

PRODUCCION, PURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE UNA GLUCOAMILASA DE *Aspergillus niger*.

Yolanda Rico*

Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Keywords: Glucoamylase, *Aspergillus niger*, Enzyme technology.

RESUMEN

La enzima glucoamilasa se produjo por fermentación de una cepa de *Aspergillus niger* suministrada por el "Osaka Technical Research Institute". La mezcla de amilasas se separó del caldo de fermentación por precipitación con sulfato de amonio (55-75% saturación). De dicha mezcla se separó la fracción con mayor actividad amilolítica empleando Sephadex DEAE-A 50 y Sephadex G-100. La pureza de la fracción se verificó por electroforesis de disco y por ultracentrifugación. La enzima purificada presentó las siguientes características: P.M. entre 76.000 - 82.000, PI 3,54, $K_m = 0.125\%$ (sustrato almidón), pH óptimo 4, T óptima 60°C, conserva el 90% de actividad después de calentar 15 minutos a 50°C, retiene el 100% de actividad en el intervalo de pH 3-6, hidroliza completamente el almidón produciendo el anómero beta de la glucosa y no requiere para su actividad Ca^{++} ni Mg^{++} .

ABSTRACT

Glucoamylase was produced by fermentation with a strain of *Aspergillus niger* provided by the Osaka Technical Research Institute. The amylase mixture was separated from the fermentation broth by precipitation with ammonium sulphate (55-75% saturation). A fraction with high amylolytic activity was purified from the mixture by chromatography on Sephadex DEAE-A 50 and G-100. Purity of the fraction was verified by disc electrophoresis and ultracentrifugation. The enzyme showed a molecular weight c.a 76.000 - 82.000, a pI 3,54, $K_m = 0,125\%$ (starch as substrate), optimum pH 4, optimum temperature 60°C. The enzyme kept 90% of the initial activity at 50°C (at pH 4,5 for 15 min.) and retained 100% of the activity within the range of pH 3-6 (at 30°C for 16 hr). The glucoamylase obtained fully hydrolysed starch producing the glucose beta anomer and did not require Ca^{++} or Mg^{++} for its activity.

INTRODUCCION

Las amilasas son las enzimas que hidrolizan el almidón y se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se pueden dividir en tres grupos: Las α -amilasas

que rompen los enlaces glicosídicos α -1,4 en el interior del sustrato; las β -amilasas que hidrolizan unidades de maltosa desde el extremo no reductor y las glucoamilasas, también exoamilasas, que remueven en forma consecutiva unidades de glucosa desde el extremo no reductor de los polímeros del almidón. Su acción difiere claramente estas enzimas de las α y β amilasas porque el producto final de la reacción es la β -D- glucosa. Las glucoamilasas son de origen microbiano, producidas por varias especies de *Aspergillus* y *Rhizopus* y tienen alta demanda en la industria de alimentos. Poseen un bajo grado de especificidad puesto que exhiben habilidad para romper enlaces α -1,3; α -1,6 y α -1,4. La hidrólisis de estos enlaces ocurre a diferentes velocidades dependiendo del tamaño molecular y la estructura del sustrato. Las glucoamilasas, excepto algunas de *Aspergillus awamori*, son inactivas en almidón crudo, por lo general presentan óptima actividad en el intervalo de pH de 4-5 y de temperatura de 50-60°C (1).

MATERIALES Y METODOS

Producción de la Enzima: En este estudio se empleó una cepa de *Aspergillus niger* suministrada por el "Osaka Technical Research Institute". La enzima se produjo por fermentación del microorganismo en un medio compuesto por dextrina al 1%, peptona al 1% y mezcla de salvado de trigo y arroz al 1% a 27°C y pH 5,5, durante 2 días en un reactor de 20 litros.

