

Panorama actual de las Enzimas Proteolíticas Vegetales.

MARTA S. BUTTAZZONI Y NESTOR O. CAFFINI

*Cátedra de Botánica, Facultad de Ciencias Exactas,
Universidad Nacional de La Plata, calles 47 y 115, La Plata, Argentina.*

RESUMEN. Se ha efectuado una breve revisión de las enzimas proteolíticas de plantas superiores, haciendo referencia a los usos, clasificación, mecanismos de acción y principales propiedades de las proteasas vegetales conocidas hasta el momento, procedentes de 65 especies incluídas dentro de 19 familias de Angiospermas.

SUMMARY. *Plant proteolytic enzymes: Present scope.* A brief review on proteolytic enzymes of higher plants is presented, referred to uses, classification, mechanisms of action and most remarkable properties of the principal proteases yet known, embracing 65 species belonging to 19 families of Angiosperms.

INTRODUCCION

Las enzimas proteolíticas, también denominadas proteinasas o proteasas, 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.

Como la mayoría de los productos naturales, las enzimas proteolíticas vegetales han sido utilizadas empíricamente durante mucho tiempo, usualmente en materia de alimentación y de salud. Una prueba de ello es el uso del jugo de ananá¹ y el látex de diferentes especies de higos² como agentes antihelmínticos, aún cuando las enzimas responsables de la acción vermífida (bromelina y ficina, respectivamente) no se utilicen ya con esos fines:

Los habitantes de ciertas regiones de Centro y Sudamérica usan tradicionalmente el jugo de mamón o 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. Se consigue una mejor distribución 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 (papaína, bromelina, ficina) reversiblemente inactivadas, las que resultan luego reactivadas por el potencial reductor que adquieren los músculos del animal luego de su muerte³.

Es conocido el uso de ciertas enzimas proteolíticas para evitar la for-

mación 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 y bromelina son las fitoproteasas 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 del "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 más utilizada es la pancreatina, proteasa de origen animal, pero también se ha ensayado el uso de papaína, bromelina y de proteinasas bacterianas y fúngicas.

Los hidrolizados ("lisados") de proteínas han sido muy utilizados en la práctica médica como reconstituyentes, a la que esporádicamente retornan de tanto en tanto. Actualmente se acrecienta su aplicación como aditivos alimentarios⁴, pero si bien en algunos casos suelen utilizarse enzimas proteolíticas en su preparación, es mucho más común que se apele a la hidrólisis clorhídrica. Naturalmente que así se destruyen algunos aminoácidos (tirocina y especialmente triptofano), por lo que en los hidrolizados destinados

a uso terapéutico o a la elaboración de peptona (triptona) para ensayo microbiológicos se recurre a la hidrólisis enzimática.

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 utilización en trastornos digestivos, en el tratamiento de lesiones de piel y para desbridar heridas escarificadas. Menos difundido es el uso de papaína y ficina (y recientemente de bromelina) en inmunohematología, ya que tanto *in vivo* como *in vitro* son capaces de aglutinar glóbulos rojos cubiertos con anticuerpos incompletos⁵.

CLASIFICACION

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 sulfhidríticas* o *tiolproteasas*, 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 habitualmente ne-

cesitan la presencia de iones metálicos para manifestar su acción hidrolítica y que son sensibles a los agentes quelantes y 4) *proteasas ácidas*, caracterizadas por requerir un medio francamente ácido para poder actuar⁶.

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 recientes⁷ no se mencionan enzimas proteolíticas serínicas de origen vegetal. a pesar de 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, está mayoritariamente integrado por proteasas vegetales, de las cuales seguramente papaína, ficina y bromelina son sus representantes más conspícuos.

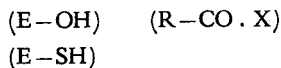
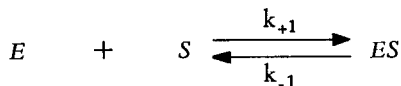
Tradicionalmente se ha aceptado que las enzimas proteolíticas de los dos grupos anteriores son endopeptidasas, en tanto que las metaloproteiniasas del tercer grupo incluirían únicamente exopeptidasas, ya sea aminopeptidasas o carboxipeptidasas. Hay, sin embargo, carboxipeptidasas serínicas vegetales que no requieren iones metálicos para poner de manifiesto su actividad, así como aminopeptidasas sulfhidríticas que tampoco los necesitan.

El último grupo es probablemente el menos nutrido, donde pepsina

suele ser mencionada como su representante casi exclusivo, 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, donde el primer paso es la formación de un complejo enzima-sustrato *ES* 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 ($R-CO \cdot X$) 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 ($R-CO \cdot O-E$) en las proteasas serínicas o tioéster ($R-CO \cdot S-E$) en las

y para su preparación puede partirse tanto del látex fresco como del látex comercial desecado; el método se basa en una precipitación fraccionada con sulfato de amonio y cloruro de sodio¹²

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. Resiste altas temperaturas (3 horas a 100 °C) y aún en solución es bastante termoestable, excepto en condiciones ácidas.

