH. Se midió la actividad proteolítica cada 10 minutos frente a Hb (2%), pH 6.8, 37°C , 20 min. Se realizó análisis de regresión lineal para cada pH ($n=21$) y pruebas paramétricas, en cada tiempo de evaluación. Medias con letras iguales no difieren [ANOVA (Análisis de Clasificación Simple), Student-Newman-Keuls, $p<0.05$)]

El mantenimiento de la actividad proteolítica depende, entre otros factores, del tiempo de conservación. En el caso de los lotes que se mantuvieron congelados a -20°C , desde el principio la actividad comenzó a descender y mantuvo esa tendencia hasta los 12 meses. La actividad residual de los lotes congelados al año fue el 30 % de la actividad original, mientras los extractos liofilizados conservados a 5 y -20°C mantuvieron el 70 y 82 % de la actividad, respectivamente. Los resultados sugieren que la liofilización es el mejor modo de conservación para la proteasa.

Análisis electroforéticos. Con el objetivo de continuar la caracterización del preparado enzimático, a fracciones purificadas se les realizaron estudios de electroforesis bidimensional (2D). Los resultados en la segunda dimensión aparecen en la Figura 6. Las muestras se compararon con un patrón carbamilado de GAPDH (36 000 Da, $pI=8.5$). La enzima purificada por la combinación de cromatografía de intercambio iónico en CMC-52 y cromatografía de exclusión en geles de Sephadex G-100 mostró una banda única en la zona de pH básico. El punto isoeléctrico (pI) fue de 9.55, mientras que la masa molar obtenida al procesar la imagen fue de 24 500 Da, valor que coincide con los más actuales informados para la bromelina de tallo (14).

Masa molar. La determinación de la masa molar se realizó por CFG. La mejor recta obtenida por regresión lineal de la calibración de la columna con proteínas de masa molar conocida fue: $K_{av}=1.625-0.31 \cdot \log MM$ ($R^2=0.981$). El volumen de elución de la bromelina en más de 10 corridas cromatográficas (82 mL), K_{av} (0.2622) permite obtener un valor de MM de 24 878 Da. Además, se analizaron

los geles electroforéticos con el procesador de imágenes ELECTROBAN (15). La MM de la banda mayoritaria (66.35 %) con respecto a los patrones, resultó ser de 24 930 Da ($RF=0.53$) para SDS-PAGE y 24 500 Da para la electroforesis bidimensional.

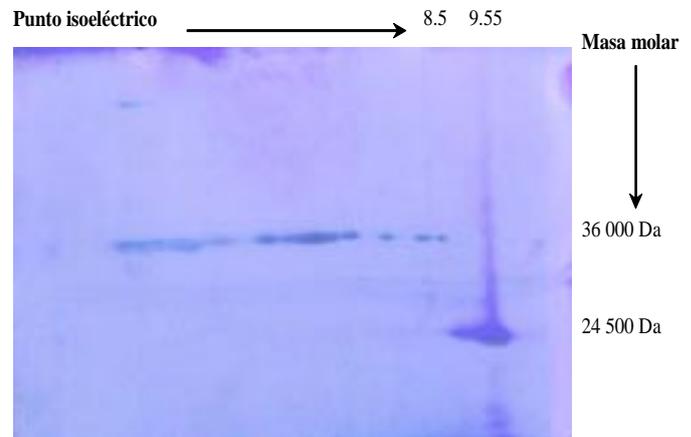


Figura 6. Electroforesis bi-dimensional de extractos de tallo de piña purificados por la combinación de cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel, junto al patrón GAPDH en gradiente de pH inmovilizado (IPG 6-11)

Secuencia amino terminal de la bromelina de tallo. Una comparación entre los aminoácidos del extremo amino terminal de la secuencia original propuesta para la bromelina de tallos (16), con la secuencia parcial obtenida, permite comprobar la homología entre las moléculas y verificar que la enzima aislada es bromelina de tallo (EC 3.4.22.32).