Purificación Enzimática: El caldo de fermentación se centrifugó a 1000 rpm, a temperatura de 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante se trató con sulfato de amonio y se recolectaron las proteínas con actividad amilolítica que precipitaron en el intervalo de 55 a 75% de saturación. La mezcla de proteínas se disolvió en agua y se aplicó a una columna de Sephadex G-25 previamente equilibrada con buffer de acetato 0,1M (pH 5,6) para remover el sulfato de amonio. La mezcla de amilasas libre de sal se purificó por intercambio iónico, aplicándola a una columna de Sephadex DEAE-A 50 (2,8 x 30 cm) equilibrada previamente con buffer de acetato 0,05 M pH 5,6. Para la elución se empleó un gradiente lineal de concentración de NaCl (0-0,6 M) y un flujo de 35,3 mL/hr. El eluido se recolectó en fracciones de 10 mL y se determinó el contenido de proteína y la actividad amilolítica de cada una de ellas. Se conformaron tres fracciones F1, F2 y F3. La fracción F1 se concentró empleando polietilenglicol y posteriormente se aplicó a una columna de Sephadex G-100 (2,8 x 146 cm) previamente equilibrada con buffer de acetato 0,02 M (pH 6) con NaCl 0,1M; se eluyó con el mismo buffer a un flujo de 21,3 mL/hr y se recogieron fracciones de 10 ml. El perfil de elución de F1 mostró tres picos de actividad definidos. Mediante control electrofórico se conformaron las fracciones G1, G2 y G3. Se seleccionó G2 para el estudio posterior de las propiedades de la enzima. La actividad amilásica se determinó empleando almidón como sustrato. La mezcla de reacción contenía 5 mL de almidón al 0,6% en buffer de acetato 0,05 M (pH 4,5) y 1 mL de enzima diluida con acetato de calcio 0,01 M. Dicha mezcla se incubó a 40°C durante 10 minutos. La actividad se midió por la producción de glucosa empleando el método de Shaffer Somogyi (2). Una unidad se definió como la cantidad de enzima que libera un micromol de glucosa por minuto bajo las condiciones del ensayo, y la actividad específica como las unidades de enzima por miligramo de proteína.

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry et al. (3) con albúmina de suero bovino como patrón. En el eluido de las cromatografías la concentración de proteína se midió por la absorbancia de las fracciones a 280 nm.

Homogeneidad de la Enzima. Se determinó por los métodos de sedimentación por ultracentrifugación empleando una ultracentrífuga analítica Hitachi 282 a 25°C y 60.000 rpm y por electroforesis de disco (4) sobre gel de poliacrilamida al 7,5% con un sistema buffer Tris-HCl pH 9,4, aplicando una corriente de 3 mA por columna (0,5 x 6 cm) durante 3 horas a temperatura ambiente.

Punto isoeléctrico: Se determinó por el método descrito por Vesterberg y Svensson (5). La enzima se aplicó a una columna de anfolitos transportadores (110 mL) con un rango de pH de 2,5 a 5,0. Se pasó una corriente de 600 V a 4°C por 40 horas.

Peso Molecular: El peso molecular de la enzima purificada se determinó por cromatografía de filtración por gel, por cromatografía de alta eficiencia (HPLC), por electroforesis con SDS y por el método del equilibrio de sedimentación. La filtración por gel se realizó de acuerdo con el método descrito por Andrews (6), la muestra de enzima se aplicó a una columna de Sephadex G-100 (1,2 x 100 cm) previamente equilibrada con un buffer de fosfato 1/15 M (pH 7) con KCl 0,1 M y se eluyó con el mismo buffer a un flujo de 6,5 mL/hr. La cromatografía de alta eficiencia se realizó en un equipo Waters M-6000 A, con detector UV a 280 nm, columna G 300 SW x 2 (60 cm x 7,5 mm), empleando para eluir buffer de fosfato 0,066 M pH 7 con KCl 0,1M a un flujo de 1 mL/min, aplicando una presión de 70kg/cm². La electroforesis con SDS se realizó por el método descrito por Weber y Osborn (7). Las muestras se aplicaron a columnas (0,5 x 7 cm) de gel de poliacrilamida al 5% con SDS, se pasó una corriente constante de 8 mA por columna durante 2 horas a 50°C. Como proteínas de referencia se emplaron inhibidor de tripsina (PM 21500), albúmina de huevo (PM 43000), albúmina de suero bovino (PM 68000) y RNA Polimerasa (PM L 39600; β 15500; β' 16500). El método de equilibrio de sedimentación se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito por Van Holde y Baldwin (8), empleando una Ultracentrífuga Analítica Hitachi 282 a 25°C y 9000 rpm.

