

Obtención de quimosina bovina expresada en forma de cuerpos de inclusión insolubles en *Escherichia coli*

R.E. NARCIANDI, Y. QUIÑONES, J. MORALES, I. TORRENS y L. HERRERA

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

Recibido en junio de 1991

Aprobado en noviembre de 1991

RESUMEN

La obtención de proquimosina bovina expresada de manera insoluble en *Escherichia coli* bajo el control del promotor triptófano, fue estudiada. Se analizó el efecto de la cepa hospedera en la expresión de la proquimosina y se realizó la cinética de producción, obteniéndose 10% de expresión al utilizar la cepa MC-1061.

La insolubilidad de la proteína recombinante fue utilizada como estrategia para su purificación, describiéndose un procedimiento de lavado de los agregados insolubles que brinda un material final con más de 50% de pureza.

La influencia del tiempo de inducción en la eficiencia del proceso de renaturalización fue determinada, lográndose 31% de recuperación de la proteína en su forma activa. Además, se determinó la influencia de diferentes concentraciones de NaCl y la temperatura en la precipitación de la quimosina activa, obteniéndose 85% de recuperación de la actividad biológica al utilizar NaCl 4,5 molar como agente precipitante, independientemente de la temperatura utilizada.

SUMMARY

The obtention of bovine prochymosin expressed in an insoluble form in *Escherichia coli* under the control of the Tryptophan promoter, was studied.

The effect of the host strain upon the prochymosin gene expression was analyzed and the kinetics of prochymosin production in the strain MC-1061, reaching a 10% of expression, carried out.

A purification strategy was designed taking advantage of the insolubility of the recombinant protein. A wash procedure is described for the insoluble aggregates that yielded a final product with more than 50% of purity.

The influence of induction time on the efficiency of renaturation was analyzed, getting a 31% recovery of the active protein. The influence of different salt (NaCl) concentrations and temperatures upon the precipitation of active chymosin was also tested. It was found a 85% recovery of the coagulant activity using 4.5 M NaCl as precipitating agent, independently of the assay temperature.

INTRODUCCION

La quimosina de ternero, enzima responsable de la coagulación de la leche, es una proteasa utilizada ampliamente en la producción de quesos, sin embargo, su oferta en el mercado se ha visto disminuida en los últimos años a causa de los problemas presentados en el escalado de su producción (Beppu, 1983).

La clonación y expresión de la proquimosina (zimógeno de la quimosina) en *E. coli* ha sido reportado por varios laboratorios (Emtage *et al.*, 1983; Nishimori y Shimizu, 1984; Morales *et al.*, 1989), siendo en la mayoría de los casos sintetizada en forma insoluble.

En este trabajo se describe un proceso para la producción y purificación de quimosina activa a partir de células de *E. coli*.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas y plasmidios

El plasmidio pRT 108 utilizado para sintetizar eficientemente Met-proquimosina bajo el control del promotor triptófano en células de *E. coli*, fue descrito previamente (Morales *et al.*, 1989).

Las cepas de *E. coli* utilizadas como hospedero fueron: JM-101; HB-101; MC 1061 (Maniatis *et al.*, 1989).

Condiciones de cultivo

Una colonia de *E. coli*, conteniendo el plasmidio pRT 108, fue inoculada en 100 ml de medio L.B. (Maniatis *et al.*, 1989) conteniendo 50 µg/ml de ampicilina y 100 µg/ml de triptófano. El cultivo fue realizado a la temperatura de 37°C y 250 rpm de agitación. Las células fueron colectadas al comienzo de la fase logarítmica de crecimiento y utilizadas como inóculo de los diferentes cultivos realizados en medio M 9 (Miller, 1972) suplementado con 1% de glucosa, 0,2% de hidrolizado de caseína y 50 µg/ml de ampicilina.

El cultivo en zaranda (modelo G-25, New Brunswick Scientific Co., Inc., U.S.A.) fue desarrollado en erlenmeyers de 500 ml conteniendo 100 ml de medio a 37°C, 9 horas y 250 rpm, mientras que el escalado fue realizado en fermentadores de 7,5 l (B.E. Marubishi, Japón) que presentan 5 l de volumen efectivo y las condiciones de crecimiento fueron: 37°C, 1 vvm y 500 rpm.

En todos los casos, la densidad óptica inicial fue 0,05 (530 nm) y la inducción de la proquimosina recombinante fue realizada después de 1 hora de cultivo, añadiendo 20 µg/ml de ácido 3-β-indolacrilico (Sigma, U.S.A.).