Bromelina de tallo	VPQSIDWRDYGAVTSVKQNPCGACW
Proteína aislada	VPQSIDWRDYGAVTSVKQNPCGAC

DISCUSIÓN

La bromelina de tallo de piña es una enzima proteolítica que ha sido muy utilizada en la industria alimentaria para el ablandamiento de carnes (4). También se ha usado en la industria farmacéutica como medicamento antiinflamatorio y digestivo (3). Sin embargo, en la actualidad hay un renovado interés por esta proteasa desde que fue descrita por su actividad antitumoral y antimetastazante frente a algunos tumores (6, 7). Por otro lado, la demanda creciente de vías alternativas para la alimentación animal y humana mantiene la necesidad, en especial en los países en vías de desarrollo, de contar con enzimas naturales propias, capaces de hidrolizar eficientemente fuentes alternativas de alimentación.

La presencia de bromelina en extractos de diferentes órganos de plantas de piña se conoce desde hace más de 30 años y se han informado varios procedimientos para su extracción, atendiendo a contaminantes proteicos y glúcidos (8). En general, los procesos descri-

tos hasta la fecha se caracterizan por el uso de solventes orgánicos durante la extracción, precipitación por salado o fraccionamiento por cambios de temperatura. De los métodos publicados, el de mayor similitud al desarrollado en el presente estudio fue patentado en Rusia (17). Sin embargo, la extracción de bromelina de restos de cosecha y desechos industriales, se realizó con agua o una solución de bicarbonato de amonio ($0.03\text{-}0.06\text{ mol.L}^{-1}$); no se utilizaron agentes protectores del centro activo y se trabajó a pH cercano al óptimo de actividad (pH 8), lo que evidentemente no contribuye a garantizar la estabilidad de la enzima.

La tecnología utilizada aquí es sencilla y económica porque solo se requiere, en cantidades mínimas, de un ácido (H_2SO_4) y una sal (Na_2S) para preparar una solución que posibilita proteger los grupos -SH del centro activo de la enzima y trabajar a un pH alejado del óptimo. Con esto, se evita la oxidación de este grupo esencial que tiene la enzima para la catálisis y se disminuyen las pérdidas de actividad por autoproteólisis y otras modificaciones estructurales. Se han descrito muchos agentes reductores que garantizan la protección de los grupos SH en enzimas que dependen de estos para una catálisis efectiva, tales como β -mercaptoetanol, ditiotretol, entre otros. Estos reactivos generalmente se adicionan a los ensayos de actividad de estas enzimas y son caros, mientras el sulfuro de sodio es económico, lo que facilita que pueda ser utilizado durante la extracción garantizando la activación de todo el extracto. Es la primera vez que este reactivo se utiliza con estos fines.

El método empleado en el presente estudio permitió extraer cantidades similares de proteínas ($3.7\text{-}3.9\text{ g}$ de proteínas. kg^{-1} de masa fresca), independientemente del órgano utilizado. Sin embargo, los mayores valores de actividad proteolítica en términos de U.kg^{-1} se registraron para los preparados de tallos (70 veces más activo que el de hojas y seis más que el de coronas). Resultados similares se informaron al lograr la mayor recuperación de la enzima ($0.1\text{-}0.6\%$) y la actividad enzimática más alta a partir del tallo (2).

Durante la extracción, se observó en las hojas y coronas la presencia en mayores concentraciones de compuestos fenólicos que se oxidan rápidamente y forman complejos con las proteínas, disminuyendo la actividad proteolítica, lo que contribuye a los bajos valores de actividad para extractos de estos órganos. Esto unido a los posibles usos de las coronas y hojas (material de reimplantación, alimento animal, abono, fibras para tejidos) corroboran las ventajas de aprovechar los tallos como fuente de obtención de bromelina. De estos se obtienen los extractos más activos y una vez demolidas las plantaciones, se consideran desechos contaminantes de los suelos.

El procedimiento desarrollado en este estudio, para la obtención de un extracto de bromelina a partir de tallos, posibilitó alcanzar rendimientos de hasta 20.7 g de extracto. kg^{-1} de tallos y 3.9 g de proteínas. kg^{-1} de tallos, o sea, un 18.8% del producto corresponde a proteínas.

