

Purificación y caracterización parcial de una enzima dextranasa a partir de una cepa de hongo del género *Penicillium*

M. RAÍCES, M. C. MOLERO, I. M. LI, V. MORERA, H. ROCA, J. DELGADO, J. CREMATA y L. HERRERA

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Apartado 6162, La Habana 6, Cuba

Recibido en junio de 1990

Aprobado en noviembre de 1990

RESUMEN

Una fracción dextranasa (EC 3.2.1.11) excretada por un hongo del género *Penicillium*, fue purificada después de cinco días de inducción de la enzima en cultivo sumergido en agitación a 28°C. El crudo enzimático fue precipitado con 80% de sulfato de amonio, resuspendido en tampón acetato y aplicado en cromatografías sucesivas de filtración por gel e intercambio iónico. La fracción homogénea de dextranasa está formada por dos bandas de proteínas superpuestas con un peso molecular aproximado de 67 000 Da, un nivel de glicosidación entre 15-18% y un punto isoeléctrico a pH 3,88. La actividad específica osciló entre 1 500 y 2 000 U/mg de proteína con un máximo de actividad a pH 5.

SUMMARY

A dextranase (EC 3.2.1.11) excreted by a *Penicillium* strain was purified after 5 incubation days in agitated submerged cultures at 28°C. The protein pool was precipitated by using 80% of ammonium sulphate. The pellet was resuspended in acetate buffer pH 5 and purified by successive gel filtration and ion exchange chromatographies. The purified dextranase is formed by two overlapped protein bands with an average molecular weight of 67 000 Da, a glycosylation level between 15-18% and an isoelectric point at pH 3.88. The specific activity was between 1 500-2 000 U/mg of protein at pH 5 as optimal pH.

INTRODUCCION

La dextrana es un polímero de glucosa formado por enlaces $\alpha(1-6)$ glucopiranosidos, que resulta indeseable durante el proceso fabril de azúcar de caña (Reed, 1975). La formación de dextranas en los centrales azucareros se debe mayormente a la contaminación de la caña de azúcar por bacterias del género *Leuconostoc* capaces de proliferar y sintetizar dextranas a partir de la sacarosa cuando, en condiciones tropicales, al corte mecanizado de la caña se le suman factores como la demora en el alza y el transporte al central azucarero.

Entre otras vías, la hidrólisis enzimática de este polímero ha sido estudiada como posible solución al problema, al existir numerosos microorganismos capaces de sintetizar enzimas dextranasas (EC 3.2.1.11, α -1,6-glucan 6-glucanohidrolasa) (Hattori *et al.*, 1980). En este entorno los microorganismos productores de dextranasa más estudiados han sido hongos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* (Hattori *et al.*, 1981).

A partir de aislamientos nacionales, una cepa de hongo del género *Penicillium* ha sido caracterizada como una potente productora de dextranasa. Esta enzima ha sido objeto de estudio por nuestro grupo para su clonación y expresión en hospederos de mayor potencialidad, abarcando este trabajo su inducción, purificación y caracterización parcial, lográndose un material con más del 95% de pureza.

MATERIALES Y METODOS

Organismo

Cepa de hongo del genero *Penicillium* suministrada por el Instituto Cubano de Investigaciones de la Industria Azucarera (ICINAZ).

Cultivo del microorganismo

La cepa de *Penicillium* fue cultivada en 5 l de medio constituido por 2% dextrana técnica (C.A.I. España Republicana); 0,7% NaNO₃; 0,35% KH₂PO₄; 0,07% MgSO₄ 7 H₂O; 0,002% extracto de levadura, el pH fue ajustado a 6, con NaOH 1N. En otro cultivo la dextrana fue sustituida por glucosa como fuente de carbono. Los medios fueron esterilizados por autoclave a 114°C, 0,7 atm durante 20 minutos. Todos los reactivos fueron de uso general.

El medio fue inoculado con una concentración de 10⁶ esporas totales de *Penicillium* por cultivo. Los cultivos sumergidos fueron incubados durante 5 días a 28°C con agitación de 200 rpm utilizando una zaranda orbital (RETOMED ZT001, Cuba).

