

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA ENZIMA XILANASA A PARTIR DEL PREPARADO COMERCIAL NOVOBAN 240

Dalila Paz-Lago y Marta Hernández

ABSTRACT. Novoban 240 is a commercial enzymatic preparation from Novo Industri A/S with amylase activity which is obtained by submerged fermentation of *Bacillus amilolichuefaciens* and is used in wine industry. Moreover, it possesses endoxylanase activity, a closely related enzyme with the hypersensitive response of plant tissues upon pathogenic attack. A methodology for the partial purification of this enzyme using ion exchange chromatography on DEAE cellulose and SP Sephadex C-25 is established. The discrete enhance of reducing power during the enzymatic hydrolysis is an indicator confirming the presence of an endoxylanase in Novoban 240, which might be used to obtain xyloligosaccharides with inducing activity of plant defense. The molecular weight estimated for this enzyme by polyacrylamide gel electrophoresis is below 14 kDa.

Key words: hidrolasas, β xilanases, pathogenesis, enzymes, purification

RESUMEN. Novoban 240 es un preparado enzimático comercial de la Novo Industri con actividad amilasa, que se obtiene por fermentación sumergida de *Bacillus amilolichuefaciens* y es utilizado en la industria de elaboración de vinos. Este preparado de uso industrial posee actividad xilanasa, enzima estrechamente relacionada con la respuesta hipersensible de los tejidos vegetales frente al ataque de microorganismos patógenos. En el presente trabajo se establece una metodología de purificación parcial de esta enzima a través del empleo de las cromatografías de intercambio iónico sobre DEAE celulosa y SP Sephadex C-25. El incremento discreto del poder reductor en el medio de reacción durante la hidrólisis enzimática, es un indicador que confirma la presencia de una endoxilanasa en Novoban 240, la que podría ser utilizada para la obtención de xilo-oligosacáridos con actividad inductora de defensa en plantas. El peso molecular estimado de la enzima por electroforesis en gel de poliacrilamida está por debajo de los 14 kDa.

Palabras clave: hidrolasas, β xilanasas, patogénesis, enzimas, purificación

INTRODUCCIÓN

El xilano es el principal carbohidrato encontrado en la fracción hemicelulósica de los tejidos vegetales y constituye la tercera parte de todo el carbón orgánico renovable sobre la tierra.

La xilanasa (E.C.3.2.1.8; β 1,4 xilano xilano hidrolasa), componente mayoritario de un complejo sistema enzimático, actúa en la naturaleza depolimerizando las moléculas de xilano en unidades de pentosas monoméricas, que son usadas por bacterias y hongos como fuente principal de carbono (1).

Las xilanasas unidas a las glicósido-hidrolasas (responsables de la ruptura enzimática de la celulosa de la planta) cointeractúan en la acumulación ilimitada de biomasa vegetal, son un elemento fundamental de interés biotecnológico (2) y juegan en su conjunto un papel central durante la hidrólisis de la pared celular de la planta (3).

El desarrollo de nuevas técnicas analíticas y la disponibilidad comercial de nuevos sustratos no solo han llevado a la purificación y caracterización de un amplio número de enzimas xilanasas sino que, además, las metodologías más actuales han resultado en la selección de las enzimas xilanolíticas más adecuadas para su aplicación industrial (4). Para estudiar los efectos de estas enzimas en la pared de las plantas y evaluar su posible papel en la patogénesis, son necesarias preparaciones de enzima pura, las que constituyen una potente herramienta para la elucidación de la estructura de la pared del vegetal (5).

Novoban 240 es un preparado enzimático comercial producido por la Novo Industri A/S, que se utiliza en la industria de elaboración de vinos para eliminar los residuos contaminantes que afectan su filtrabilidad y clarificación. Se persigue como objetivo en el presente trabajo establecer una metodología rápida de purificación parcial de endoxilanasas a partir de este preparado, la cual puede ser empleada para la obtención de xilo-oligosacáridos con actividad inductora de mecanismos de defensa en las plantas.

Dalila Paz-Lago, Investigador Agregado del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1; Marta Hernández, Profesor Auxiliar del Departamento de Química, Facultad de Agronomía, Universidad Agraria de La Habana (UNAH), Apartado Postal 18-19, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

MATERIALES Y METODOS

Los geles, las resinas y los sustratos utilizados son calidad reactivo suministrados por los siguientes proveedores: Dietilaminoetil celulosa (SIGMA), SP-Sephadex C-25 (PHARMACIA); sustratos: xilano de madera de abedul (SIGMA), laminarina de laminaria digitata (SIGMA); patrones: D-xilano, (SIGMA), D-glucosa (SIGMA), albúmina de suero bovino fracción V (BDH). Se empleó además membrana Spectra/Por mwco: 5000. El resto de los reactivos utilizados son sales de alta pureza para la preparación de las soluciones tampón y otros.