Lavado del precipitado celular

La biomasa obtenida en el proceso fermentativo fue resuspendida a la concentración de 100 g/l en tampón (fosfato de sodio 0,05 molar; pH 7,2) (solución A), suplementado con 1% de Tritón X-100 (Merck, RFA), lavado y finalmente centrifugado a 16 000 x g durante 20 min a 4°C. Las células fueron lavadas en solución A, añadiéndose a continuación lisozima (Sigma, U.S.A.) a una concentración de 0,2 g/l y el material fue colocado durante 15 min a 4°C. Seguidamente se añadió deoxicolato de sodio (Oxoid, R.U.) a una concentración final de 0,2%, se homogeneizó fuertemente la solución y se procedió a un tratamiento con ultrasonido durante 10 min. Finalmente, el material insoluble fue separado por centrifugación.

Los cuerpos de inclusión aislados fueron resuspendidos utilizando solución A suplementado con Tween 80 (Merck, RFA) al 0,5% mediante homogeneización fuerte. Posterior a la centrifugación, los agregados insolubles fueron lavados con NaCl 5 M y MgSO₄ 1 M. La solución fue mantenida durante 30 min a 25°C y posteriormente fueron realizados lavados sucesivos utilizando solución A con el objetivo de eliminar los restos de detergentes y sales.

Solubilización, renaturalización y activación de la proquimosina

El precipitado resultante del procedimiento de lavado es resuspendido en fosfato de potasio 50 mM (pH 7,2); NaCl 50 mM; PMSF 1 mM; EDTA 1 mM y urea 8 molar. La solución fue mantenida durante 30 min a 37°C con agitación lenta; posteriormente la concentración de urea fue disminuida hasta 4 molar y el material insoluble fue separado por centrifugación obteniéndose más del 90% de solubilización en todos los experimentos realizados.

La solución de proquimosina fue ajustada a una concentración de proteína total de 0,5 mg/ml y fue renaturalizada mediante dilución (1/10) durante 4 h, utilizando la solución de solubilización sin agente caotrópico. A continuación la solución de proquimosina renaturalizada fue centrifugada durante 1 h a 16 000 x g a 4°C. La activación de la proquimosina se realizó según lo descrito por Goff y Moir, 1984 y la actividad enzimática se determinó según el procedimiento descrito por Foltmann, 1970.

Precipitación salina

La quimosina activa fue precipitada utilizando NaCl a concentraciones de 1,5; 2,5; 3,5 y 4,5 molar. Se utilizó como solución base fosfato de potasio

0,05 molar a pH 4.5. Las experiencias fueron realizadas a 25°C y a 4°C manteniendo la solución en reposo durante 12 horas y a continuación se centrifuga a 16 000 x g durante 30 min y se elimina el sobrenadante. La proteína una vez precipitada, es resuspendida en solución base (pH 6,3) y el material insoluble es eliminado por centrifugación en las condiciones expuestas anteriormente. A continuación es determinada la actividad coagulante de la quimosina soluble.

Métodos analíticos

La electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% conteniendo SDS, se realizó según Laemmli, 1970. El porcentaje de expresión fue estimado mediante densitometría (Hoefer Instrument, S.I., U.S.A.). Las proteínas fueron determinadas por el método de Lowry *et al.*, 1951. La masa celular seca fue determinada centrifugando volúmenes fijos de cultivo en un tubo previamente tarado, seguido por secado a 80°C hasta obtener peso constante. La eficiencia del proceso de renaturalización es el porcentaje que representa la actividad enzimática final obtenida en relación con la proquimosina de partida estimada mediante densitometría y proteína total.

Análisis estadístico

Los análisis de significación se realizaron utilizando el procedimiento "t" de Student ($\alpha = 0,05$). En cada ensayo se realizaron tres experimentos independientes.

RESULTADOS Y DISCUSION

Influencia de la cepa hospedera en la obtención de la proquimosina bovina

Las cepas JM-101, HB-101, MC-1061 transformadas con el plasmidio pRT 108 fueron cultivadas e inducidas durante 9 h, las proteínas celulares fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y se determinó el crecimiento celular.

Al comparar las diferentes cepas utilizadas (tabla 1), analizando el peso seco se obtiene que las cepas HB-101 y MC-1061 brindan

valores similares entre sí y significativamente mayores comparados con los resultados obtenidos con la cepa JM-101. Además se demuestra que al utilizar la cepa MC-1061 se alcanza un nivel de expresión significativamente mayor que las demás cepas utilizadas, por lo que se demuestra que este parámetro depende en gran medida del hospedero utilizado para la expresión de proteínas recombinantes (Vega *et al.*, 1991).