Actividad dextranasa

La actividad dextranasa fue medida tomando como base la producción de azúcares reductores a partir de dextrana T-500 (Pharmacia Fiye Chemicals, Suecia) en presencia de una solución enzimática (Kosaric *et al.*, 1973) incubada durante 15 minutos en solución de 50 mM NaAc pH 5.

Los azúcares reductores fueron determinados por ADNs (Miller, 1959). La concentración de proteínas fue determinada por Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Una unidad de actividad dextranasa fue definida como la cantidad de enzima que libera un micromol de azúcar reductor (glucosa) por minuto (Madhu y Prabhu, 1983).

Purificación de la enzima

La purificación de la dextranasa fue realizada a partir del sobrenadante del cultivo después de 120 horas de incubación y una actividad enzimática entre 70 y 100 U/ml. El micelio y otros sólidos fueron separados por centrifugación a 3 000 rpm durante 20 minutos a 4°C (Centrífuga Hitachi SCR-7B, rotor RPR54-8, Japón). El sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de nailon y precipitado a 4°C con (NH₄)SO₄ (comercial) a un 80% de saturación. El precipitado fue dejado toda la noche y centrifugado al siguiente día a 10 000 rpm durante 20 minutos a 4°C (Centrífuga Hitachi SCR-20B, rotor 12-2). El precipitado fue resuspendido en 50 mM NaAc pH 5 en agitación durante 30 minutos a 4°C. La solución fue centrifugada nuevamente en las mismas condiciones y el proceso repetido una vez más, hasta que no se obtuvo actividad dextranasa significativa en el precipitado resuspendido.

El sobrenadante colectado fue pasado por una columna de filtración por gel de agarosa-poliacrilamida (AcA 44, LKB, Suecia) de 70 ml de volumen, equilibrada en tampón 10 mM (NH₄)Ac pH 5 y a una velocidad de flujo de 1,5 ml/min; 10 ml de la fracción dextranasa obtenida fue pasada a continuación por cromatografía analítica de intercambio iónico utilizando una columna de intercambio aniónico DEAE-TSK 3SW (LKB, Suecia) y un gradiente de 10-1 000 mM de (NH₄)Ac pH 5 en 30 minutos con un período isocrático inicial de 15 minutos y un flujo de 0,9 ml/min (HPLC, LKB, Suecia). La fracción dextranasa fue recromatografiada según las mismas condiciones.

El chequeo de pureza se realizó por electroforesis en gel de poliácridamida (PAGE-SDS) al 12% (Laemmli, 1970). Como marcadores de peso molecular fueron usados fosforilasa b 94 kDa, albúmina 67 kDa, ovoalbúmina 43 kDa, anhidrasa carbónica 30 kDa, inhibidor de tripsina 20 kDa y lactoalbúmina 14,4 kDa (LMW kit, Pharmacia, Suecia). Las fracciones purificadas fueron liofilizadas y conservadas a -20°C para su caracterización.

Determinación del punto isoelectrico y el nivel de glicosidación

El punto isoelectrico se determinó por focalización isoelectrica mediante microgeles de focalización (Pharmacia, Suecia). El contenido de azúcares se determinó mediante la hidrólisis ácida de los residuos glicosídicos y su determinación por ácido sulfúrico, antrona.

Determinación del contenido aminoacídico de la dextranasa

Los análisis de aminoácidos se realizaron en tres condiciones diferentes.

Hidrólisis ácida

Tres alícuotas correspondientes a 1 nmol de proteína pura se hidrolizaron durante 1 hora a 150°C y vacío con 100 µl de HCl 6N (AnalaR BDH) conteniendo 0,1% de fenol y 0,1% de betamercaptoetanol (Allen, 1989).

Hidrólisis ácida de la proteína oxidada (para la determinación de cisteína como ácido cisteico y metionina como metionina sulfona)

Tres alícuotas de la proteína pura, cada una con 1 nmol, se oxidaron por separado con 100 µl de ácido per fórmico durante 4 horas a 0°C. El ácido fue evaporado a 60°C al vacío, hidrolizándose la muestra con 100 µl de HCl 6N como se describió anteriormente (Glazer et al., 1976).