Composición de Aminoácidos: La muestra de enzima se hidrolizó con HCl 6 N a 110°C por 24 horas en tubos sellados al vacío. El análisis de aminoácidos en el hidrolizado se realizó por el método descrito por Moore y Stein (9) con un Analizador de Aminoácidos Shimadzu LC-3A. El triptófano se determinó espectrofotométricamente empleando un equipo UV de doble haz (10).

Actividad Glucoamilásica: Se estudió la forma de acción de la enzima purificada sobre almidón evaluando la producción de azúcares reductores y la coloración azul del complejo almidón-yodo formado por la absorbancia a 660 nm. Los azúcares liberados en la hidrólisis del almidón se identificaron por cromatografía en papel empleando como solvente: n-butanol, piridina, agua (6:4:3) y nitrato de plata como agente revelador y por HPLC empleando una columna Poligosisil^(R) .10 NH₂, eluyendo con acetonitrilo-agua (75:25) a un flujo de 2 mL/min. Se

comparó el grado de hidrólisis producido por la enzima al actuar sobre amilasa y amilopeptina y se determinó el tipo de anómero formado midiendo la rotación óptica de la mezcla inmediatamente después de la hidrólisis y una vez alcanzado el equilibrio, el cual se aceleró adicionando carbonato de sodio.

RESULTADOS Y DISCUSION

Purificación: La Figura 1 muestra el patrón de elución de la mezcla de amilasas de la columna de Sephadex DEAE -A 50, la actividad amilolítica emergió en tres fracciones F1, F2 y F3 siendo F1 la que contenía mayor actividad y mayor contenido proteico. En la Figura 2 se observa el patrón de elución de F1 de la columna de Sephadex G-100, el cual muestra que en el pico G-2 se concentra la mayor actividad amilolítica. La homogeneidad de la enzima contenida en G-2 se comprobó por electroforesis de disco sobre gel de poliacrilamida y por el método de sedimentación por ultracentrifugación. La Figura 3 muestra los resultados de la ultracentrifugación.