Preparación del extracto. Un volumen equivalente a 100 mL de Novoban 240 se dializó contra cinco cambios de 3 L de solución tampón de Na_2PO_4 10 mM pH 6.0, durante 24 horas. El dializado se centrifugó 20 minutos a 10 000 g para precipitar el material insoluble y se determinó la actividad de las enzimas xilanasa y β 1,3 glucanasa al sobrenadante, así como la concentración de proteínas.

Procedimientos analíticos

Determinación colorimétrica de actividad enzimática

Actividad xilanasa. 0.1 mL de solución de enzima fue adicionado a una mezcla de reacción que contenía 0.2 mL de solución tampón Na_2PO_4 200 mM pH 6.0 y 0.2 mL de xilano 0.5 %. La mezcla se incubó a 37°C durante 10 minutos (6). La actividad xilanasa se expresó como μmol de xilosa producido durante una hora por mililitro de enzima.

Actividad β 1,3 glucanasa. Laminarina reducida disuelta en solución tampón de NaCOOH_3 100 mM pH 5.2, se adicionó a 0.1 mL de solución de enzima. La mezcla se incubó a 40°C, durante 30 minutos (7). Se calculó la cantidad de carbohidratos reductores (8) y la actividad β 1,3 glucanasa se expresó como μmol de glucosa producido durante una hora por mililitro de enzima.

Para ambas determinaciones se realizaron curvas usando xilosa y glucosa como patrones respectivamente.

Proteínas. El contenido proteico se determinó por el método de MicroLowry (9), usando albúmina de suero bovino como estándar.

Procedimiento de purificación

Cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa. Las cromatografías se realizaron en una columna de vidrio C Pharmacia Fine Chemicals (26 x 300) mm, utilizando DEAE celulosa como soporte cromatográfico y equilibrada con solución tampón de Na_2PO_4 10 mM pH 6.0. Se aplicaron 3 mL del preparado comercial previamente dializado y se colectaron fracciones de 4 mL a una velocidad de flujo de 20 $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$. La columna fue eluida con el mismo tampón y se conectó en la fracción 50 un gradiente lineal de fuerza iónica de (0.1-2.0) M de NaCl en el tampón Na_2PO_4 .

Cromatografía de intercambio iónico en SP-Sephadex C-50. La fracción I proveniente de la cromatografía en DEAE-celulosa (3 mL de X-I) se aplicó en una columna de vidrio

C Pharmacia Fine Chemicals (30 x 600) mm, con fase estacionaria SP-Sephadex C-25 pre-equilibrada con tampón Na_2PO_4 10 mM pH 6.0. La columna se eluyó con el mismo tampón y se aplicó en la fracción 15 un gradiente lineal de fuerza iónica de (0.1-1.0) M de NaCl en la solución tampón. Se colectaron fracciones de 2 mL a una velocidad de flujo de 10 $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$.

Concentración y diálisis de las fracciones. Las diferentes fracciones cromatográficas seleccionadas en los perfiles se unieron y concentraron utilizando polietilenglicol 8 000 y se dializaron 24 horas contra el tampón correspondiente o agua destilada según el procedimiento posterior a realizar.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y β mercaptoetanol. se realizaron las electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y β mercaptoetanol (10). Se prepararon geles al 12.5 % y se aplicaron 20 μg de las muestras. La corrida electroforética tuvo una duración de una hora y se utilizó un amperaje constante de 30 mA. Se aplicaron como proteínas patrones un Kit Pharmacia de pesos moleculares de 14-94 kD.

Hidrólisis de D-xilano con xilanasa parcialmente purificada. 0.1 g de D-xilano de madera de abedul, disuelto en 10 mL de tampón Na_2PO_4 10 mM pH 6.0, se incubaron a 37°C con 1 mL de solución de enzima X-I₁ (fracciones 53-56), en presencia de algunas gotas de tolueno para retardar el crecimiento bacteriano. Al cabo de las 24, 48 y 72 horas, se detuvo la reacción por calentamiento a 100°C de las muestras durante 15 minutos. Se centrifugó a 5 000 g para eliminar posible remanente de sustrato y se conservó el sobrenadante en refrigeración para su posterior uso.

Estudio de la dinámica de hidrólisis. Se realizó determinando la concentración de carbohidratos totales por el método de Fenol-Sulfúrico (11), azúcares reductores (8) y pentosas utilizando HCl-orcinol (12).