Tabla 1
INFLUENCIA DE LA CEPA HOSPEDERA EN LA OBTENCION DE LA PROQUIMOSINA BOVINA

Cepas	Peso seco (g/l)	Expresión (%)
JM-101	1,49 ± 0,026	3 ± 0,55
HB-101	1,79 ± 0,041	5 ± 0,89
MC-1061	1,68 ± 0,011	10 ± 0,58

Los cultivos fueron realizados a nivel de zaranda utilizando medio M 9 suplementado con 1% de glucosa, hidrolizado de caseína al 0,2% y 50 µg/ml de ampicilina. La producción de la proquimosina fue inducida añadiendo 20 µg/ml de ácido 3-β-indolacrílico.

Los mejores resultados fueron obtenidos al utilizar la cepa MC-1061 (pRT 108), en la que el crecimiento fue de 1,68 g/l de peso seco y la proteína heteróloga es expresada al 10% de la proteína total de la célula.

Cinética de obtención de la proquimosina recombinante

El cultivo de la cepa MC-1061 (pRT 108) fue escalado a nivel de 5 l de cultivo y se tomaron muestras a diferentes tiempos de inducción (0, 3, 6 y 9 h).

Tabla 2
CINETICA DE OBTENCION
DE LA PROQUIMOSINA RECOMBINANTE

Inducción (horas)	Expresión (%)	Peso seco (g/l)
0	N.D.	0,06 ± 0,011
3	7 ± 0,57	0,77 ± 0,032
6	9 ± 1,00	1,83 ± 0,025
9	10 ± 0,89	2,29 ± 0,041

N.D. (no determinado).

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2, donde se observa que el peso seco celular aumenta hasta las 9 h de inducción y alcanza un valor de 2,29 g/l, mientras que a partir de las 6 h de inducción se obtiene aproximadamente el 10% de expresión (figura 1). Niveles de expresión similares han sido reportados por Marston *et al.*, 1984 y Kawaguchi *et al.*, 1987.

La proteína obtenida fue estudiada previamente mediante *Western blot* y microscopia electrónica (Morales *et al.*, 1989), demostrándose que la proquimosina bovina era expresada intracelularmente en forma de cuerpos de inclusión insolubles.

Lavado del precipitado celular

Los cuerpos de inclusión producidos fueron aislados y prepurificados mediante un procedimiento constituido por lavados sucesivos utilizando diferentes sales y detergentes (ver *Materiales y Métodos*). Mediante este proceso se obtiene un material enriquecido en la proteína de interés con más de 50% de pureza. Procedimientos análogos han sido utilizados por otros autores con vistas a purificar proteínas expresadas en *E. coli* de forma insoluble (Schoner *et al.*, 1985 ; Rhee *et al.*, 1990).

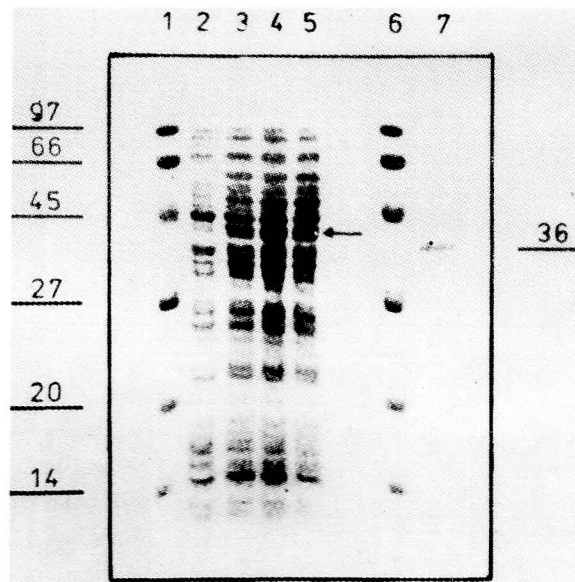


FIG. 1. Cinética de expresión de proquimosina: 1,6) Marcadores de pesos moleculares (kDa); 2,3,4,5) 0, 3, 6 y 9 horas de inducción respectivamente; 7) Quimosina comercial (36 kDa). La flecha indica la proteína de interés.

Renaturalización de la proquimosina

Uno de los problemas fundamentales que se presentan en la producción de proteínas recombinantes expresadas en forma insoluble en *E. coli*, es el relacionado con la solubilización y renaturalización de los agregados formados con vistas a obtener la proteína en su forma nativa y con actividad biológica (Shibui *et al.*, 1989).