Por tratarse de una enzima sulfhidrónica, la papaína requiere la presencia de un grupo sulfhidrilo libre para evidenciar su actividad catalítica, ya que en la enzima nativa ese grupo se encontraría bloqueado formando una unión disulfuro o en parte como ácido sulfónico. La activación puede lograrse entonces con agentes reductores tales como cisteína, sulfuro, sulfito o cianuro.

El punto isoelectrico de la papaína¹³ es 8,75, y tiene un peso molecular de 23.000, resultado de la presencia de 212 aminoácidos que conforman una sola cadena peptídica con tres puentes disulfuro¹⁴.

La papaína es capaz de hidrolizar la mayoría de las uniones peptídicas, dando lugar en muchos casos a la aparición 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, pero son bastante similares en cuanto a especificidad de sustrato y a sus propiedades inmunológicas.

Otras proteasas presentes en el látex en menor proporción son las denominadas "papaína peptidasa A" y "papaína peptidasa B", de peso molecular cercano al de la papaína (24.000) pero con una reactividad menor que la de papaína y quimopapaína¹⁵.

Inicialmente la quimopapaína se obtuvo por precipitación fraccionada del látex, pero en la actualidad se recurre al pasaje del mismo a través de una columna de agarosa mercurial¹⁶ o de Amberlita IR-120 (Hg⁺⁺)¹⁷.

El peso molecular de la quimopapaína es de 35.200, logrado en base al aporte de 318 aminoácidos y su punto isoelectrico es 10,4. 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.

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 demuestran que están comprometidos dos grupos sulfhidrilo

por molécula de enzima, señalándose además la presencia de una molécula de un aminoazúcar no identificado¹⁶.

Ficina

Bajo esta denominación se conoce a un conjunto de proteasas aisladas del látex de al menos trece especies diferentes de *Ficus* (Moraceae), en especial de *F. carica* L. y *F. glabrata* H.B.K. Partiendo del látex desecado de esta última especie y por precipitación fraccionada con un gradiente de cloruro de sodio se obtienen 5 componentes enzimáticamente activos¹⁸, que aumentan a seis mediante el empleo de otras técnicas de fraccionamiento salino junto con cromatografía de partición y gel-filtración¹⁹.

Se ha señalado²⁰ que la ficina cristalina mantenida a 50 °C durante dos horas tiene un rango de estabilidad máximo entre pH 4,5 y 9,5. Las condiciones de óptima actividad al usarse distintos sustratos sintéticos se logran en todos los casos a pH 6,5.

El peso molecular es de alrededor de 26.000 y el pI consignado es en unos casos 9 y en otros superior a 9,6. La actividad aumenta notoriamente con el uso de agentes quelantes y sustancias reductoras, ya que ficina pertenece al grupo de enzimas sulfhidrílicas.

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 sulfhidrico reactivo. Últimamente²¹ parece haberse demostrado que

ficina es una glucoproteína, donde la fracción glucídica recuerda en muchos aspectos al glucopéptido aislado de bromelina.

Bromelina

Con este nombre se conoce desde hace tiempo a la proteasa separada del jugo de los frutos del "anana" (*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.

La bromelina de tallos proviene de la precipitación acetónica del jugo obtenido por expresión de los mismos, seguida de pasajes por intercambiadores iónicos, precipitación fraccionada con sulfato de amonio y gel-filtración²². La proteasa purificada tiene carácter básico y un peso molecular de 33.000, consecuencia de la unión de 285 aminoácidos, contiene un solo grupo sulfhidrilo por molécula²³ y se trata de una glucoproteína²⁴. Estudios posteriores²⁵ evidencian la presencia de un segundo componente de naturaleza ácida, en tanto que el análisis más reciente²⁶ revela la existencia de cuatro fracciones activas.

La bromelina de frutos se obtiene a través de una técnica similar a la descrita para su homóloga de tallos²⁷, pero a diferencia de ésta se trata de una proteína ácida, también asociada a una fracción glucídica. Ensayos posteriores²⁸ han permitido comprobar la

coexistencia de tres componentes enzimáticos, uno de los cuales, de peso molecular 18.000, constituye el 90 % del total y es esencialmente similar a uno de los componentes de la bromelina de tallos. Recientemente²⁹ se ha consignado la separación de una nueva proteasa ácida ("bromelina de frutos FA₂"), de peso molecular 31.000, que 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".

El método seguido para aislar y purificar la enzima consiste en centrifugar a altas velocidades el jugo de los frutos, precipitando las impurezas por el agregado de álcalis y sometiendo el sobrenadante a gel-filtración.

Pingüinina, que también es una proteinasa sulfhidrúlica, 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). La especificidad de sustrato de pingüinina es similar a la de papaína y la composición en aminoácidos exhibe además un marcado parecido. El contenido en hidratos de carbono es semejante al de bromelina, pero aún queda por demostrar que pingüinina sea una glucoproteína³⁰.

Otras proteasas de Bromeliáceas

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.) se aíslan cuatro proteinasas sulfhidrúlicas de similares características enzimáticas, denominadas respectivamente "hemisfericina", "karatasina", "palmerina" y "silvestrisina"⁷.

El zumo obtenido por expresión de los frutos se homogeneiza con cloruro de sodio y sacarosa y se somete a ultracentrifugación y gel filtración. Los pesos moleculares oscilan entre 22.500 y 24.800 y la capacidad proteolítica es similar.