Para la determinación de carbohidratos totales y pentosas, se realizaron curvas de calibración empleando xilosa como patrón.

Eficiencia de la hidrólisis enzimática. La eficiencia (% de hidrólisis) de la enzima X-I₁ sobre el sustrato se midió incubando 0.1 g de xilano a diferentes concentraciones de enzima. El medio de reacción contenía buffer Na_2PO_4 10 mM pH 6.0, para un volumen final de 10 mL. La mezcla se incubó durante 72 horas y la reacción se detuvo por calentamiento durante 15 minutos a 100°C. Posteriormente se centrifugó a 5 000 g para eliminar el material remanente. Se evaluó la aparición de carbohidratos reductores (8).

El porcentaje de hidrólisis se calculó según la expresión siguiente:

$$\% \text{ de hidrólisis} = \text{Rm}/\text{T}-\text{Rs}$$

Rm = μg de carbohidratos reductores producidos por la acción de la enzima en el medio de reacción.

T = μg de carbohidratos totales del sustrato.

Rs = μg de carbohidratos reductores del sustrato.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla I muestra las actividades enzimáticas de interés presentes en Novoban 240.

Tabla I: Actividades enzimáticas presentes en el preparado industrial Novoban 240

Proteína total (mg)	Actividad xilanasa ($\mu\text{mol xilosa}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Actividad β 1,3 glucanasa ($\mu\text{mol glucosa}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$)
2.54	80.4	1.81

La Figura 1 muestra el perfil resultante de la cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-celulosa del extracto de Novoban 240 dializado. Una fracción proteica con actividad xilanasa y β 1,3 glucanasa eluye con la solución tampón Na_2PO_4 10 mM pH 6.0, comportamiento que señala la ausencia de interacción de estas enzimas con la fase estacionaria. El resto de las proteínas presentes revelan su carácter ácido, al quedar retenidas en el soporte las que solo eluyen una vez conectado el gradiente lineal de fuerza iónica (0.1-2) M de NaCl, a molaridades entre 0.15-0.3 M. Estas proteínas no se logran separar totalmente y constituyen la mayor parte de la proteína aplicada en la columna, correspondiente a la actividad α -amilasa (datos no mostrados).

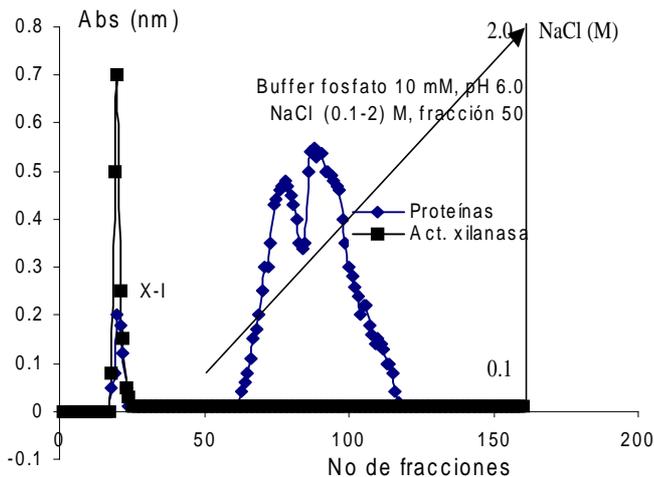


Figura 1. Cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE celulosa del Novoban 240

El perfil resultante de la aplicación de X-I sobre SP-Sephadex C-25 se muestra en la Figura 2. Luego de conectado el gradiente de fuerza iónica (0.1-1) M NaCl, en la fracción 15 eluye primeramente una fracción proteica con actividad β 1,3 glucanasa. Posteriormente, a molaridades superiores eluye una fracción mayoritaria en la que las proteínas no se logran separar, pero sí sus actividades enzimáticas (actividad xilanasa). Este resultado pudiera ser representativo de la presencia de isoformas de esta enzima, las que solo se lograron separar en electroforesis de poliácridamida.

