

Artículos sobre Técnicas

Procedimiento para la purificación de una alfa amilasa bacteriana en *Escherichia coli*.

M. RAÍCES,¹ J. MADRAZO,² E. MARGOLLES¹ y J. CREMATA¹

¹ División de Bioindustrias, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Apartado 6162, La Habana 6, Cuba

² División de Química Física (CIGB)

Recibido en enero de 1992

Aprobado en marzo de 1992

RESUMEN

El gen que codifica para una alfa amilasa proveniente de *Bacillus licheniformis* fue expresado en una cepa de *Escherichia coli* y la enzima inducida fue purificada mediante un procedimiento rápido. El crudo enzimático se obtuvo a partir de una fermentación de 24 horas a 37°C, utilizando tanto la biomasa rota por sonicación como el sobrenadante inicial obtenido; estos fueron sometidos a un tratamiento térmico a 80°C que originó una desnaturalización diferencial de proteínas con un incremento en la proporción de la fracción alfa amilasa. El crudo enzimático obtenido se aplicó en una columna de interacción hidrofóbica y la fracción alfa amilasa colectada fue desalinizada y aplicada en una columna de intercambio iónico de donde fue eluida con más del 94% de pureza. La enzima purificada presenta por SDS-PAGE un peso molecular de 60 kDa y una actividad específica de 500 U/mg de proteína.

SUMMARY

An alpha amylase gene from *Bacillus licheniformis* was expressed in an *E. coli* strain and the induced protein was purified through a quick procedure. The transformed *E. coli* strain was grown at 37°C during 24 hours. A protein extract was obtained by mixing the supernatant with the liquid portion of the sonicated biomass pellet, the mixture was heated at 80°C and the denatured proteins were taken away. The protein pool was applied into a hydrophobic interaction column being the enzymatic fraction concentrated and partially purified, after that the enzymatic pool was subjected to an anionic

exchange chromatography yielding a product with more than a 94% purity. The enzyme showed a molecular weight of 60 kDa in SDS-PAGE electrophoresis and a specific activity of about 500 U/mg of protein.

INTRODUCCION

Las enzimas industriales están llamadas a desempeñar un papel más preponderante en el contexto económico actual, al facilitarse sus volúmenes de producción por la aplicación de la ingeniería genética en nuevos procesos biotecnológicos. Dentro de esta panorámica, las enzimas del tipo alfa amilasa (EC 3.2.1.1) han sido consideradas como unas de las de mayor uso potencial, de ahí que su estudio y caracterización desempeñe un papel importante en la acumulación de criterios para el establecimiento de una estrategia de aplicación adecuada.

En este trabajo se presenta un esquema de purificación eficiente de una alfa amilasa producida por un gen de *B. licheniformis* expresado en una cepa de *E. coli*. Este gen, que codifica para una proteína termorresistente se previó

expresarlo en un microorganismo mesófilo para explorar la desnaturalización térmica selectiva como un elemento a considerar en el esquema de purificación, criterio que ya ha sido abordado satisfactoriamente por otros autores (Patchett *et al.*, 1989). Junto a este paso se pretendió evaluar la posibilidad de utilizar variantes de purificación cromatográficas que permitieran, combinadamente, la concentración de la fracción enzimática y la elución de la misma con un alto grado de pureza. Las metodologías que en este artículo se describen permiten proponer este esquema como una vía atractiva para la purificación de proteínas termorresistentes del tipo de la alfa amilasa, de una manera rápida y eficiente.

MATERIALES Y METODOS

Cepas y medios

El gen de alfa amilasa aislado por Margolles *et al* en 1992, se transformó en la cepa HB101 (F-, hsd S20 (rB-, mB-), supE44, ara14, t-, galk2, lacY1, proA2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, recA13) utilizando el plasmidio pICS2. Este plasmidio contiene el gen estructural de la enzima alfa amilasa (incluyendo la secuencia señal) bajo el control del promotor triptófano de *E. coli* y la señal de terminación del fago T4 (figura 1).

La cepa de *E. coli* fue transformada según el método de permeabilización por calcio descrito por Maniatis *et al.* (1982).