Recientemente se ha informado de la separación de productos con actividad proteolítica a partir del jugo de los frutos de *Bromelia balansae* Mez³¹, *B. laciniosa* Mart. y *B. hieronymi* Mez³², consignándose que se trata de enzimas sulfhidrúlicas con valores máximos de actividad a pH 6,3 - 7,8 y 45 °C - 55 °C.

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 debido presuntamente a la presencia de enzimas proteolíticas) conduce al aislamiento³³ de una proteasa sulfhidrúlica a la que se denomina "actinidina". Varios años más tarde se consigue

cristalizar la enzima³⁴, que se asemeja a papaína por su acción esterásica, siendo además capaz de hidrolizar hasta el 20 % de los enlaces peptídicos de la gelatina. Recientemente³⁵ se ha conseguido determinar la estructura de la proteína, que presenta una notable similitud con papaína.

Agavina

A partir de un polvo acetónico que representa el extracto crudo de hojas de "sisal" (*Agave sisalana* (Engelm.) Perr., Amaryllidaceae), purificado ulteriormente por fraccionamiento etanólico, precipitación con sulfato de amonio y gel filtración, se logra separar una entidad enzimática³⁶ de peso molecular 52.500 y pH óptimo 7 - 8, para la que se propone el nombre trivial "agavina". En estudios posteriores³⁷ se confirma que agavina es una metalo - proteína 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.

Ultimamente³⁸ se ha conseguido aislar una aminopeptidasa de las hojas de "pita" (*Agave americana* L.) por fraccionamiento con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio y gel - filtración. Su peso molecular es 86.500 el pI es 4,53 y contiene 1,25 % de hidratos de carbono, pareciendo no requerir iones metálicos para su activación.

Asclepina

Desde hace más de cuarenta años se conoce un par de enzimas sulfhidríticas³⁹ separadas del látex de los pecíolos de *Asclepias speciosa* Torr. y *A. mexicana* Cav. (Asclepiadaceae), denominadas "asclepina s" y "asclepina m", respectivamente. Experiencias recientes⁴⁰ sobre el látex de los tallos de *A. syriaca* L. en base a cromatografía de afinidad sobre agarosa mercurial dan por resultado la separación de dos grupos de proteasas (pesos moleculares 21.000 y 23.000, pH óptimo frente a caseína 7 - 7,5 y 7,5 - 8,5), de distinta composición de aminoácidos pero no homogéneas, ya que cada una está a su vez integrada por cinco componentes que difieren entre sí sólo en algunos residuos aminoacídicos.

Calotropina

Esta denominación fue utilizada para identificar un conjunto de proteasas⁴¹ aisladas del látex de *Calotropis procera* Dry (Asclepiadaceae), aún cuando el mismo nombre habíase dado a una proteinasa sulfhidrítica presente en el látex del "madar" (*Calotropis gigantea* R. Br.). Partiendo de esta última especie se aíslan recientemente dos fracciones con actividad proteolítica semejante⁴², de naturaleza sulfhidrítica pero que poseen un segundo sitio activo, representado posiblemente por histidina. La presencia de otras dos proteasas similares a las anteriores ha sido objeto de una reciente comunicación⁴³.

Edestinasa

La edestina es una proteína de reserva presente en la fracción cristaloide de los granos de aleurona de las semillas del "cáñamo" (*Cannabis sativa* L., Cannabinaceae). A la enzima proteolítica responsable de la degradación de la edestina, de peso molecular 20.000, se la denomina "edestina"⁴⁴. Está contenida en los propios granos de aleurona y no es afectada por activadores ni inhibidores de proteasas sulfhidríticas o serínicas, comportándose en este sentido en forma semejante a la catepsina D (una proteasa ácida intracelular alojada en los lisosomas de las células del cuerpo de los mamíferos), hecho que apoya la idea de considerar a los granos de aleurona análogos a los lisosomas animales y en tal caso a la edestina como una hidrolasa lisosómica⁴⁵.

Euforbina

El mismo nombre les fue aplicado casi simultáneamente a dos proteasas sulfhidríticas separadas del látex de *Euphorbia lathyris* L.⁴⁶ y de *E. cerifera* Alcocer⁴⁷, pero el carácter preliminar de ambos trabajos y la ausencia de comunicaciones posteriores impide establecer el grado de similitud que pudiera existir entre ambas preparaciones enzimáticas.

Hurina

De los tallos y raíces de *Hura crepitans* L. (Euphorbiaceae), conocida en Venezuela como "jabillo", se ha separado un exudado con actividad proteolítica. Por precipitación ace-

tónica⁴⁸ se aísla la "hurina", una proteasa ácida que requiere hierro al estado ferroso para manifestar su actividad⁴⁹.

Mexicana.

Es la proteasa separada del látex del "cuaguayote" (*Pileus mexicanus* I. M. Johnston, Caricaceae), obtenida por precipitación con cloruro de sodio, gel-filtración y cromatografía de intercambio iónico⁵⁰. Se trata de una enzima sulfhidrítica de carácter básico que muestra el máximo de actividad caseinolítica⁵¹ a pH 8,5 a 9.