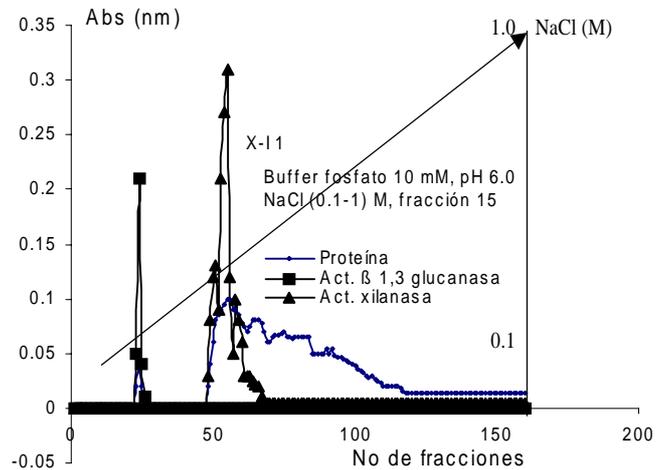


Figura 2. Cromatografía de intercambio iónico sobre SP Sephadex C-25 de la fracción X-I de DEAE celulosa

La Figura 3 representa el patrón electroforético de las diferentes muestras aplicadas en gel de poliácridamida al 12.5 %. Se aprecia la diversidad de proteínas presentes en Novoban 240, lo que se corresponde con un preparado de uso industrial. Se aplicaron las fracciones X-I de DEAE celulosa y X-I 1 (fracciones de la 53-56) de SP Sephadex C-25. La xilanasa purificada posee una masa molecular por debajo de los 14 kDa y se obtiene con un buen grado de pureza.

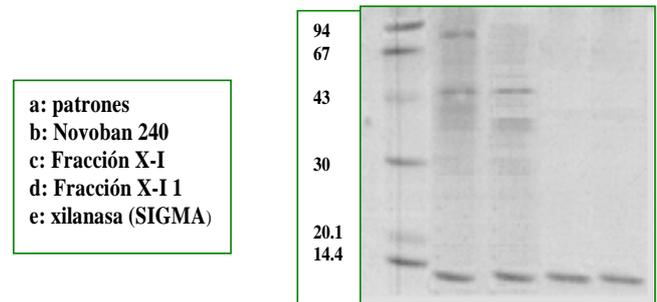


Figura 3. Electroforesis en gel de poliácridamida con SDS y β mercaptoetanol

Los resultados que hasta el momento se poseen en cuanto a la purificación de la enzima xilanasa a partir del preparado comercial de amilasas, se resumen en la Tabla II. Aún cuando los rendimientos en proteínas son bajos, el valor de actividad específica que manifiesta la proteína es considerable.

La dinámica de liberación de azúcares solubles durante la digestión enzimática de la fracción X-I se midió a las 24, 48 y 72 horas (Figura 4). Se observa que la enzima es capaz de provocar la hidrólisis del xilano, lo que se manifiesta por un incremento del poder reductor (Abs_{520} nm) en el medio de reacción. Dicho incremento en el medio es indicativo de que el preparado tiene actividad xilanasa.

Tabla II. Resumen del proceso de purificación de una xilanasa a partir de Novoban 240

Pasos	Proteína (mg)	Actividad enzimática ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Actividad específica ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Rendimiento (%)	Recobrado de actividad (%)	Purificación (veces)
Diálisis	2.54	80.4	31.6	100	100	1
DEAE celulosa	0.27	55.5	205.6	10.6	69	6.5
SP Sephadex C-25	0.012	5.84	486.7	0.47	7.26	15.4

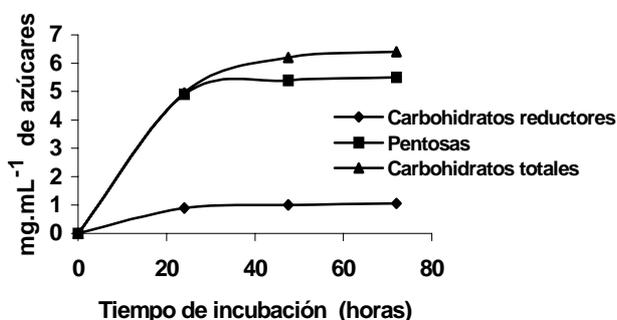


Figura 4. Dinámica de la hidrólisis enzimática

A medida que transcurre el tiempo de hidrólisis enzimática, se observa un aumento en la concentración de carbohidratos totales, efecto en parte provocado por la aparición en el medio de azúcares reductores, aunque estos últimos en concentraciones más bajas. El incremento discreto del poder reductor en el medio de reacción, sin que se produzcan cambios bruscos durante el curso de la hidrólisis, pudiera tomarse como indicativo de que el preparado enzimático posee actividad endoxilanasas y que al medio de reacción se están liberando xilo-oligosacáridos. El contenido de pentosas es alto y representa aproximadamente la concentración de carbohidratos totales, lo cual es señal de la pureza del sustrato utilizado.

La eficiencia del proceso de hidrólisis de X-I con el xilano se representa en la Figura 5. Se aprecia la dependencia directamente proporcional entre el por ciento de hidrólisis y la concentración de proteína empleada.