Figura 1 **Cromatografía de la Mezcla de Amilasas sobre Sephadex DEAE-A50**

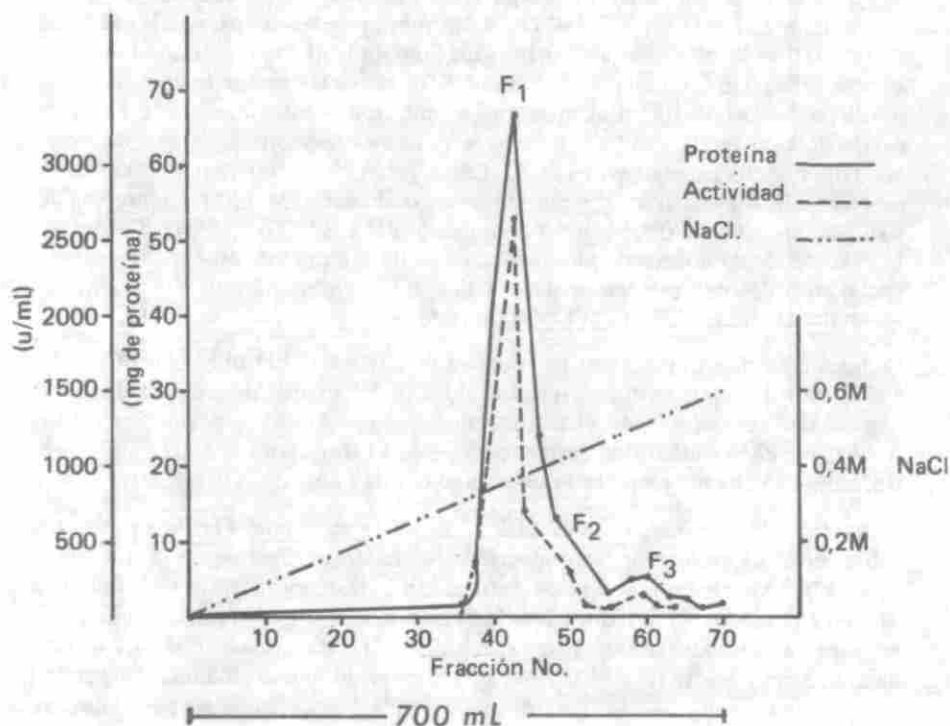


Figura 2 Cromatografía sobre Sephadex G-100 DE F1

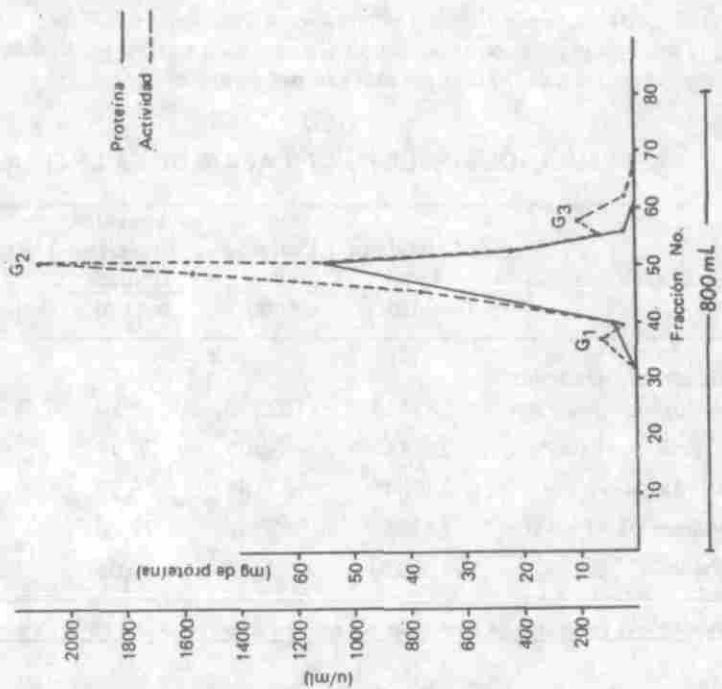
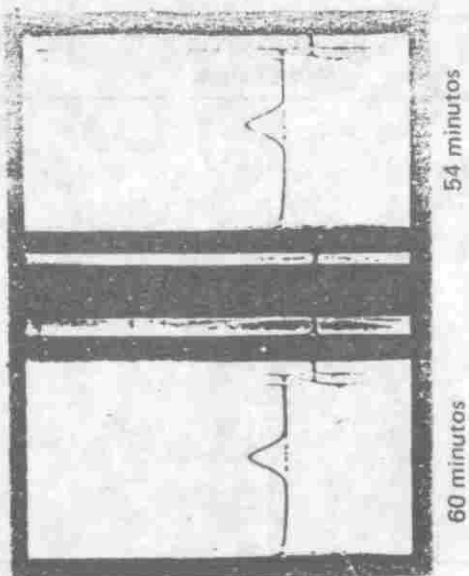


Figura 3, Ultracentrifugación Analítica de la Glucoamilasa Purificada.



Sedimentación por Ultracentrifugación, 60.000 rpm, 25°C.

Los resultados de la purificación enzimática se resumen en la Tabla 1. En el proceso, la enzima se purificó alrededor de 20 veces. La enzima purificada tiene una actividad específica de 30,05 unidades por mg de proteína.

Tabla 1
RESULTADOS DE LA PURIFICACION DE LA ENZIMA

Etapas	Actividad Total (Unidades)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica Unidades mg.prot.	Recuperación (%)
Caldo de fermentación centrifugado	281613	182530	1,54	100,0
Mezcla de Amilasas*	207867	9905	20,98	73,8
Desalinización	189641	7185	26,39	67,3
Sephadex DEAE -A50	144353	5346	27,00	51,3
Sephadex G-100	126050	4194	30,05	44,8

* Fracción que precipita con Sulfato de Amonio en el intervalo 55 - 75% de saturación.