Pomiferina

Es una enzima proteolítica no sulfhidrítica extraída tanto del látex como del jugo de los frutos de la "osa-ge orange" (*Maclura pomifera* Schneid., Moraceae)⁵², un arbusto muy difundido en el oeste de los EE.UU. El pH de óptima actividad frente a gelatina es 6,45.

Tabernemontanina

Del jugo obtenido por expresión de los frutos de *Tabernaemontana grandiflora* Jacq. (Apocynaceae) se puede separar, por precipitación acetónica, una tiol-proteasa a la que se le atribuye una actividad diez veces superior a la de la papaína cruda⁵³.

Proteasas de Gramíneas

Los cereales contienen en sus granos un grupo de proteínas de reserva (prolaminas) que se caracterizan por su naturaleza hidrofóbica y cuyos repre-

sentantes 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.

Recientemente se ha separado una proteasa sulfhidrúlica de una variedad cultígena de "arroz" (*Oriza sativa* L. cv. Ratna), cuyas condiciones óptimas de acción se manifiestan a pH 7 y 40 °C⁵⁴. Por otra parte, a partir de semillas y plántulas de otra variedad (*O. sativa* L. cv. Nihombare) se ha conseguido aislar tres carboxipeptidasas⁵⁵ con óptimos de actividad a pH 4,5 - 5,5 y 7 de las cuales la carboxipeptidasa de semillas sería una proteasa serínica de peso molecular 110.000 y aparentemente conformada por dos unidades diferentes.

De hojas senescentes de "avena" (*Avena sativa* L. cv. Victory) se han obtenido dos proteasas: una de ellas neutra y aparentemente de tipo sulfhidrúlico y la otra ácida y de tipo serínico, siendo la primera de ellas una endopeptidasa y la segunda una exopeptidasa⁵⁶.

Los granos germinados de "cebada" (*Hordeum vulgare* L.) contienen una variedad de peptidasas, consignándose la presencia de al menos ocho de ellas⁵⁷: tres carboxipeptidasas, otras tantas aminopeptidasas y dos peptidasas que hidrolizan uniones específicas (Ala - Gli y Leu - Tir). Dos de las carboxipeptidasas han sido objeto de mayor análisis y una de ellas es segura-

mente de tipo serínico⁵⁸. Una de las tres aminopeptidasas también fue purificada⁵⁹, demostrándose que se trata de una enzima sulfhidrúlica de peso molecular 65.000.

Las semillas de "centeno" (*Secale cereale* L.) contienen una enzima proteolítica con actividad amidásica que aparentemente pertenece al grupo de las proteasas serínicas⁶⁰.

La degradación de la zeína durante la germinación del grano de "maíz" (*Zea mays* L.) ha recibido especial atención^{61, 62}; por medio de precipitación fraccionada, cromatografía de intercambio iónico, gel-filtración y electroforesis en gel de poliacrilamida ha podido purificarse una proteasa de peso molecular 21.000 y pl 2,3 ó menor. La ubicación de esta enzima dentro de la clasificación propuesta plantea un verdadero dilema, ya que si bien se trata de una proteasa ácida y su especificidad de sustrato es semejante a la de pepsina⁶³, el comportamiento frente a distintos activadores e inhibidores la ubica decididamente como una tiol-proteasa, hecho confirmado con el ulterior aislamiento de sustancias inhibitoras de enzimas sulfhidrúlicas presentes en los granos⁶⁴, cuyo contenido decrece rápidamente con la germinación, conjuntamente con la degradación de la zeína.

De los cotiledones de "sorgo" (*Sorghum vulgare* Pers.) se ha aislado una proteasa ácida de peso molecular 80.000, que hidroliza específicamente los enlaces peptídicos en los que el grupo carboxilo es aportado por los ácidos aspártico o glutámico, por lo

que podría resultar un reactivo valioso en el análisis secuencial de proteínas^{6 5}.

En los granos de "trigo" (*Triticum aestivum* L.) germinados hay hidrolasas peptídicas similares a las que contienen los granos de cebada^{6 6}, especialmente carboxipeptidasas serínicas capaces de degradar rápidamente el gluten^{6 7}.

Proteasas de Cucurbitáceas

Sometiendo el sarcocarpo de la "calabaza blanca" (*Benincasa cerifera* Savi) a un tratamiento con fibras de CM-celulosa, seguido de precipitación fraccionada con sulfato de amonio y gel-filtración, se consigue separar una proteasa serínica de peso molecular 50.000, con actividad caseinolítica óptima a pH 9,2 y 70 °C^{6 8}. El procedimiento ya había sido empleado para separar la enzima proteolítica contenida en una variedad de "melón" muy cultivada en Japón (*Cucumis melo* L. cv. Prince), de propiedades notablemente semejantes a la anterior^{6 9}.

En los cotiledones de "zapallo" (*Cucurbita maxima* Duch. cv. Hubbard) se ha conseguido demostrar la presencia de dos aminopeptidasas similares que requieren la presencia de iones magnesio o manganeso, una de las cuales resulta ser una dipeptidasa, estable hasta 85 °C y con un pH óptimo de 8 a 8,5^{7 0}. Posteriormente se separó una tercera aminopeptidasa que no es activa frente a dipéptidos y es inactivada por magnesio^{7 1}.