Hidrólisis con ácido mercaptoetanosulfónico (para determinar triptofano)

Se hidrolizaron 0,5 mg de la proteína con 30 µl de ácido mercaptosulfónico durante 24 horas a 110°C y vacío. La hidrólisis se efectuó por duplicado (Allen, 1989a). Los análisis se efectuaron en un analizador de aminoácidos Alpha Plus 4151 (LKB) utilizando una columna (270 mm x 4 mm) con intercambiador catiónico en sistema sodio. La detección se efectuó mediante fluorescencia con un fluorímetro (Waters). El procesamiento de datos se efectuó con un microprocesador (Chromatopack CR-3A, Shimadzu).

Reacción de deglicosidación de la enzima dextranasa

La deglicosidación de la enzima pura se llevó a cabo por reacción con Endo b-N acetilglucosaminidasa H (Endo-H) (E.C.3.2.1.96) según las condiciones descritas por el fabricante (Boehringer Mannheim, 1987) para lo cual a una solución de concentración de 1 mg/ml de proteína pura se le añaden 10 mU de Endo-H, incubándose en solución tampón citrato 100 mM, pH 5,5 durante 16 horas a 37°C. Para la determinación del progreso de la reacción se realizaron electroforesis en gel de poli acrilamida (12%) utilizando como control, además de los marcadores de pesos moleculares, la enzima nativa antes del tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSION

Cinética de crecimiento y acumulación de dextranasa en el medio de cultivo

La actividad enzimática dextranasa en la cepa de *Penicillium* comenzó a partir de las 50 horas de incubación en los cultivos con dextrana como fuente de carbono (figura 1). No se detectó actividad dextranasa en los cultivos con glucosa. El contenido de reductores en el cultivo con glucosa se hizo mínimo a partir de las 70 horas.

Los valores de actividad dextranasa se incrementaron hasta las 140 horas de forma apreciable.

Purificación de la enzima

La precipitación del crudo de proteínas extracelular del *Penicillium* con 80% de sulfato de amonio recuperó un 53% del total de actividad dextranasa inicial. El precipitado resuspendido en 50 ml de tampón 50 mM NaAc pH 5 incrementó la actividad específica dextranasa 4,4 veces después del desalado y concentración enzimática correspondiente a la filtración por gel. El crudo de proteínas se transfirió a tampón 10 mM acetato de amonio aumentando su volumen 2,3 veces. La cromatografía de intercambio iónico mostró la existencia de una fracción mayoritaria con actividad dextranasa (figura 2). La fracción dextranasa colectada y recromatografiada resultó homogénea cromatográficamente (figura 3) constituida por dos bandas de proteínas sobrelapadas de un peso molecular aproximado de 67 000 Da en electroforesis PAGE-SDS 12%. En condiciones de reducción con β-mercaptoetanol, las dos bandas se definieron con mayor nitidez, además de aparecer nuevas bandas en la región de 44 000 dalton.