Las células transformadas fueron crecidas en el medio M9 (Na₂HPO₄ 6 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, NH₄Cl 0,1 g/L, NaCl 0,5 g/L) suplementado con hidrolizado de caseína 10 g/L, CaCl₂ 0,1 mM, MgSO₄ 1 mM y glucosa 5 g/L. (Todos los reactivos fueron de la Fluka, Suiza).

A partir de un precultivo de 5 mL de medio M9 suplementado con 100 µg/mL de triptófano, se inoculó un cultivo de 500 mL del mismo medio, incubándose a 37°C durante 12 horas para finalmente aplicar este volumen como inóculo, en un fermentador de 5 litros (Marubishi, Japón) (3,5 litros de volumen de trabajo) conteniendo medio M9 suplementado con triptófano a 20 µg/mL, las células fueron crecidas durante una hora a la misma

temperatura, induciéndose la expresión con ácido indolacrílico (20 µg/mL) dejándolo en estas condiciones durante 24 horas.

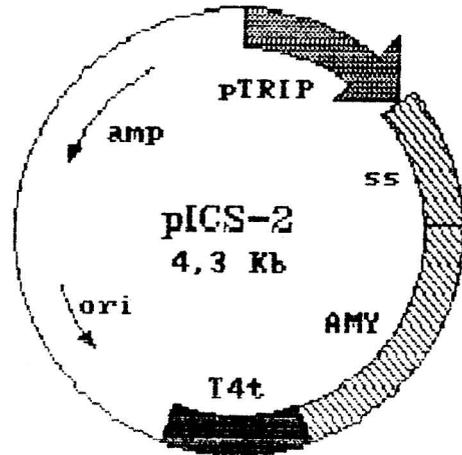


FIG. 1. Plasmidio pICS-2 portando el gen estructural codificante para una alfa amilasa de *B. licheniformis* bajo el control del promotor triptófano y la señal de fin de la transcripción del fago T4.

Actividad enzimática

La actividad de la enzima fue determinada por incubación de 0,1 mL de extracto enzimático con 0,2 mL de almidón soluble al 0,7% (pH 5,6) durante 10 min a 37°C. La reacción se detuvo por enfriamiento en hielo 2 min y después, mezclando 0,1 mL de la reacción con 0,9 mL de HCl 50 mM. Posteriormente se añadió 1 mL de solución de yodo (4% Yoduro de potasio, 0,01% yodo metálico) y 2 mL de H₂O. La densidad óptica de la solución formada fue medida a 620 nm. Todas las soluciones usadas fueron preparadas de acuerdo a como se describe por Novo Industrias (*Analytical Method AF 9/6 GB*).

Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 mg de almidón soluble en 1 min y en las condiciones descritas anteriormente (Young *et al.*, 1987).

Purificación de la enzima alfa amilasa

El volumen total de la fermentación, una vez detenida ésta se centrifugó a 3 000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente (Centrífuga Hitachi SCR-7B, rotor RPR54-8, Japón), el sobrenadante fue

separado y conservado, la biomasa precipitada se resuspendió en 100 mL de H₂O y fue sonicada durante 60 s en un sonicador Labsonic 2000 (B. Braun, Alemania). La biomasa sonicada se centrifugó a 10 000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente (Centrifuga Hitachi SCR-20B rotor 12-2 Japón), el sobrenadante obtenido fue mezclado con el primer sobrenadante de la fermentación, a este volumen se le añadió CaCl₂ hasta una concentración final de 50 mM. Este crudo de proteínas fue introducido en un rotoevaporador a 80°C (modelo RE-46, Yamato, Japón), eliminándose en reiteradas ocasiones la proteína desnaturalizada térmicamente, en forma de un precipitado. El volumen inicial de 3 400 mL se concentró a un volumen final de 120 mL. Esta fracción fue aplicada en una columna de interacción hidrofóbica TSK Butyl-650(S) (7,5 x 75 mm) con un equipo de alta eficacia (HPLC LKB, Suecia) con un gradiente de (0-100)% B en 100 min. con 110 min. de elución isocrática a 0% de B.

Tampón A: 10 mM tris pH 7,4; 1 M sulfato de amonio.