Tabla 2
COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA ENZIMA

AMINOACIDO	RESIDUOS POR ^b MOLECULA	PORCENTAJES
Asp	56,4	11,7
Thr	51,0	10,6
Ser	62,7	13,0
Glu	34,3	7,1
Gly	38,4	7,9
Ala	56,8	11,8
Val	29,6	6,1
Ile	19,4	4,0
Leu	50,4	10,4
Tyr	22,6	4,7
Phe	17,1	3,5
His	4,1	0,8
Lys	9,2	1,9
Arg	14,4	3,0
Trp ^a	17,0	3,5

a - Determinado espectrofotométricamente.

b - Los cálculos se realizaron para un PM de la enzima de 76.000.

Propiedades de la Enzima: El punto isoeléctrico para la enzima de 3,54 como se calcula a partir de la Figura 4. El peso molecular de la enzima hallada por filtración por gel fue 76000, por HPLC 82000, por el método de equilibrio de sedimentación 81527 y la electroforesis con SDS mostró una sola banda que correspondió a un peso molecular de 80000. Estos resultados prueban que la enzima consta de una sola unidad con un peso molecular entre 76000 y 82000. La composición de aminoácidos de la enzima se muestra en la Tabla 2. Se encontró que la enzima tiene un contenido relativamente bajo en histidina. La constante de Michaelis para la enzima purificada, empleando almidón como sustrato, fue 0,125%. Los efectos del pH y de la temperatura sobre la actividad de la enzima se muestran en las Figuras 5a y 6a respectivamente. La actividad fue máxima a pH 4 y a una temperatura de 60°C. Los efectos del pH y de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima se observan en las Figuras 5b y 6b respectivamente,

Figura 4 Enfoque Isoeléctrico de la Glucoamilasa.

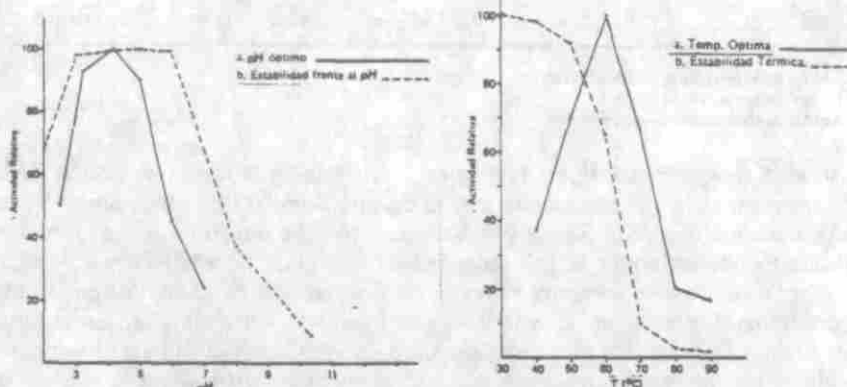
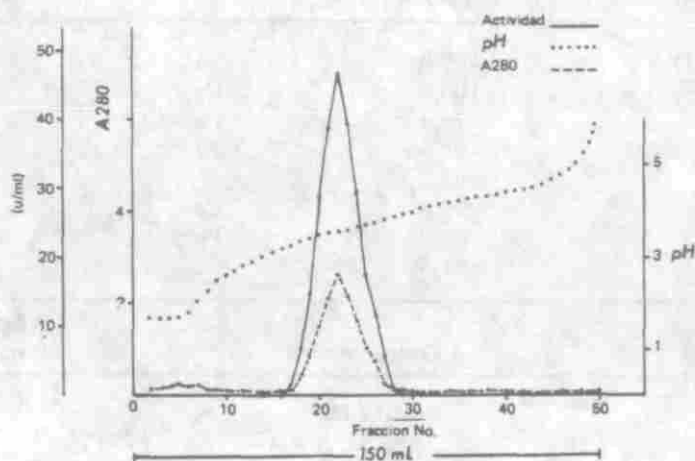


Figura 5. Efecto del pH sobre la Actividad y Estabilidad de la Glucoamilasa.