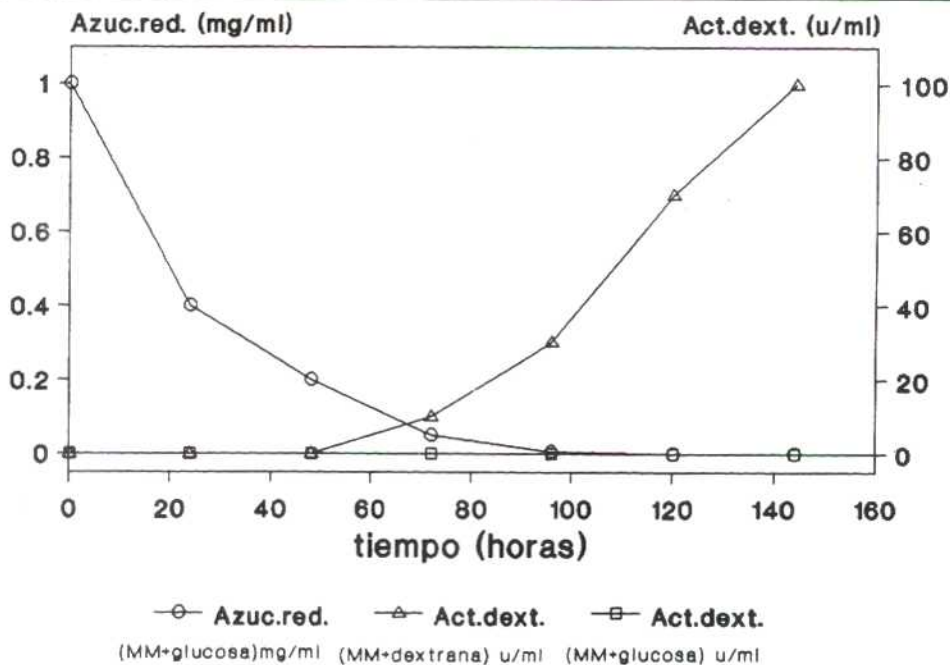


FIG. 1. Inducción de la enzima dextranasa en cultivo líquido utilizando dextrana y glucosa como fuente de carbono. Consumo de reductores por el hongo en el medio con glucosa como fuente de carbono.

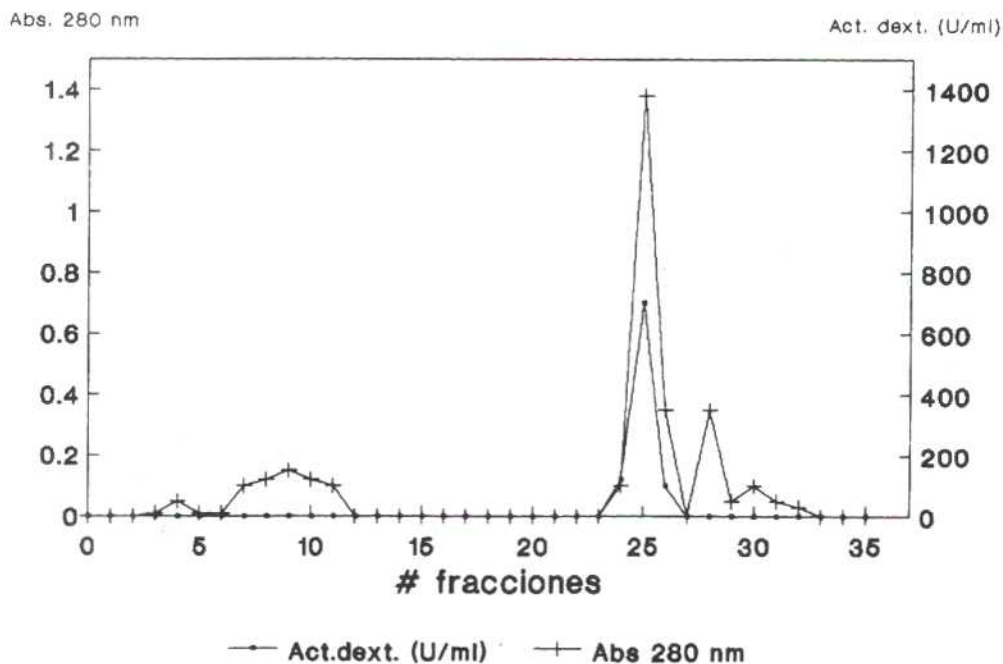


FIG. 2. Patrón cromatográfico del crudo dextranasa en la cromatografía de intercambio iónico.