La comparación en términos de rendimientos con otras tecnologías más complejas descritas no siempre es posible, ya que todos los autores de patentes no informan los mismos parámetros. Sin embargo, estos valores son superiores a los informados para la extracción con solventes orgánicos ($2\text{ a }5\text{ g}$ de extracto. kg^{-1} de masa fresca). No existen informes sobre el rendimiento en términos de proteínas. Los valores obtenidos en el presente trabajo son comparables o incluso en algunos casos superiores a los informados en la literatura (2, 5). No se publicaron informes sobre los rendimientos obtenidos en la patente rusa (17).

En relación con los valores de actividad enzimática obtenidos frente a hemoglobina como sustrato (6.6 U.mL^{-1} , 6000 U.kg^{-1} de tallo), estos fueron superiores a los logrados en todos los procedimientos descritos (2, 5). Los valores de actividad específica (1.36 U.mg^{-1} de proteínas) son comparables o superiores a los citados en la literatura: $1\text{-}1.2\text{ U.mg}^{-1}$ de proteínas con el proceso patentado en Rusia (17).

En particular, el simple proceso de extracción empleado estimula a la reflexión; al comparar los extractos de tallos con los de la bromelina purificada (SIGMA), esta es solo 1.6 veces más activa que el producto obtenido del tallo. Es evidente que la tecnología desarrollada en estos estudios no solo es más simple y económica, sino también eficaz en cuanto a rendimientos y calidad (actividad) del preparado enzimático. Esto se debe fundamentalmente a que se minimiza la autoproteólisis a valores de pH ácidos y se logra la protección-activación de los grupos SH. Ninguno de estos enfoques había sido utilizado antes en la obtención de bromelina. A esto sumamos que la simplicidad de la tecnología garantiza una menor pérdida de actividad. Estos factores contribuyen a que aún sin utilizar procedimientos de purificación como la precipitación, que incrementa los valores de actividad específica de los preparados enzimáticos, se obtengan valores de actividad específica en el rango o superiores a los obtenidos por otros autores.

Teniendo en cuenta que en la caracterización cinética del extracto crudo, se utilizó un método discontinuo de determinación de la actividad proteolítica frente a un sustrato complejo (hemoglobina), se garantizó que los ensayos se realizaran a velocidad inicial y se trabajó en un rango lineal de velocidad en función de la concentración de enzima. Son muchos los factores que pueden contribuir a la desviación de esta relación lineal, lo que constituye la base esencial de la evaluación cuantitativa de enzimas (18). La utilización de hemoglobina como sustrato para la caracterización de bromelina es ventajosa, ya que es un modelo más cercano a la mayoría de las aplicaciones biotecnológicas de la enzima. El estudio funcional del extracto crudo de bromelina confirmó la presencia de un preparado muy activo y estable, cuyo valor de pH óptimo para la hidrólisis de hemoglobina a 37°C durante 20 minutos es alrededor de 7. En relación con los valores de pH óptimos de esta enzima frente a

sustratos complejos, ha habido muchas contradicciones en la literatura. Así, se ha demostrado que frente a proteínas naturales, las mayores velocidades de reacción se logran cuando el ensayo se conduce a pH neutro (2), resultado corroborado en este trabajo.

Los estudios de estabilidad en función del pH permitieron comprobar que el extracto es en general estable en un rango amplio de pH, desde 3 hasta 9. La pérdida de actividad a pH 2 coincide con otros resultados (19), que en un estudio de desnaturalización ácida de bromelina presentaron la carencia de una estructura terciaria definida a pH 2, con pérdidas de la estructura secundaria principal a valores de pH inferiores a 4.5 hasta formar un estado no plegado ácido a pH 2, mientras que la proteína conserva la estructura terciaria a valores de pH neutro.