Como es conocido, la eficiencia del proceso de renaturalización depende en gran medida de la solubilidad que presenten los agregados formados por la proteína de interés, lo que es influenciado, entre otros aspectos, por las condiciones de cultivo, como por ejemplo, la temperatura (Schein y Noteborn, 1988) y el tiempo de inducción.

Para determinar la influencia del tiempo de fermentación después de la inducción, sobre el nivel de agregación y estado conformacional de la proteína expresada como cuerpo de inclusión, se realizó una cinética de crecimiento y se tomaron muestras de cultivo a diferentes tiempos de inducción (4, 8, 12, 16, 20 y 24 h). Las muestras fueron sometidas a los procesos de lavado del precipitado celular, solubilización de los agregados insolubles y renaturalización, tomándose la recuperación de la actividad enzimática después de la renaturalización como medida del nivel de agregación y estado conformacional de la proteína durante la fermentación.

Las muestras correspondientes a las diferentes horas se solubilizaron utilizando urea 8 molar sin presencia de agente reductor, en igualdad de condiciones, obteniéndose más de 90% de extracción en todos los casos.

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos, observándose que al utilizar como tiempo de inducción 8 h, se obtiene

en el proceso de renaturalización de la proquimosina bovina una eficiencia de 31%, mientras que al utilizar un tiempo de inducción diferente la eficiencia disminuye significativamente.

Tabla 3
EFICIENCIA DEL PROCESO
DE RENATURALIZACION

Tiempo de inducción (horas)	Eficiencia de renaturalización (%)
4	7 ± 1,10
8	31 ± 3,22
12	9 ± 2,21
16	9 ± 2,98
20	4 ± 2,01
24	1 ± 0,91

La eficiencia del proceso de renaturalización es el porcentaje que representa la actividad enzimática final obtenida en relación con la proquimosina de partida estimada mediante densitometría y proteína total.

Esto se debe a que durante la fermentación el nivel de agregación de la proteína, así como el grado de oxidación-reducción de los grupos sulfidrilos es diferente, pudiendo plantearse que a las 8 h de inducción el estado conformacional de la proteína como cuerpo de inclusión es el más adecuado para alcanzar un alto recobrado de la actividad enzimática, por lo que se propone detener la fermentación en este tiempo. Un factor no estudiado en este experimento es la presencia o no de agentes reductores durante la solubilización, con vistas a lograr una completa linealización de la molécula durante la renaturalización y evitar la formación de agregados que precipitan durante el proceso (Kawaguchi *et al.*, 1987)

y la formación de enlaces disulfuros incorrectos que conducen a la pérdida de actividad biológica (Kawaguchi *et al.*, 1984).

Los resultados obtenidos se encuentran ligeramente por encima de los valores reportados por otros autores al utilizar en el proceso de renaturalización la dilución lenta (Marston *et al.*, 1984) o un proceso de diálisis (Kawaguchi *et al.*, 1987) con el objetivo de disminuir la concentración del agente desnaturalizante.

Precipitación de la quimosina activa

Con el objetivo de obtener la quimosina de una forma más pura y concentrada, se realizaron ensayos de precipitación salina mediante el estudio de diferentes parámetros: concentración de la sal utilizada y temperatura. Los resultados expresados en la figura 2 demuestran que al aumentar la concentración de NaCl, el porcentaje de

recuperación de la actividad biológica se incrementa significativamente hasta 85% cuando se utilizó NaCl 4,5 molar como agente precipitante, demostrándose que al utilizar altas concentraciones de NaCl se favorece la precipitación y estabilidad de la quimosina (Cisneros y Berdellans, 1972), no existiendo una variación significativa al utilizar 25°C o 4°C como temperatura de precipitación.

El procedimiento utilizado permitió obtener un preparado final con más de 80% de pureza, por lo que se utilizó como un paso de purificación en el proceso de obtención de la quimosina.

REFERENCIAS

- BEPPU, T. (1983). The cloning and expression of chymosin (rennin) genes in microorganisms. *Trends in Biotechnology* 1: 85-89.