Tampón B: 10 mM tris pH 7,4.

La fracción enzimática obtenida fue desalinada a través de una columna de filtración por gel Sephadex G-25 (Pharmacia, Suecia) y sometida a una

cromatografía líquida de intercambio aniónico en columna DEAE TSK (7,5 x 150 mm) gradiente (0-100)% B en 50 min, con 10 min de elución isocrática a 0% de B.

Tampón A: 10 mM acetato de amonio pH 6,5

Tampón B: 1 000 mM acetato de amonio pH 6,5

El chequeo de pureza de las fracciones enzimáticas se realizó por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) al 12% (Laemmli, 1970). La fracción purificada fue liofilizada y conservada a -20°C para su caracterización posterior. El esquema de purificación seguido aparece representado en la figura 2.

RESULTADOS Y DISCUSION

Con el propósito de aumentar los niveles de expresión de la enzima alfa amilasa con relación a la del hospedero natural para facilitar su purificación posterior, se utiliza el vector de expresión pCIS-2 reportado por Margolles *et al.* en 1992, el cual contiene el gen que codifica para la alfa amilasa aislado

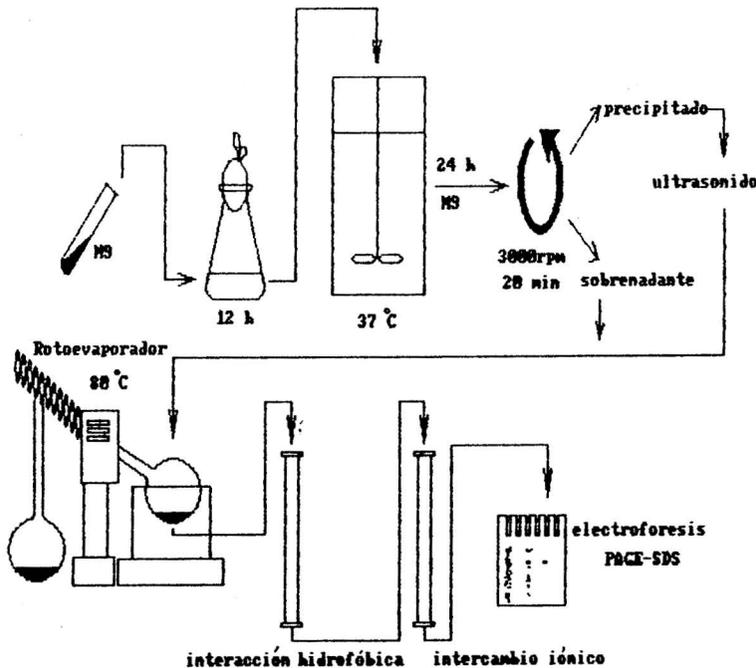


FIG. 2. Esquema de trabajo seguido para la purificación de la enzima alfa amilasa.

a partir de una genoteca de *B. licheniformis*. Este plasmidio se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* HB 101 y lograr elevados niveles de inducción bajo la acción ya descrita del promotor triptófano de bacteria (Hallewell y Emtage, 1980).

En un experimento a nivel de 50 mL se evidenció que en condiciones de inducción con ácido indolacrílico (*Materiales y Métodos*), la enzima alfa amilasa es producida intracelularmente a niveles mayores del 10 % del total de la proteína intracelular soluble, después de 12 horas de cultivo inducido.

Para la obtención del crudo enzimático inicial a partir del hospedero propuesto, se realizó la incubación en el fermentador durante 24 horas con el objetivo de garantizar que el cultivo se encontrara en fase estacionaria y hubiera ocurrido la expresión del gen codificante para la alfa amilasa (teniendo en cuenta que no se tenía el propósito de efectuar un proceso de optimización fermentativa). Posteriormente a la centrifugación inicial del cultivo, se encontró actividad enzimática en el sobrenadante (10 U/mL) probablemente a causa de la ocurrencia de alguna lisis celular así como en la biomasa precipitada y sometida a sonicación (89 U/mL) por lo que se procedió a unir ambas fracciones para evitar pérdidas de enzima.