La velocidad de la mayoría de las reacciones químicas aumenta con el incremento de la temperatura. En el caso de las reacciones en que intervienen enzimas, el incremento esperado de la velocidad puede ser anulado por el aumento de la velocidad de desnaturalización. En este sentido, es necesario tener en cuenta que el valor de temperatura óptima de una reacción enzimática depende fuertemente de las condiciones experimentales, ya que factores como la concentración de enzima, la concentración de sustrato, el pH, la fuerza iónica y en especial el tiempo del ensayo afectan la estabilidad conformacional de la molécula. Aún en condiciones idénticas, pequeñas diferencias en la duración del ensayo pueden cambiar drásticamente estos valores (18). El extracto crudo de bromelina evaluado mostró un rango amplio de temperatura (hasta 50°C), donde la actividad fue máxima en las condiciones de pH, concentración de enzima, concentración de sustrato y tiempo ensayados, es decir, 20 minutos. Se informó que la mayor capacidad calórica para la hidrólisis de sustratos complejos, como proteínas (2), durante 30 minutos de reacción enzima-sustrato, se logra a 40°C y a medida que la temperatura aumenta se incrementa la pérdida de la actividad. Estas diferencias encontradas para una misma enzima pueden estar relacionadas con el grado de pureza del preparado enzimático, la concentración de enzima y el tiempo, entre otros factores.

En este estudio se obtuvo un rango de temperatura óptima desde 37 hasta 50°C con igual actividad enzimática, lo que indica que el efecto de desnaturalización ya comienza desde 37°C y no posibilita un aumento de la velocidad con la temperatura. Sin embargo, los resultados de los ensayos de estabilidad térmica indican que la enzima es estable a 50°C durante cuatro horas y hasta 40°C durante 40 horas. Esta contradicción solo podría explicarse si la desnaturalización, que evidentemente comenzó desde temperaturas inferiores, es un proceso reversible, de modo que la enzima preincubada hasta 50°C recupera su conformación nativa en el ensayo de actividad en condiciones óptimas. Este no es el caso del experimento de actividad en función de la temperatura.

La conservación en el tiempo de las enzimas sin pérdida de actividad es muchas veces un problema. Para prevenir pérdidas de actividad, las muestras deben congelarse a muy bajas temperaturas (-20 ó -40°C). La liofilización es un método recomendable, que frecuentemente rinde un polvo soluble y activo (18). En los estudios de conservación del extracto crudo en el tiempo, se observó que la liofilización es el mejor método para conservar el producto. El preparado crudo de bromelina mantuvo hasta un 80 % de su actividad durante un año, lo que resulta satisfactorio teniendo en cuenta que se han informado pérdidas de hasta el 40 % durante ese tiempo (14).

Desde que se realizaron los primeros aislamientos de bromelina, la masa molar ha sido muy estudiada y se han informado resultados contradictorios en dependencia del grado de pureza del extracto. En investigaciones realizadas (2), la masa molar por análisis de los perfiles electroforéticos resultó ser de 26 000 Da. Resultados más recientes, por espectroscopía de masa, refieren un valor de 24 500 Da (14). Este valor coincide con la masa molar determinada por electroforesis bidimensional en este estudio.

La purificación de la enzima posibilitó su secuenciación en la región amino terminal (25 aminoácidos), que identifican sin ambigüedad que el pico mayoritario con actividad proteolítica, desde el extracto hasta el preparado de mayor pureza, corresponde a bromelina de tallo (16). La masa molar y el punto isoeléctrico también coinciden con los descritos para esta enzima (14, 19). Esta identificación constituye un control de calidad de los preparados enzimáticos, lo que demuestra sus potencialidades de uso en la industria y biomedicina.

CONCLUSIONES

- ✱ El diseño de condiciones de extracción, en las que se utilizan protectores del centro activo de la enzima, a un pH cercano al fisiológico de la planta y alejado del óptimo, permitieron desarrollar un método novedoso, sencillo y económico, para la obtención de un preparado crudo de bromelina de tallo de piña con altos rendimientos de proteína y actividad enzimática.
- ✱ La caracterización del extracto crudo de tallos permitió comprobar la presencia de un preparado enzimático muy activo y estable, con una fracción proteica mayoritaria de masa molar igual a la descrita para bromelina de tallo, un valor de pH óptimo cercano a 7 frente a hemoglobina, buena estabilidad en un rango amplio de pH y temperaturas hasta de 50°C. El preparado liofilizado presenta una buena estabilidad de conservación a -20°C durante un año.
- ✱ La combinación de cromatografía de intercambio iónico, exclusión en gel y cromatografía en fase reversa (RP-HPLC) permitió identificar una proteína mayoritaria desde el extracto crudo de tallo hasta el producto más purificado, que caracterizada en términos de masa molar, punto isoeléctrico y secuencia N-terminal, se demostró que es bromelina de tallo.