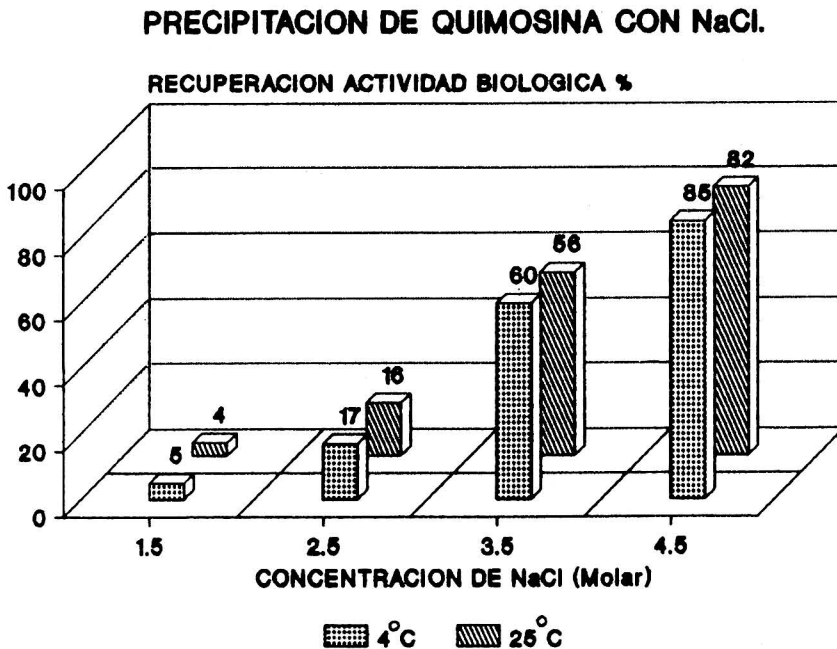


FIG. 2. Precipitación de quimosina con NaCl.

- CISNEROS, F. y C.D. BERDELLANS (1972). Estudio sobre la elaboración de cuajo en polvo a partir de jugo gástrico de terneros lactantes. *C.N.I.C.* 4: 115-122.
- EMTAGE, J.S.; S. ANGAL; M.T. DOEL; T.J.R. HARRIS; B. JENKINS; G. LILLEY y P.A. LOWE (1983). Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 80: 3671-3675.
- FOLTMANN, B. (1970). Prochymosin and chymosin. *Meth. Enzym.* 19: 421-436.
- GOFF, C.G. y D.T. MOIR (1984). Expression of calf prochymosin in *S. cerevisiae*. *Gene* 27: 35-46.
- KAWAGUCHI, Y.; N. SHIMIZU; K. NISHIMORI; T. VOZUMI y T. BEPPU (1984). Renaturation and activation of calf prochymosin produced in an insoluble form in *E. coli*. *J. Biotechnol.* 1: 307-315.
- KAWAGUCHI, Y.; S. KOSUGI; K. SASAKI; T. VOZUMI y T. BEPPU (1987). Production of chymosin in *Escherichia coli* cells and its enzymatic properties. *Agric. Biol. Chem.* 51: 1871-1877.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685.
- LOWRY, O.H.; N.J. ROSEMBROUGH; A.L. FARR y R.J. RANDAL (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-269.
- MANIATIS, T.; E.F. FRITSCH y J. SAMBROOK (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Sec. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- MARSTON, F.A.O.; P.A. LOWE; M.T. DOEL; J.M. SCHOEMAKER; S. WHITE y S. ANGAL (1984). Purification of calf prochymosin (prorennin) synthesized in *E. coli*. *Biotechnology* 2: 800-804.
- MILLER, J.H. (1972). *Experiment in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- MORALES, J.; V. MUZIO; I.C. TORRENS; V. JIMENEZ; A. SILVA; A. SANTOS; Y. QUIÑONES; R.E. NARCIANDI y L.S. HERRERA (1989). Expresión del gen de la quimosina en *E. coli*. *Interferón y Biotecnología* 6: 242-250.
- NISHIMORI, K. y N. SHIMIZU (1984). Expression of cloned calf prochymosin cDNA under control of the Tryptophan promoter. *Gene* 29: 41-49.
- RHEE, H.J.; I. LEE y K.H. YANG (1990). High-level expression of human Insulin-like growth factor II in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 13: 293-304.
- SCHEIN, C.H. y M.H.M. NOTEBORN (1988). Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Biotechnology* 6: 291-295.
- SCHONER, R.G.; L.F. ELLIS y B.E. SCHONER (1985). Isolation and purification of protein granules from *Escherichia coli* cells overproducing bovine growth hormone. *Biotechnology* 3: 151-154.
- SHIBUI, T.; R. MATSUI; M. UCHIDA-KAMIZONO; H. OKAZAKI; J. KONDO; K. NAGAHARI; S. NAKANISHI y Y. TERANISHI (1989). Periplasmic production of Human Pancreatic prokallikrein in *E. coli*. *Appl. Microbiol Biotechnol* 31: 253-258.
- VEGA, M.; M.A. TUÑÓN; M. ARAÑA; H. MATA y M. QUINTANA (1991). Estudio de los factores que afectan la expresión de la interleucina-2 humana en *Escherichia coli* bajo el control del promotor triptófano. *Biotecnología Aplicada* 8: 374-382.