

Purification of a New Endopeptidase Isolated from Fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (*Bromeliaceae*)

Mariela A. BRUNO, Marcelo F. PARDO, Néstor O. CAFFINI & Laura M.I. LÓPEZ*

LIPROVE, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas,
Universidad Nacional de La Plata, C.C. 711, B1900AVW La Plata, Argentina

SUMMARY. A new plant endopeptidase has been obtained from unripe fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (*Bromeliaceae*). Crude extracts were partially purified by organic solvents fractionation: best results (90% of proteins, 94% of total caseinolytic activity and only 9.9% of soluble sugars) were obtained by adding 4 volumes of cold acetone to the crude extract. This preparation (redissolved acetone precipitate, RAP) showed maximum activity (> 80%) at pH 7.3-10.7, and exhibited high thermal stability (80% of residual activity after heating for 30 min at 60 °C). Low sodium chloride concentrations (0.2 M) does not affect caseinolytic activity, but diminishes with the increase of salt concentration (52% of residual activity at 2.5 M NaCl). RAP showed also clotting activity and a notably preference for κ casein over α_{s1} , α_{s2} and β caseins, properties that could be of interest in the cheese industry. The enzyme was completely inhibited by E-64 and iodoacetic and activated by the addition of cysteine; these results strongly suggest that the isolated protease should be included within the cysteine group, as all the other studied proteases belonging to the family *Bromeliaceae*. IEF-zymogram of RAP showed six bands (pI 5.9 to >9.3), most of them proteolytically actives, but only three of which (pI 6.4, 8.3 and >9.3) proved to be important. Cation exchange chromatography (FPLC) allowed the isolation of the main fraction, named hieronymain I (pI = >9.3, molecular weight = 25 kDa).

RESUMEN. "Purificación de una nueva endopeptidasa aislada de frutos de *Bromelia hieronymi* Mez (*Bromeliaceae*)". Se ha aislado una nueva endopeptidasa a partir de frutos inmaduros de *Bromelia hieronymi* Mez (*Bromeliaceae*). Los extractos crudos fueron parcialmente purificados por fraccionamiento por solventes orgánicos, habiéndose obtenido los mejores resultados al precipitar el extracto crudo con 4 volúmenes de acetona fría (el precipitado retiene el 90% de las proteínas y el 94% de la actividad caseinolítica y contiene sólo 9,9% de azúcares solubles). El precipitado acetónico redisoluto (RAP) mostró máxima actividad (> 80%) a pH 7,3 -10,7 y muestra gran estabilidad térmica (mantiene 80% de actividad residual luego de calentarlo a 60 °C durante 30 min). Bajas concentraciones de cloruro de sodio (0,2 M) no afectan la actividad caseinolítica, pero ésta disminuye con el incremento de concentración salina (52% de actividad residual cuando la concentración de cloruro de sodio es 2,5 M). El RAP demostró poseer actividad coagulante de la leche y notable preferencia por la fracción κ caseína por encima de las α_{s1} , α_{s2} y β caseínas, características que pueden resultar de interés en la industria quesera. La enzima resultó totalmente inhibida por E-64 y ácido iodoacético y activada por cisteína, lo que sugiere que pertenece al grupo de la endopeptidasas cisteínicas, en el que se encuentran todas las proteasas estudiadas de la familia *Bromeliaceae*. El isoelectroenfoco seguido de zimograma revela la presencia de seis bandas (pI 5,9 a > 9,3), la mayoría de ellas proteolíticamente activas, pero sólo tres (pI 6,4, 8,3 y >9,3) de importancia. Por cromatografía de intercambio catiónico (FPLC) se logró aislar la fracción principal, denominada hieronymina I (pI >9,3 peso molecular 25 kDa).

KEYWORDS: *Bromelia hieronymi*, *Bromeliaceae*, Partial Purification, Plant endopeptidase. Milk clotting activity

PALABRAS CLAVE: Actividad coagulante de la leche, *Bromelia hieronymi*, *Bromeliaceae*, Fitopeptidasa, Purificación parcial.

* Author to whom correspondence should be addressed: E-mail: lmilopez@biol.unlp.edu.ar