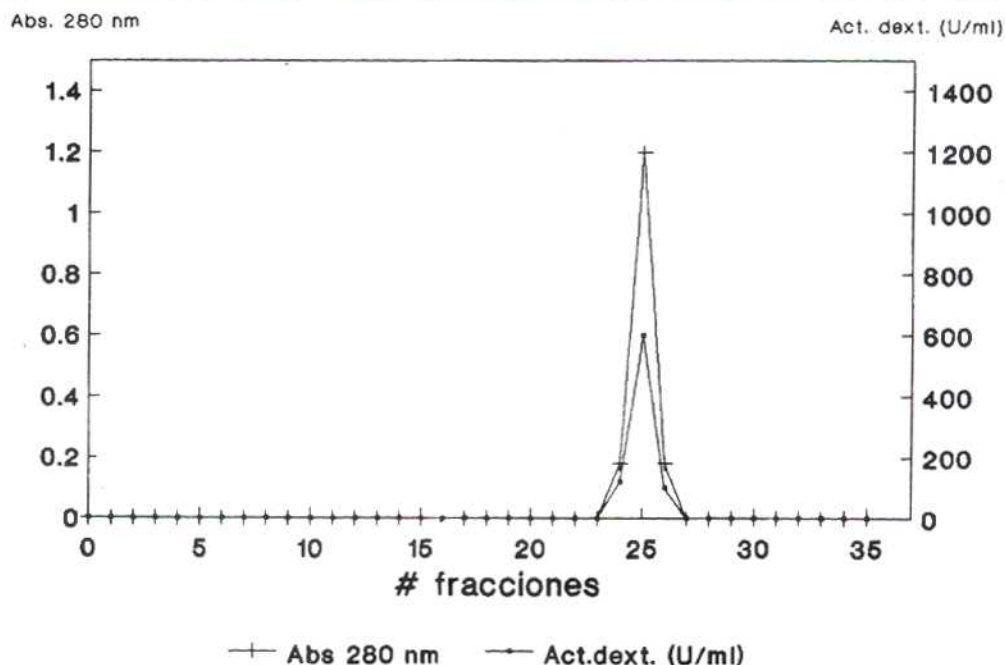


FIG. 3. Patrón cromatográfico de la fracción dextranasa purificada en la cromatografía de intercambio iónico.

La tabla 1 muestra el balance general de actividades obtenido en la purificación realizada.

proteínas a pH 3,88. El estudio de la variación de la actividad enzimática en función del pH indicó un valor óptimo

Tabla 1
BALANCE DE LA PURIFICACION ENZIMATICA DE LA DEXTRANASA

Fracción	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	Ast.Esp. (μ /mg)	Act.total	Recobrado (%)
Crudo	5 000	0,7	160	504 000	100
Precipitado	58	4,9	938	266 858	53
Filtr. gel	138	1,5	1 239	252 402	50
Int. Iónico	60	0,7	1 885	79 200	15

Caracterización de la fracción dextranasa purificada

Las muestras purificadas corridas en geles de focalización isoelectrica dieron lugar a la aparición de dos bandas de

de actividad a pH 5 con una actividad específica entre 1 500-2 000 U/mg de proteína. El producto obtenido con actividad enzimática presentó de 15-18% de glicosidación.

La composición aminoacídica de la dextranasa obtenida a partir de los tres tipos de hidrólisis aplicadas permitió reportar por primera vez el contenido de aminoácidos de esta proteína.

Los datos que se reportan en la tabla 2 corresponden al contenido aminoacídico de la proteína, obtenido y normalizado con respecto al valor del aminoácido HIS que se tomó como un residuo.

Tabla 2
COMPOSICION AMINOACIDICA
DE LA DEXTRANASA

Aminoácido	Valor Promedio	Desviación estándar
AC *	0,4	0,4
B *	4,4	0,2
MS *	0,5	0,5
T	2,2	0,04
S	2,3	0,16
Z *	3,1	0,12
G	3,8	0,33
A	2,3	0,33
V	2,9	0,04
I	2,8	0,04
L	1,6	0,04
Y	1,8	0,04
F	1,7	0,04
H	1,0	0
K	1,1	0,04
R	1,0	0
W	0,6	0,03

- * AC - ácido cisteico
- B - ASP + ASN
- MS - metionina sulfona
- Z - GLU + GLN

La existencia de actividad dextranasa en los cultivos sumergidos cuando la dextrana fue usada como fuente de carbono y el reporte de los incrementos de la actividad enzimática después de las 50 horas de incubación en las condiciones descritas, son semejantes a las reportadas para otras especies del género *Penicillium* (Kosaric *et al.*, 1973) donde se describe a la dextranasa como una enzima inducible no asociada al crecimiento del microorganismo, considerando que en el cultivo con glucosa el agotamiento de azúcares se manifestó totalmente a las 70 horas, mientras que en ese tiempo los valores de actividad dextranasa representaban alrededor del 10% de los valores finales de actividad. La evaluación de la actividad enzimática a tiempos mayores de 144 horas no fue considerada, para evitar la posible afectación o modificación de los crudos enzimáticos por la acción de posibles proteasas provenientes de la lisis celular.