Figura 6. Efecto de la Temperatura sobre la Actividad y Estabilidad de la Glucoamilasa.

La enzima fue estable en el rango de pH 3 a 6 cuando se mantuvo a 30°C durante 16 horas y por debajo de 50°C cuando se sometió al tratamiento térmico durante 15 minutos a pH 4,5. La adición de varios iones inorgánicos, inclusive de metales pesados como mercurio y hierro y de sustancias químicas como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido p-cloromercuriobenzoico (P-CMB) y ácido monoyodoacético (MIA) (Tabla 3) no alteró en forma considerable la actividad de la enzima, esto permite concluir que la enzima es bastante estable, no requiere calcio ni magnesio para su actividad y no posee grupos-SH en el sitio activo.

Tabla 3
EFECTO DE IONES INORGANICOS Y DE SUSTANCIAS QUIMICAS
EN LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA

ION (1 mM)	Actividad Relativa (%)	ION (1 mM)	Actividad Relativa (%)
CONTROL	100,0	Sn	91,2
Na	100,0	Hg	77,0
K	98,9	Cu	82,2
Ca	94,4	Pb	87,7
Mg	93,7	Sr	81,2
Ba	95,8	Co	82,9
Ni	92,0	Fe	69,7
Zn	91,6		

Sustancia	Concentración	Actividad Relativa (%)
EDTA ^a	0,1 M	75,80
MIA ^b	0,01 M	77,42
p-CMB ^c	0,01 M	79,03

a - Acido etilendiaminotetraacético

b - Acido monoyodoacético

c - Acido p-cloromercuriobenzoico

Actividad Glucoamilásica: En la Figura 7 se compara la forma de acción de la enzima purificada (glucoamilasa) con la de una β -amilasa patrón Sigma^(R) y la de una α -amilasa patrón Sigma^(R), sobre almidón. Se observa que la enzima purificada exhibe un poder sacarificante mayor que el de las enzimas α y β -amilasas. En la Figura 8 se compara el poder de licuefacción de la enzima purificada (glucoamilasa), con el de la α -amilasa y la β -amilasa sobre almidón. Se observa que cuando la α -amilasa ha producido un bajo grado de hidrólisis ya ha desaparecido el complejo azul, mientras que con la enzima purificada, solo cuando se llega a un 70% de hidrólisis desaparece la formación del complejo azul. La β -amilasa solo alcanza una disminución del complejo azul en un 42%. En la Figura

9 se observa la acción de la enzima purificada sobre amilosa y amilopectina. Al comienzo la acción es más rápida sobre la amilopectina, pero a las 4 horas el grado de hidrólisis de la amilasa y la amilopectina es muy semejante. Este comportamiento se asemeja al de la β -amilasa que ataca las moléculas desde los extremos no reductores, debido a que la amilopectina por ser ramificada posee mayor cantidad de dichos extremos. Los estudios por cromatografía en papel y

Figura 7 Poder Sacarificante de la Glucoamilasa, α -amilasa y β -amilasa.