Teniendo en cuenta el carácter de termoestabilidad reportado en la literatura para alfa amilasas provenientes de la especie *B. licheniformis* y la sensibilidad térmica de *E. coli* a temperaturas superiores a los 50°C, se decidió aplicar una desnaturalización selectiva por calor al crudo inicial de proteínas, a través de un proceso de rotoevaporación, con el doble propósito de eliminar contaminantes

indeseados y de concentrar de manera selectiva la fracción enzimática, lo cual fue efectivo, permitiendo incrementar la proporción de alfa amilasa en la mezcla de proteínas hasta valores de 25% aproximadamente.

La cromatografía de interacción hidrofóbica no retuvo la mayor parte de las proteínas que quedaron solubles del paso anterior y sí retuvo a la alfa amilasa, permitiendo eluir a la enzima posteriormente durante el transcurso del gradiente con más de 85% de pureza, además de posibilitar su concentración si se considera que en estas condiciones se pudo pasar directamente a través de la columna el total del crudo enzimático inicial (figura 3).

La cromatografía de intercambio iónico para las condiciones descritas no retuvo a la alfa amilasa, la cual salió con un alto porcentaje de pureza en el volumen de elución bajo condiciones isocráticas. Los pocos contaminantes que quedaban se eluyeron al aplicarse el gradiente de acetato de amonio (figura 4). La enzima purificada mostró en PAGE-SDS un peso molecular de 60 KDa y presentó una actividad específica de alrededor de 500 U/mg de proteína (figura 5).

Otros autores han abordado la purificación de alfa amilasas de *Bacillus sp.* expresadas en otros hospederos, utilizando pasos iniciales de desnaturalización selectiva por calor (Oriol y Schwacha, 1988). No obstante, la combinación de los tres pasos esenciales de purificación aquí descritos proporcionan un diseño original y un método de trabajo muy atractivo para la obtención de enzimas de este tipo, con un alto grado de pureza, que las haga factibles de empleo en estudios de caracterización bioquímica de mayor complejidad.

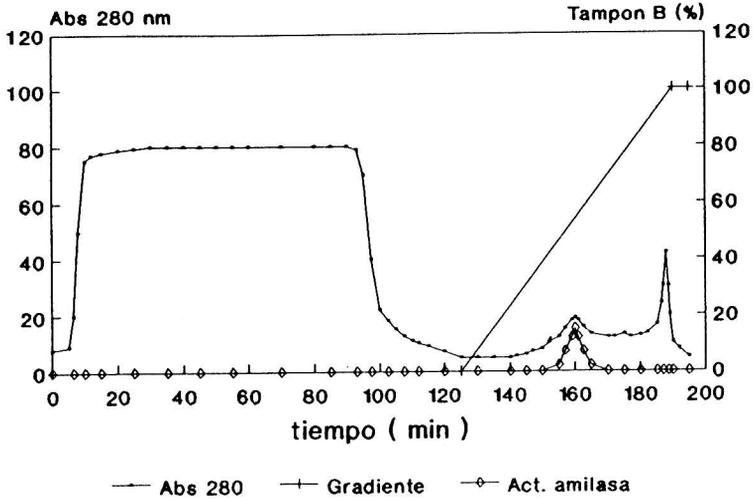


FIG. 3. Cromatografía líquida de interacción hidrofóbica en columna TSK Butyl-650(S). Gradiente (0-100)% B en 100 min con 115 min de isocrático a 0% de B. Aplicación de 120 mL del crudo de proteínas diluido en el tampón A. La alfa amilasa se fija a la columna y gran parte de los contaminantes son eluidos antes de comenzar el gradiente. La fracción enzimática se corresponde con la fracción señalada en el cromatograma.

