

Bromelain aus Ananasfrucht

1. Einleitung

Die Enzyme der Ananaspflanze (*Ananas comosus*) waren ursprünglich bekannt als Bromelaine, weil unter diesem Namen alle Proteasen der Mitglieder der Pflanzenfamilie der Bromeliaceen zusammengefaßt wurden. Die proteolytische Fraktion aus dem Ananasstamm wurde als Stammbromelain, die aus der Ananasfrucht als Fruchtbromelain beschrieben. Es gab viele, widersprüchliche Berichte, in denen bis zu 6 verschiedene, proteolytische Komponenten im Stamm der Pflanze und mindestens zwei Komponenten in der Ananasfrucht gefunden wurden.

In jüngerer Zeit konnte gezeigt werden, dass die Ananaspflanze vier verschiedene Cysteinendopeptidasen enthält. Die Hauptkomponente im Extrakt des Pflanzenstammes ist Stammbromelain, während Fruchtbromelain die hauptsächliche Endopeptidase der Ananasfrucht ist. Zwei weitere Cystein-Endopeptidasen wurden nur im Stamm entdeckt, Ananain und Comosain.

Die Bestimmung der kompletten Aminosäuresequenz von Stammbromelain hat gezeigt, dass die Protease in die Papainfamilie gehört. Aber auch die N-terminalen Teilsequenzen von Fruchtbromelain, Ananain und Comosain zeigen, dass die Ananas-Endopeptidasen nicht nur im evolutionären und strukturellen Sinn nahe verwandt sind, sondern auch mehr konservierte Aminosäurebereiche im direkten Vergleich als mit Papain selbst aufzeigen. Dies könnte auf eine relativ junge, evolutionär bedingte Auseinanderentwicklung innerhalb der Endopeptidasen der Ananaspflanze hinweisen.

Stammbromelain	AVPQSIDWRD YGAVTSVKNQ NPCGACWAF A
Fruchtbromelain	AVPQSIDWRD YGAVNEVKNQ NPCGSCWSFA
Ananain	VPQSIDWRD SGAVTSVKNQ G
Comosain	VPQSIDWRN YGAVTSVKNQ G
Papain	IPEYVDWRQ KGAVTPVKNQ GSCGSCW

Doppelimmunodiffusionsstudien haben jedoch gezeigt, dass Stamm- und Frucht-Bromelain bezüglich ihrer Präzipitationsreaktionen mit polyklonalen Antiseren sehr verschieden sind. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, dass das Stamm-Enzym ein relativ basisches Protein mit einem hohen Anteil an Lysin und Arginin ist, während das Frucht-Enzym ein saures Protein ist. Dies spiegelt sich auch in den isoelektrischen Punkten mit Werten von 9.5 und 4.6 wieder. Auch sind beide Proteasen mit den gleichen Zuckerresten glycosyliert.

Die Bromelaine spalten Polypeptidketten in größere Bruchstücke und zeigen dabei eine breite Substratspezifität. Dies versetzt das Enzym in die Lage, die meisten löslichen Proteine leicht und effizient zu hydrolysieren: Casein, Hämoglobin, Gelatine, Soja und andere Proteine werden dabei zu niedermolekularen, in Trichloressigsäure lösliche Peptide gespalten. Obwohl auch einzelne Aminosäuren freigesetzt werden, verläuft die proteolytische Reaktion nicht notwendigerweise komplett ab.

In einem Gemisch mit mehreren anderen Proteasen wird das aus Ananasabfällen kommerziell präpariertes Bromelain (Frucht- + Stamm-) z.B. als Fleischzartmacher eingesetzt, um Bier gegen Kälte unempfindlicher zu machen, um vorgefertigte Frühstückscerealien herzustellen und als Zusatz in einigen Kosmetika verwendet.

Auch in der Medizin hat Bromelain ein Einsatzgebiet gefunden. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass Bromelain nach oraler Einnahme in seiner aktiven Form im strömenden Blut erscheint. Dort ist es nützlich beim Auflösen von zellulärer Debris, von Proteinkapseln kranker oder abgestorbener Zellen sowie von Zellfragmenten, die durch Ödeme verursacht wurden. Folglich reagieren entzündete Gelenke bei Arthritis, Artherosklerose, Verstauchungen, Prellungen und anderen sportverursachten Traumata sehr gut auf die Bromelain-Therapie. Auch bei sonstigen Infektionen, Entzündungen und bei langsamen Heilprozessen wirkt sich die Anwendung von Bromelain positiv aus.

Alle Endopeptidasen der Ananaspflanze zeigen ein breit angelegtes pH-Aktivitätsprofil mit einem Optimum nahe beim Neutralpunkt. Im katalytischen Zentrum der Thiolproteasen Stamm- bzw. Fruchtbromelain (MW ca. 23 kDa respektive 25 kDa) befindet sich ein Cystein, das eine ähnliche Rolle spielt wie das Serin in Serinproteasen (zählen Sie einige auf!). Demzufolge lassen sich alle Cysteinproteasen durch Substanzen wie Mercaptoethanol und andere Thiolverbindungen aktivieren, dagegen durch SH-Gruppen blockierende Agenzien wie Monojodessigsäure irreversibel hemmen (warum?).