Proteasas de Leguminosas

A partir de una variedad de "arveja" muy cultivada en Australia (*Pisum sativum* L. cv. Greenfeast) se separaron en principio dos aminopeptidasas de naturaleza sulfhidrónica^{7 2}, de pesos moleculares 58.000 y 74.000, a las que debe agregarse una tercera^{7 3} de peso molecular 500.000, todas con alta especificidad de sustrato. También se han aislado dos hidrolasas serínicas de peso molecular 65.000 y pH óptimo cercano a 7, que no hidrolizan caseína pero son activas frente a pequeños péptidos que contengan aminoácidos básicos en el extremo C-terminal^{7 4}.

De las semillas no germinadas de "maní" (*Arachis hypogaea* L.) se ha aislado una proteasa^{7 5} con actividad amidásica y esterásica a la que se denomina "araquina". Del mismo material se separó después^{7 6} una peptidasa serínica de peso molecular 60.000, con actividad óptima a pH 7,4 y 25 °C a 36 °C.

También de semillas de "mung" o "poroto mung de la India" (*Phaseolus aureus* Roxb. = *Vigna radiata* (L.) Wilczek) se ha aislado una proteasa serínica^{7 7}, así como una endopeptidasa sulfhidrónica^{7 8} de peso molecular 23.000 y pI 3,75, siendo esta última aparentemente responsable de la degradación de la vicilina, principal reservorio proteico del mung, durante la germinación de las semillas.

De las hojas de plántulas de poroto (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Prince) se aíslan tres proteasas^{7 9} con actividad caseinolítica máxima a pH 6, de las

cuales solamente una tiene actividad carboxipeptidásica comprobada, la de peso molecular 120.000, a la que se denomina "faseolina" y que pertenece al "tipo serínico"⁸⁰. De las semillas de otra variedad cultígena (*Ph. vulgaris* L. cv. Perlicka) se ha separado una proteasa sulfhidrónica de bajo peso molecular (26.000 a 31.500)⁸¹.

En los granos de "soja" (*Glycine max* (L.) Merrill) existe un complejo proteico de difícil extracción con agua y del que por cromatografía de intercambio se separan seis fracciones activas⁸², aparentemente de naturaleza sulfhidrónica, de actividad caseinolítica óptima a pH 5 a 5,5 pero de diferente comportamiento frente a algunos sustratos sintéticos⁸³. Poco después y a partir de un extracto acetónico se obtiene una "fracción proteica soluble de pH 4,5", con actividad amidásica y pl 4,8, que es ligeramente activada por iones calcio y magnesio⁸⁴.

De los cotiledones de la "arveja" o "veza común" (*Vicia sativa* L.) se ha separado y purificado una peptidasa de tipo sulfhidrónico, de peso molecular 70.000, que tiene estructura cuaternaria y está compuesta de cuatro subunidades de igual peso molecular⁸⁵.

Proteasas de Solanáceas

Tratando de determinar la magnitud de la actividad proteolítica en tejidos vegetativos de "papa" (*Solanum tuberosum* L. cv. Russet Burbank) se aísla de las hojas una proteasa serínica ácida, de peso molecular 70.000.

En las raíces existe una enzima de características similares, pero de naturaleza sulfhidrónica, junto con una tercera proteasa de peso molecular mucho mayor (150.000 a 200.000) y pl más alto, que es inhibida por agentes reductores⁸⁶.

A partir de hojas senescentes de "tabaco" (*Nicotiana tabacum* L.) se ha aislado una endopeptidasa de bajo peso molecular (9.000 a 10.000) que hidroliza uniones peptídicas entre residuos aminoácidos hidrófobos, con una actividad máxima a pH 5 y 40 °C⁸⁷.

También de las hojas de "tomate" (*Lycopersicon esculentum* Mill.) por precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de afinidad y gel-filtración se ha conseguido aislar una proteasa serínica de pl 5,2 y peso molecular 105.000, con actividad peptidásica, esterásica y carboxipeptidásica⁸⁸.

En los frutos de *Solanum elaeagnifolium* Cav. está presente una proteasa sulfhidrónica que se extrae por maceración con una solución fosfatada de pH 7,5 y se purifica posteriormente por precipitación con sulfato de amonio y acetona. La enzima alcanza su máxima actividad a pH 8,5 y es estable durante una hora a 75 °C⁸⁹.

Proteasas de plantas insectívoras

La fantasía popular ha alimentado el mito de la existencia de "plantas carnívoras", cuando en rigor de verdad son unas pocas las especies capaces de aprovechar nitrógeno orgánico, el que generalmente es aportado por peque-

ños insectos. Estas plantas están provistas de un sistema enzimático proteolítico que preferentemente actúa en medio ácido, como la enzima aislada de *Drosera peltata* Smith (Droseraceae)⁹⁰, que muestra un máximo de actividad sobre caseína a pH 3.

A partir de *Nepenthes spp.* (Nepenthaceae) se aísla una proteasa ("nepentesina"), que tiene un pH óptimo de 1,8 a 2,4 y muestra una marcada similitud con pepsina⁹¹. Igual denominación recibe 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 más abundante) y 21.000, señalándose también en este caso el notorio parecido con pepsina⁹².