REFERENCIA

1. Avilés, X.; Guasch, A. y Vendrell, J. Activación de precursores de proteínas. *Research Bulletin*, 1994, vol. 100, no. 210, p. 74-81.
2. Rowan, A. Stem bromelain. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Londres : Academic Press, 1998, p. 566-572.
3. Leipner, J. y Saller, R. Systemic enzyme therapy in oncology. Effect and mode of action. *Drugs*, 2000, vol. 59, no. 4, p. 769-780.
4. Foda, Y.; Bassiouny, S.; Abdalla, M. y Shehata, M. Studies on the effect of meat tenderizers on some chemical constituents of canned and buffalo meats. *Mesopotamian Journal of Agriculture*, 1980, vol. 15, no. 1, p. 93-111.
5. Headon, D. y Walsh, G. The industrial production of enzymes. *Biotechnology Advance*, 1994, vol. 12, no. 4, p. 635-646.
6. Batkin, S.; Taussig, S. y Szekerezes, R. Modulation of pulmonary metastases (Lewis Lung carcinoma) by bromelain, an extract of the pineapple stem (*Ananas comosus*). *Cancer Investigation*, 1998, p. 241-242.
7. Engwerda, C.; Andrew, D.; Ladhams, A. y Mynott, T. Bromelain modulates T and B cell immune responses *in vitro* and *in vivo*. *Cellular Immunology*, 2001, vol. 210, no. 1, p. 66-75.
8. FAO. "Pineapple production" [Consultado 12/2002]. Disponible en URL: <<http://www.pineappleinn.com/reviews.html>>.
9. Lowry, O.; Roserbrough, N.; Farr, A. y Randall, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, 1951, vol. 193, p. 265-275.
10. Anson, M. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal Genetic Physiology*, 1938, vol. 22, p. 79.
11. Laemmli, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, vol. 237, p. 680-685.
12. Posada, E. Immobiline dry strip. Short Instructions. Amersham Pharmacia Biotechnology. UK 71-5009, 1999, p. 1-4.
13. Hernández, M.; Chávez, M.; Márquez, M.; Rodríguez, G.; Santos, R.; González, J. y Carvajal, C. Proceso de obtención de bromelina a partir de tallos de piña. Patente Cubana C12N 9/50, dic 23, 1997.
14. Harrach, T.; Eckert, K.; Maurer, H.; Macheleidt, I. y Nuck, R. Isolation and characterization of 2 forms of an acid bromelain stem proteinase. *Journal of Protein Chemistry*, 1998, vol. 17, p. 51-61.
15. Baéz, E.; Guerra, M.; Rodríguez, P.; Hernández, Z. y Nieves, N. Electroban: SA de análisis de electroforesis. *Cultivos Tropicales*, 1996, vol. 17, no. 2, p. 45-47.
16. NCBI Sequence Viewer "Stem Bromelain (EC 3.4.22) Pineapple" [Consultado 12-2000]. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>>.
17. Russian Academic Science. Bromelain production. Institute Biochemistry, Experimental Biology. Vilnius, inventors. SU patents. 1804855, 1993.
18. Chávez, M.; Díaz, J. y Delfin, J. Enzimología. Principios básicos y aplicados. Buenos Aires : Editorial Goudelias, 2002 (en prensa).
19. Haq, S.; Rasheedi, S. y Khan, R. Characterization of a partially folded intermediate of stem bromelain at low pH. *European Journal of Biochem.*, 2002, vol. 269, no. 1, p. 47-52.

Recibido: 29 de mayo de 2003

Aceptado: 22 de junio de 2004

DIPLOMADOS

Precio: 2000 USD

Metabolitos secundarios de interés agrícola

Coordinador: Dra.C. Inés Reynaldo Escobar

Duración: 1 año

SOLICITAR INFORMACIÓN

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación, Servicios Informativos
y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba. CP 32700
Telef: (53) (64) 6-3773
Fax: (53) (64) 6-3867
E.mail: posgrado@inca.edu.cu