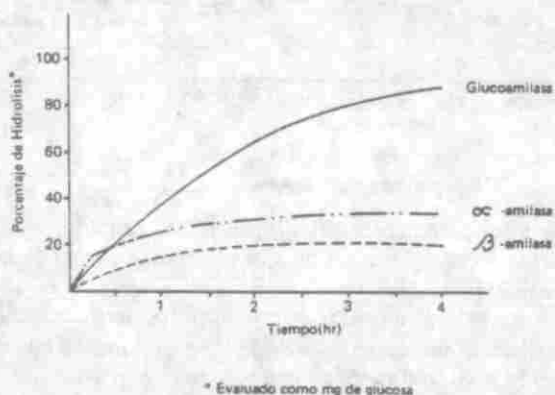


Figura 8 Poder de Licuefacción de la Glucoamilasa, α -amilasa y β -amilasa

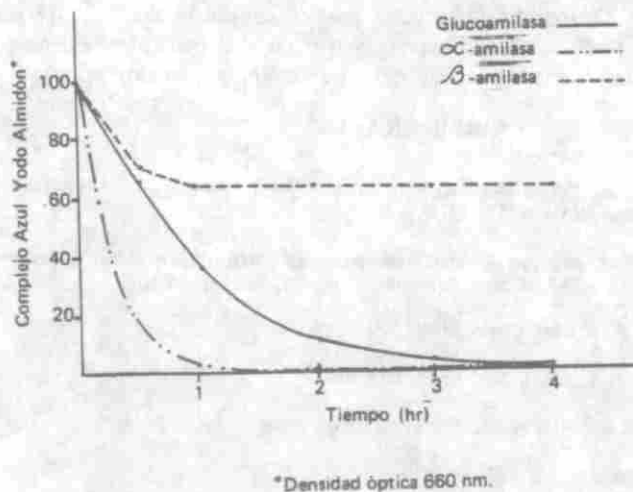
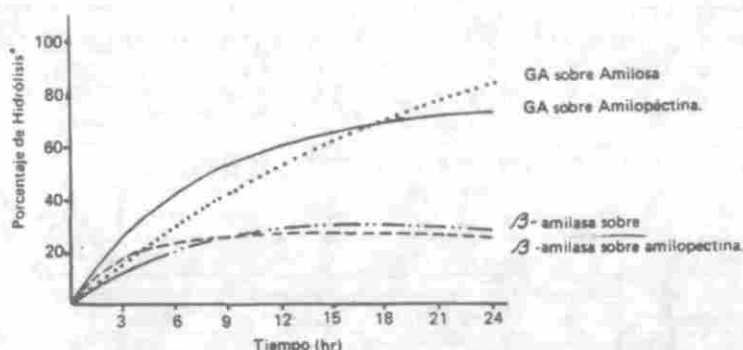


Figura 9 Acción de la Glucoamilasa (GA) y la β -amilasa sobre Amilosa y Amilopectina.



*Evaluado como mg de Glucosa.

por HPLC realizados a los productos de hidrólisis del almidón, generados por acción de la enzima purificada, demuestran que el producto final de la hidrólisis es glucosa. El hidrolizado producido por la enzima purificada posee una rotación óptica inicial de $\alpha = +82,79^\circ$, al alcanzar el equilibrio de mutarrotaión la rotación aumenta hasta alcanzar un valor $\alpha = +84,99^\circ$ lo que indica que durante la mutarrotaión se produce el anómero alfa, de donde se infiere que durante la hidrólisis con la enzima se genera el anómero beta de la glucosa. Todos los resultados obtenidos permiten concluir que la enzima purificada es una glucoamilasa.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis agradecimientos a la Universidad Nacional de Colombia y a JICA (Japan International Cooperation Agency) por el apoyo financiero, al Osaka Technical Research Institute por el apoyo científico y al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia por su amable colaboración.

BIBLIOGRAFIA

1. GREENWOOD, et al., "Amylases" en "Enzymes in Food Processing", Editor Reed G., Academic Press, New York, p. 62, 1975.
2. "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists". Editor Sidney Williams, 14 edición, Arlington, Virginia, 1984, p. 581.
3. O.H. LOWRY, et al., J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.
4. B.J. DAVIS, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 121, 404.
5. O. VESTERBERG and H. SVENSSON, Acta Chem. Scand., 1966, 20, 820.
6. P. ANDREWS, Biochem. J., 1965, 96, 595.

7. K. WEBER, and M. OSBORN, *J. Biol. Chem.*, 1969. 244, 4406.
8. K.E. van HOLDE, and R.L. BALDWIN, *J. Phys. Chem.*, 1958. 62, 734.
9. S. MOORE, and W.H. STEIN, *Meth. Enzymol.*, 1963. 6, 819.
10. T.W. GOODWIN, and R.A. MORTON, *Biochem. J.* 1946. 40, 628.