El procesamiento de los cultivos con la enzima dextranasa se caracterizó por constituir la fracción enzimática de mayor proporción en los crudos.

La descripción de esta cepa por Cuervo (Cuervo *et al.*, 1985) como una buena excretora de dextranasa, fue corroborada por nosotros (resultados no mostrados) al superar en actividad a otras cepas provenientes de colecciones internacionales de los géneros *Penicillium* y *Poecilomyces*.

El comportamiento electroforético de la fracción dextranasa purificada, ocasionado por la aparición de dos bandas sobrelapadas se semeja a los resultados obtenidos por Lee y Fox (1985) quienes reportaron dos isoenzimas dextranasas en una cepa de *Poecilomyces lilacinus* (ATCC 10114). Así también, la focalización isoelectrica mostró que esta fracción de dos bandas

estaba constituida por especies similares en cuanto a su punto isoeléctrico, al apreciarse la aparición de un doblete de precipitación a pH 3,88.

La presencia de nuevas bandas de proteínas en la región de 44 000 Da en condiciones de reducción con β -mercaptoetanol a partir de una fracción homogénea de 67 000 Da en electroforesis de geles de poliacrilamida, se semeja a resultados obtenidos en variantes de prolactina humana por Meuris *et al.* (1984), quienes atribuyen la aparición de nuevas bandas en condiciones de reducción al carácter polimérico de algunas proteínas constituidas por varias subunidades, algunas unidas entre sí por la presencia de puentes disulfuro.

De la determinación del contenido de aminoácidos se comprobó la existencia de varios residuos de cisteína, lo que posibilitaría la presencia de uno o más puentes disulfuros; estos resultados

confirman la aparición de varias bandas en PAGE-SDS, después de reducida la muestra.

La existencia de posibles sitios de glicosidación en la molécula posibilitaría la aparición de más de una banda proteica en electroforesis de geles de poliacrilamida (glicosilada y no glicosilada), así como un rango mayor de distribución de pesos moleculares, efecto que se nota por la presencia de bandas difusas en geles de 12%, dado que la glicosidación determinada (15-18%) puede generar especies diferentes dependiendo del grado de glicosidación de cada una. Con relación a este aspecto, Danilova *et al.* (1983) reportan la existencia de pequeñas cantidades de glucosamina y manosa asociadas a una dextranasa de *Penicillium funiculosum*, pero no covalentemente enlazadas a la misma.