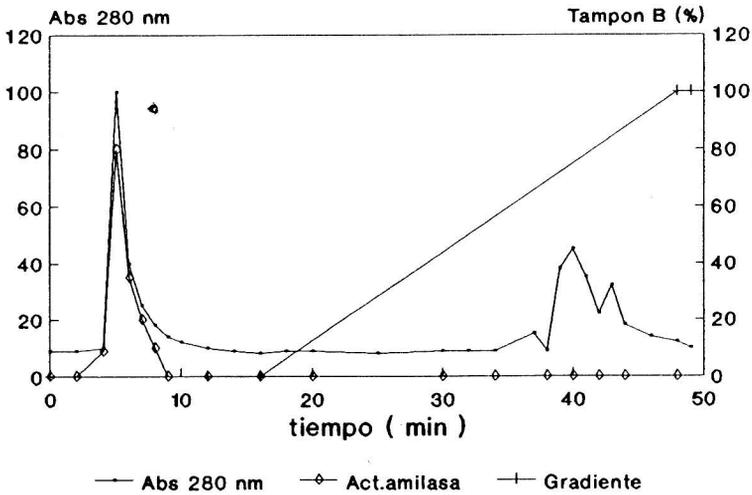


FIG. 4. Cromatografía líquida de intercambio iónico en columna TSK DEAE. Gradiente de (0-100)% B en 50 min. La enzima para estas condiciones no se retiene en la columna y sale al inicio con el buffer A. Los contaminantes restantes son eluidos posteriormente durante el desarrollo del gradiente.

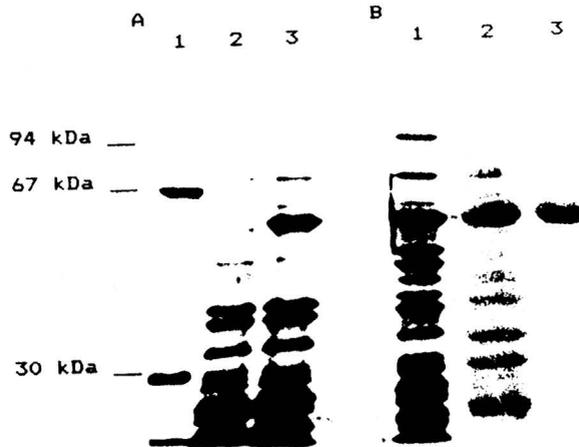


FIG. 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS 12 %. En (A), la línea 1 corresponde al patrón de pesos moleculares: fosforilasa B 94 kDa, albúmina 67 kDa, anhidrasa carbónica 30 kDa; líneas 2 y 3, ruptura celular proveniente de los cultivos no inducido e inducido respectivamente. En (B), línea 1, ruptura celular de la biomasa obtenida en la fermentación; línea 2, crudo enzimático posterior al tratamiento térmico a 80°C; línea 3, alfa amilasa obtenida después de la cromatografía de intercambio iónico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer la colaboración brindada por el Lic. Tanilo Rivero en la confección de este manuscrito.

REFERENCIAS

- FILLOUX, A.; P. JOYET; M. MURGIER y A. LAZDUNSKI (1985). Cloning and expression of a *Bacillus licheniformis* alpha amylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEEMS Microbiol. Letters* 30: 203-207.
- HALLEWELL, R.A. y S. EMTAGE (1980). Plasmid vectors containing the tryptophan operon promoter suitable for efficient regulated expression of foreign genes. *Gene*, 9: 27-47.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* Vol. 227: 680- 685.
- MANIATIS, T.; E.F. FRITSCH y J. SAMBROCK (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- MARGOLLES, E.; E. PAIFER y J. DELGADO (1992). Alto nivel de secreción de una alfa amilasa bacteriana en la levadura *Pichia pastoris*. *Biotechnología Aplicada*. Vol. 9(1).
- ORIEL, P. y A. SCHWACHA (1988). Growth on starch and extracellular production of thermostable amylase by *E. coli*. *Enzyme Microbiol. Technol.* Vol. 10: 42-46
- PATCHETT, M.L.; T.L. NEAL; L.R. SCHOFIELD; R.C. STRANGE; R.M. DANIEL y H.W. MORGAN (1989). Heat treatment purification of thermostable cellulase and hemicellulase enzymes expressed in *E. coli*. *Enzyme Microb. Technol.* Vol. 11: 113-115.
- YOUNG, J.Y.; J. HONG y R.T. HATCH (1987). Comparison of alpha amylase activities from different assay methods. *Biotechnol. Bioengineering* Vol. XXX: 147-151.