Otras proteasas

Se ha podido establecer que en los cotiledones de "algodón" (*Gossypium hirsutum* L. cv. Coker 413, Malvaceae) la actividad proteolítica se manifiesta 24 horas después de iniciada la germinación y es debida a una carboxipeptidasa serínica, la 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. El análisis subsiguiente ha permitido comprobar que la enzima posee dos sitios activos en cadenas separadas y que la secuencia aminoacídica alrededor de ambos es la misma⁹³.

Del exocarpo de *Citrus natsudaidai* Hayata (Rutaceae) también se ha separado una carboxipeptidasa serínica ("carboxipeptidasa C_N") de peso molecular 93.000 y con débil acción estereásica⁹⁴.

A partir de semillas de "loto" (*Nelumbo nucifera* Gaertn., Nymphaeaceae) se ha conseguido aislar una proteasa ácida capaz de degradar caseína y hemoglobina pero con débil acción sobre las globulinas de la propia semilla⁹⁵. La enzima tiene un peso molecular de 35.500 a 36.800, el pI está dentro del rango de pH 3 a 4 y aparentemente el residuo tirosina juega un papel importante en la expresión de la actividad proteolítica⁹⁶.

El endosperma de las semillas de "ricino" o "castor" (*Ricinus communis* L., Euphorbiaceae) contiene dos aminopeptidasas sulfhidrúlicas, pero durante la germinación se manifiesta además la presencia de una carboxipeptidasa serínica y otras tres tiolproteasas con valores óptimos de actividad enzimática dentro del rango de pH 3,5 a 8. Parecería 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 germinación⁹⁷.

Las semillas de "trigo sarraceno" (*Fagopyrum esculentum* Moench, Polygonaceae) contienen una proteasa sulfhidrúlica⁹⁸ de peso molecular 75.000, capaz de hidrolizar las fracciones globulina y glutelina de la semilla⁹⁹. Posteriormente se aisló una endopeptidasa de naturaleza aparente-

mente serínica que es inactiva frente a las albúminas y globulinas de las semillas pero de franca acción sobre protaminas y en menor grado sobre caseína, histonas y glutelinas¹⁰⁰.

COMENTARIO FINAL

Resulta incierta la época en la que el hombre comenzó a utilizar productos naturales conteniendo enzimas proteolíticas, ya como coadyuvantes alimentarios o con fines terapéuticos en medicina popular. De todos modos y aún cuando el conocimiento de sus propiedades se hallaba bastante difundido, la búsqueda sistemática de vegetales potencialmente productores de proteasas es una de las tantas iniciativas alentadas a partir de la posguerra, como puede apreciarse a través de la bibliografía citada.

Sin embargo no son muchas las especies en las que se ha podido comprobar la presencia de enzimas proteolíticas: en la presente revisión se consignan 65 de ellas, pertenecientes a 19 familias de Angiospermas. Las Bromeliáceas resultan aparentemente las más atractivas, ya que son nueve las especies de esta familia de las que se han extraído proteasas y ocho perte-

necen al género *Bromelia*, hecho digno de ser destacado por tratarse de un género americano integrado por no más de sesenta especies.

Otro dato significativo es que más de la tercera parte de las especies pertenecen a familias caracterizadas por producir látex (Asclepiadáceas, Caricáceas, Euforbiáceas y Moráceas). Asimismo existe una buena proporción (alrededor de una cuarta parte) de estudios efectuados sobre semillas, en especial de cereales y Leguminosas. En este caso debe tenerse en cuenta que aún cuando muchos de ellos han conducido al aislamiento de nuevas proteasas, reconocen un interés original de carácter fisiológico, referido especialmente al conocimiento del mecanismo de degradación de las proteínas de reserva durante la germinación de las semillas.

Confrontando en consecuencia la escasez de estudios efectuados con sus disímiles posibilidades de aplicación, surge claramente que las proteinasas vegetales ofrecen un campo fecundo para la investigación pura y aplicada, resultando otro fascinante desafío que hacen las plantas con respecto a su utilización por parte del hombre.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Berger, J. y C. F. Asenjo (1939) *Science* 90: 2235.
2. Tauber, H. (1949) "The Chemistry and Technology of Enzymes", J. Wiley & Sons, N. York, pág. 165.
3. 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.
4. Sair, L. (1974) en "Encyclopedia of Food Technology" (A. H. Johnson y M. S. Peterson, eds.), The Avi Publishing Co, Inc., Westport, pág. 513.
5. Cawley, L. P., L. Eberhardt y W. L. Goodwin (1964) *Transfusion* 4: 441 - 7.
6. Hartley, B. S. (1960) *Ann. Rev. Biochem.* 29: 45 - 67.
7. Cruz, M. T., M. del C. Oliver, L. M. del Castillo y M. Castañeda - Agulló (1974) *Rev. Latinoam. Quím.* 5 :18 - 25.