Phenylmercuriacetat hemmt dagegen Bromelain nur reversibel, durch Inkubation mit Cystein im Überschuss kann die enzymatische Aktivität wieder hergestellt werden! Dies nutzt man z. B. zum Schutz des Enzyms gegen Eigenverdau während der Ionenaustauschchromatographie bei Raumtemperatur (s. Fließschema).

2. Aufgabenstellung

Isolieren Sie aus einer frischen Ananas das Fruchtbromelain und bestimmen Sie die Enzymaktivität des angereicherten Proteins.

Zur Vermessung der katalytischen Aktivität des Bromelains wird das synthetische Substrat α -N-Benzoyl-arginin-p-nitroanilid (BAPNA) benutzt, aus dem das Enzym proteolytisch p-Nitroanilin freisetzt. Dessen Konzentrationszunahme kann optisch bei 405 nm im Messansatz verfolgt werden.

Bestimmen Sie für die angegebenen BAPNA-Konzentrationen die Anfangssteigerungen ($\Delta E/\text{min}$), erstellen Sie daraus eine Aktivitätskennlinie der Thiolprotease (Auftragung von v gegen S) für dieses Substrat und ermitteln Sie über einen Lineweaver-Burk- ($1/v$ gegen $1/S$) oder einen Eadie-Hofstee-Plot (v gegen v/S) die Michaelis-Menten-Konstante mit einer Abschätzung der maximalen Fehlergrenzen !

3. Puffer und Lösungen

Testpuffer (10 fach Puffer):

300 mM Kaliumphosphat pH 6,0
100 mM Kaliumchlorid
10 mM EDTA

weitere Lösungen:

150 mM Cystein pH 6,0
20 mM Natriumcitrat pH 6,0
 5×10^{-4} M Phenylmercuriacetat
in Natriumcitrat
50 mM BAPNA in DMSO

4. Durchführung

Wie aus dem Fließschema auf der folgenden Seite ersichtlich endet die Präparation von Fruchtbromelain mit dem Sammeln von Fraktionen nach einer DEAE-Anionenaustauschchromatographie.

Die Fraktionen, die das Enzym enthalten, werden vereinigt. Zum Aktivitätstest werden jeweils 1000 μl dieser Enzymlösung 5 bis 10 min mit 100 μl Cystein-Stammlösung vorinkubiert, dann erst der Test durch Zugabe von **lediglich** 1000 μl dieser Vorinkubation

zur Testpuffer/Substrat-Lösung gestartet. Die Testansätze werden gegen einen Blindwert gemessen, der alle Komponenten außer Enzymlösung enthält.

Präparation von Bromelain aus der Ananasfrucht

Eine halbe Ananasfrucht schälen, klein schneiden und entsaften



Zentrifugation (Sorvall-Zentrifuge): 15 min bei 9000 rpm im GSA-Rotor



Überstand durch Gaze filtrieren



60% Ammoniumsulfatfällung (390 g/l)



1 Stunde im Kühlraum rühren



Zentrifugation (Sorvall-Zentrifuge): 20 min bei 9000 rpm im GSA-Rotor



Rückstand mit 20 ml kaltem Natriumcitratpuffer homogenisieren (Potter Elvehjem)



Zentrifugation (Sorvall-Zentrifuge): 15 min bei 20000 rpm im SS34-Rotor



Überstand auf DEAE-Cellulosesäule (2.5 cm Ø x 12 cm) auftragen, die mit
 5×10^{-4} M Phenylmercuriacetat äquilibriert ist,
und mit Natriumcitratpuffer eluieren



Sammeln von 7,5 ml Fraktionen

Aktivitätstest

Pipettierschema:

Testkonzentration BAPNA in mM						
	0.1	0.25	0.5	1.0	2.0	1.0 ohne Cystein
Zugabe von μ l Volumen						
Testpuffer	300	300	300	300	300	300
H₂O	1580	1580	1580	1580	1580	1580
DMSO	114	105	90	60	—	60
BAPNA	6	15	30	60	120	60
<u>Startlösung</u>						
Cystein	100	100	100	100	100	—
+ Enzym	1000	1000	1000	1000	1000	1000

eingesetzte Stammlösungen und deren Endkonzentration im Test

1. Testpuffer	K-Phosphat 300 mM pH 6,0	30 mM
	KCl 100 mM	10 mM
	EDTA 10 mM	1 mM
2. L-Cystein	150 mM pH 6,0	5 mM
3. BAPNA (Substrat)	50 mM in DMSO	0.1–2 mM

Formel, mit der man die Stoffmenge einer Substanz errechnen kann, um eine Lösung bestimmter Konzentration zu erhalten:

$$m = c M V$$
$$g = \text{mol/l} \cdot g/\text{mol} \cdot l$$

m = Stoffmenge der betreffenden Substanz

Einheit in [g]

c = Konzentration der Lösung

Einheit in [mol/l]

M = molare Masse der betreffenden Substanz

Einheit in [g/mol]

V = Endvolumen der Lösung

Einheit in [l]