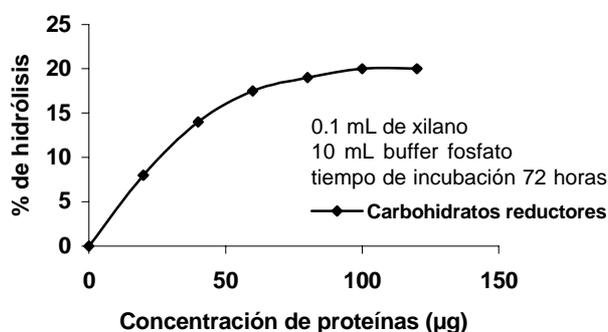


Figura 5. Eficiencia de la hidrólisis enzimática

Las investigaciones destacan que pocas xilanasas de origen bacteriano han sido caracterizadas y algunos informes muestran al género *Bacillus* como un sistema apropiado para la producción de estas enzimas. El preparado comercial Novoban 240 de Novo Nordisk A/S es un producto fundamentalmente de enzima α -amilasa. No obstante, a la baja proporción de xilanasa en relación con la proteína fundamental, este producto comercial puede ser usado como fuente para la purificación de esta enzima, si observamos el valor representativo de actividad específica obtenido durante el proceso de purificación. Teniendo en cuenta que la investigación más actualizada presupone la manipulación artificial del sistema de defensa natural de los vegetales mediante los elicitores, como una alternativa ecológica de lucha contra las enfermedades, contar con una fuente barata y rápida para la purificación de una endoxilanasas, es disponer a su vez de xilo-oligosacáridos para ser usados como inductores de mecanismos de defensas en muchas especies vegetales.

REFERENCIAS

1. Prade, R. A. Xylanase biology to biotechnology. *Biotechnology Genetic Engineering Rev.* 1996, vol. 13, p. 101-131.
2. Suizenbacher, G., et al. The *Streptomyces lividans* family 12 endoglucanase: construction of the catalytic cre expression and X-ray structure at 1.75 Å resolution. *Biochemistry*, 1997, vol. 36, no. 1, p. 16032-16039.
3. Fontes, C. M., et al. Identification of tandemly repeated type VI cellulose-binding domains in an endoglucanase from the aerobic soil bacterium *Cellvibrio mixtus*. *Appl: Microbiology. Biotechnology*, 1998, vol. 49, no. 5, p. 552-559.
4. Sunna, A. y Antranikian, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnology*, 1997, vol. 17, no. 1, p. 39-67.
5. Mozzetti, C., et al. Variation in enzyme activities in leaves and cell suspensions as markers of incompatibility in different *Phytophthora-peper* interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1995, vol. 46, p. 95-107.
6. Hernández, M. Oligosacáridos de pared celular de caña con actividad necrosante en plantas. [Tesis de Maestría en Química Agrícola]. Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias de La Habana, 1996.
7. Paz-Lago, D. y Gutiérrez, A. Resultados preliminares de purificación de la enzima β 1,3 glucanasa a partir del preparado comercial Glucanex. *Cultivos Tropicales*, 1995, vol. 16, no. 3, p. 36-39.

8. Nelson, N. J. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J.Biol.Chem.*, 1944, vol. 153, p. 375-380.
9. Sun, S. MicroLowry in methods in Plant Molecular Biology and Agricultural Biotechnology. Asian Vegetable Research and Development Center Council of Agriculture, 1994, p. 9-11.
10. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 1970, vol. 227, p. 680-685.
11. Dubois, N., *et al.* Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *And. Chem.*, 1956, vol. 28, p. 350-356.
12. Chaplin, M. F. y Kennedy, J. K. Carbohydrate analyses a practical approach. Oxford : IRL PRESS. 1987, vol. 3, no. 4, p. 10-12.

Recibido: 16 de septiembre de 1999

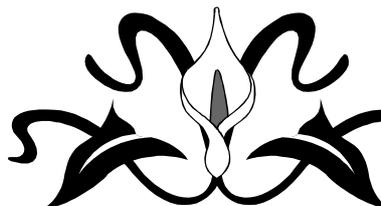
Aceptado: 22 de octubre de 1999

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

M A E S T R Í A

"M e j o r a m i e n t o G e n é t i c o d e l a s p l a n t a s"

Duración: 2 años
Fecha de comienzo: septiembre
Precio: 5 000 USD
Coordinador: Dra.C. Marta Alvarez



Para más información dirijase a:

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba CP 32700
Telf: (53)(64) 6-3867, 6-3773
Fax: (53)(64) 6-3867
e-mail: posgrado@inca.edu.cu