8. Oliver, M. del C., L. M. Del Castillo y M. Castañeda - Agulló (1977) *Rev. Latinoamer. Quím.* 8 :155 - 60.
9. Arnon, R. (1970) *Meth. Enzymol.* 19: 226 - 44.
10. Arnon, R. y E. Shapira (1967). *Biochemistry* 6 :3942 - 50.
11. Smith, E. L. y M. J. Parker (1958) *J. Biol. Chem.* 233 :1387 - 91.
12. Arnon, R. (1965) *Inmunochimistry* 2: 107 - 14.
13. Smith, E. L., J. R. Kimmel y D. M. Brown (1954) *J. Biol. Chem.* 207 :533 - 61.
14. Drenth, J., J. N. Jansonius, R. Koekoek, H. M. Swen y B. G. Wolthers (1968) *Nature* 218 :929 - 32.
15. Lynn, K. R. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 569: 193 - 201.
16. Lynn, K. R. (1973) *J. Chromatog.* 84 :423 - 5
17. Joshi, P. N., V. Shankar, K. I. Abraham y K. Sreenivasan (1976) *J. Chromatog.* 121: 65 - 71.
18. Jones, I. K. y A. N. Glazer (1970) *J. Biol. Chem.* 245 :2765 - 72.
19. Kortt, A. A., S. Hamilton, E. C. Webb y B. Zerner (1974) *Biochemistry* 13 :2023 - 8
20. Cohen, W. (1958) *Nature* 182 :659 - 60.
21. Friedenson, B. e I. E. Liener (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 342: 209 - 12.
22. Murachi, T., M. Yasui y Y. Yasuda (1964) *Biochemistry* 3 :48 - 55.
23. Murachi, T. y M. Yasui (1965) *Biochemistry* 4 :2275 - 82.
24. Yasuda, Y., N. Takahashi y T. Murachi (1970) *Biochemistry* 9: 25 - 32.
25. Minami' Y., E. Doi y T. Hata (1971) *Agric. Biol. Chem.* 35 :1419 - 30
26. Lynn, K. R. (1977) *Anal. Biochem.* 77 :33 - 8
27. Ota, S., S. Moore y W. H. Stein (1964) *Biochemistry* 3 :180 - 5
28. Ota, S., K. Horie, F. Hagino, C. Hashimoto y H. Dat (1972) *J. Biochem. (Tokio)* 71: 817 - 30.
29. Yamaha, F., N. Takahashi y T. Murachi (1976) *J. Biochem. (Tokyo)* 79 :1223 - 34
30. Toro-Goyco, E., A. Maretzki y M. L. Matos (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 126 :91 - 104.
31. Pfürter, G. M. B. de y M. S. B. de Cozzarin (1976) *Rev. Farm. (Buenos Aires)* 118: 3 - 8
32. Cozzarin, M. S. B. de y G. M. B. de Pfürter (1980) *Rev. Farm. (Buenos Aires)* 123 :3 - 7
33. Arcus, A. C. (1959) *Biochim. Biophys. Acta* 33 :242 - 4.
34. McDowall, M. A. (1970) *Eur. J. Biochem.* 14 :214 - 21.
35. Baker, E. N. (1980) *J. Mol. Biol.* 141: 441 - 84.
36. Tipton, K. F. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 92 :341 - 50.
37. Tipton, K. F. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 110: 414 - 22
38. du Toit, P. J., J. C. Schabort, P. G. Kempf y D. S. A. Lauscher (1978) *Phytochemistry* 17: 365 - 9.
39. Greenberg, D. M. y T. Winnik (1940) *J. Biol. Chem.* 135 :761 - 87
40. Brockbank, W. J. y K. R. Lynn (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 578 :13 - 22.
41. Atal, C. K. y P. D. Sethi (1962) *Planta Med.* 10: 77 - 90.
42. Madhavakrishna, W. y S. M. Bose (1960) *Enzymologia* 22 :251 - 61.
43. Pal, G. y N. K. Sinha (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 202: 321 - 30.
44. St. Angelo, A. J., R. L. Ory y H. J. Jansen (1969) *Phytochemistry* 8 :1873 - 7
45. St. Angelo, A. J., R. L. Ory y H. J. Jansen (1970) *Phytochemistry* 9: 1933 - 8
46. Ellis, W. G. y F. C. Lennox (1942) *Aust. J. Sci.* 4 :181 (citado por Tauber (1949) pág. 173)
47. Castañeda - Agulló, M., M. R. Balcázar y F. F. Gavarrón (1943) *Anales Esc. Nac. Cienc. Biol. México* 3: 65 (citado por Tauber (1943) pág. 173).
48. Jaffé, W. G. (1943) *J. Biol. Chem.* 149: 1 - 7
49. Seidl, D. S. de y K. Galde (1961) *Nature* 190: 1112
50. Soriano, M., M. T. Cruz, Y. Bustamante, L. M. del Castillo y M. Castañeda - Agulló (1975) *Rev. Latinoam. Quím.* 6 :143 - 51.
51. 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