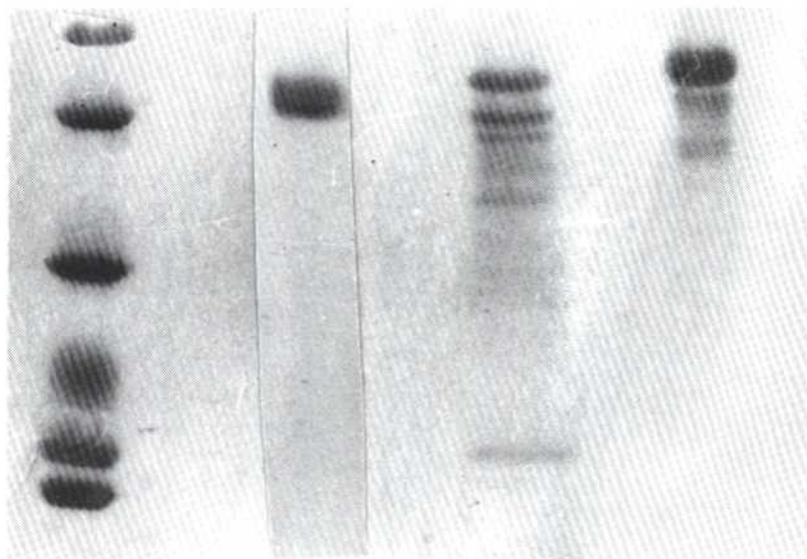


FIG. 4. Electroforesis a la dextranasa deglicosilada con Endo-H (de izquierda a derecha): 1) patrón de pesos moleculares; 2) proteína nativa; 3) dextranasa deglicosilada; 4) proteína nativa en condiciones de reducción.

Sin embargo, en estudios iniciales de deglicosidación de la enzima purificada por hidrólisis enzimática con Endo-H, aparece una fracción de aproximadamente 4 000 Da menor que la dextranasa nativa (figura 4); esto sugiere la existencia de glicosidaciones del tipo N enlazadas. Por otro lado, se mantiene una parte que no disminuye en peso molecular, lo que podría atribuirse a la existencia de glicosidaciones del tipo O enlazadas o sitios N enlazados muy resistentes a la deglicosidación, si se tiene presente que se empleó una relación de 100 mU de Endo-H/mg de proteína.

REFERENCIAS

- ALLEN, G. (1989). "Preliminary characterization of the protein", en: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Sequencing of Proteins and Peptides*. (Eds. R.H. Burdon y P.H. van Knippenberg). Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, p. 41.
- ALLEN, G. (1989a). "Preliminary characterization of the protein". En: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Sequencing of Proteins and Peptides*. (Eds. R.H. Burdon y P.H. van Knippenberg). Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, p. 43.
- BARRET, J. F y R. CURTISS III (1986). Renaturation of dextranase activity from culture supernatant fluids of *Streptococcus sobrinus* after sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **158**: 365-370.
- CUERVO, R.; B. GUILARTE; E. R. FERNANDEZ y B. DESCALZO (1985). *Propiedades de la dextranasa del Penicillium funiculosum HI-4*. IX Seminario Científico del CNIC. La Habana, Cuba.
- DANILOVA, T. I.; V. I. MAKSIMOV; A. I. CHUKHROVA y G. A. MOLODOVA (1983). Carbohydrate component of dextranase from *Penicillium funiculosum*. *Prikladnaya Biokhimiya Mikrobiologiya*. **19**(1): 104-110.
- GLAZER, N.; R. J. DELANGE y D. S. SIGMAN (1976). "Chemical modification of proteins". En: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. (Eds. T.S. Work y T. Work), North Holland/American. Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York, p. 23.
- HATTORI A. y K. ISHIBASHI (1980). Screening of dextranase producing microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* **45**(10): 2347-2349.
- HATTORI, A.; K. ISHIBASHI y S. MINATO (1981). The purification and characterization of the dextranase of *Chaetomium gracile*. *Agric. Biol. Chem.* **45**(11): 2409-2416.
- KOSARIC, N.; K. YU y J. E. ZAJIC (1973). Dextranase production from *Penicillium funiculosum*. *Biotech. Bioeng.* **XV**. 729-741.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* **227**:680-685.
- LEE, J. M. y P. F. FOX (1985). Purification and characterization of *Paecilomyces lilacinus* dextranase. *Enzyme Microb. Technol.* **7**: 573-577.
- LOWRY, D. H.; N. J. ROSEBROUGH; A. L. FARRY y R. J. RANDALL (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-269.
- MADHU, M. y K. A. PRABHU (1983). Studies on dextranase from *Penicillium aculeatum*. *Enzyme Microb. Technol.* **6**: 217-221.
- MEURIS, S.; M. SVOBODA; J. CHRISTOPHER y C. ROBIN (1984). Cleaving of disulfide bridges and apparent molecular weight of human prolactin variants as revealed by immunoperoxidase electrophoresis. *Anal. Biochem.* **143**: 163-169.
- MILLER, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- REED, G. (1975). *Enzymes in Food Processing*. 2nd Edition, Academic Press, pp. 509-510.