52. Tauber, H. y S. Laufer (citado por Tauber (1949) pág. 171).
53. Jaffé, W. G. (1943) *Rev. Brasil. Biol.* 3 :149.
54. Kar, M. y D. Mishra (1977) *Biol. Plant. (Prague)* 19: 365 - 9 (B. A. 65 :35929)
55. Doi, E., N. Komori, T. Matoba y H. Morita (1980) *Agr. Biol. Chem.* 44: 77 - 92
56. Drivdahl, R. H. y K. V. Thimann (1978) *Plant Physiol.* 61 :501 - 5
57. Mikola, J. y L. Kolehmainen (1972) *Planta (Berl.)* 184 :167 - 77
58. Mikola, J. y K. Pietilä (1972) *Phytochemistry* 11 :2977 - 80
59. Kolehmainen, L. y J. Mikola (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 145 :633 - 42.
60. Dunaevsky, Ya. E. y M. A. Belozersky (1974) *Vestn. Mosk. Univ. Ser. 6 Biol. Pochvoved.* 29: 81 - 4.
61. Fujimaki, M., M. Abe y S. Arai (1977) *Agric. Biol. Chem.* 41 :887 - 91.
62. Abe, M., S. Arai y M. Fujimaki (1977) *Agric. Biol. Chem.* 41 :893 - 9.
63. Abe, M., S. Arai y M. Fujimaki (1978) *Agric. Biol. Chem.* 42: 1813 - 7
64. Abe, M., S. Arai, H. Kato y M. Fujimaki (1980) *Agric. Biol. Chem.* 44: 685 - 6
65. Garg, G. y T. K. Virupaksha (1970) *Eur. J. Biochem.* 17 :4 - 18.
66. Prentice, N., W. C. Burger y M. Moeller (1968) *Phytochemistry* 7: 1899 - 905
67. Preston, K. R. y J. E. Kruger (1976) *Plant Physiol.* 58 :516 - 20
68. Kaneda, M. y N. Tominaga (1977) *Phytochemistry* 16 :345 - 6
69. Kaneda, M. y N. Tominaga (1975) *J. Biochem.* 78 :1287 - 96
70. Ashton, F. M. y W. J. Dahmen (1967) *Phytochemistry* 6 :1215 - 25
71. Ashton, F. M. y W. J. Dahmen (1968) *Phytochemistry* 7 :189 - 97
72. Elleman, T. C. (1974) *Biochem. J.* 141: 113 - 8
73. Caldwell, J. B. y L. G. Sparrow (1980) *Aust. J. Plant Physiol.* 7 :131 - 40
74. Caldwell, J. B. y L. G. Sparrow (1976) *Plant Physiol.* 57: 795 - 8
75. Cameron, E. C. y M. Mazelis (1971) *Plant Physiol.* 48 :278 - 81
76. Mainguy, P. N. R., R. B. Van Huystee y D. B. Hayden (1972) *Can. J. Bot.* 50: 2189 - 95
77. Chu, D. (1963) *Acta Biochim. Biophys. Sinica* 3 :139 - 46 (B. A. 46, 40447)
78. Baumgartner, B. y M. J. Chrispeels (1977) *Eur. J. Biochem.* 77: 223 - 34
79. Wells, J. R. E. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 167: 388 - 98
80. Shaw, D. C. y J. R. E. Wells (1972) *Biochem. J.* 128 :229 - 35
81. Vavreinova, S. y J. Turkova (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 403 :506 - 13
82. Weil, J., A. Pinsky y S. Grossman (1966) *Cereal Chem.* 43 :392 - 9
83. Pinsky, A. y S. Grossman (1969) *J. Sci. Food Agric.* 20: 374 - 5
84. Catsimpoolas, N., S. K. Funk, J. Wang y J. Kenney (1971) *J. Sci. Food Agr.* 22: 79 - 82
85. Zemchik, E. I., M. T. Pham, A. D. Shutov e I. A. Vaintraub (1975) *Biokhimiya* 40: 746 - 50. (B. A. 61. 69041).
86. Santarius, K. y H. D. Belitz (1978) *Planta (Berl.)* 141: 145 - 54.
87. Hochkeppel, H. K. (1973) *Z. Pflanzenphysiol.* 69: 329 - 43.
88. Walker - Simmons, M. y C. A. Ryan (1980) *Phytochemistry* 19 :43 - 8
89. Greenberg, D. M. y T. Winnik (1940) *J. Biol. Chem.* 135 :761 - 87
90. Amagase, S. (1972) *J. Biochem. (Tokyo)* 72: 73 - 81.
91. Lobareva, L. S., G. N. Rudenskaya y V. N. Stepanov (1973) *Biokhimiya* 38 :640 - 2 (B. A. 57, 45704).
92. Toekes, Z. A., Wang Chee Woon y S. M. Chambers (1974) *Planta (Berl.)* 119: 39 - 46
93. Ihle, J. N. y L. S. Dure (1972) *J. Biol. Chem.* 247: 5034 - 47
94. Kubota, Y., S. Shoji, T. Fukanoshi y H. Ueki (1973) *J. Biochem. (Tokyo)* 74: 757 - 70
95. Shinano, S. y K. Fukushima (1969) *Agr. Biol. Chem.* 33 :1236 - 43.
96. Shinano, S. y K. Fukushima (1971) *Agr. Biol. Chem.* 35 :1488 - 94.
97. Tully, R. E. y H. Beevers (1978) *Plant Physiol.* 62: 746 - 50.
98. Iordan, A. G. y M. A. Belozersky (1975) *Vest. Mosk. Univ. ser. 6 Biol. Pochvoved.* 30: 115 - 7
99. Iordan, A. G. y M. A. Belozersky (1976) *Biokhimiya* 41 :673 - 8
100. Emtseva, N. B. y M. A. Belozersky (1977) *Biokhimiya* 42: 726 - 34.