

OBTENCION Y PURIFICACION DE BETA-AMILASA DE IPOMEA BATATA

**ANIBAL MARTIRENA, HAINE MIRABELLA, JOSE OLHABERRY,
ALICIA GARDIOL y FRANCISCO BATISTA***

RESUMEN.-

Se estudiaron las distintas condiciones de extracción de beta-amilasa de Ipomea batata.

El extracto fue purificado en dos etapas sucesivas: por intercambio iónico en DEAE Sephadex A-50 y por gel filtración en Sephadex G-200.

En la etapa de intercambio iónico se determinaron las condiciones óptimas de pH, fuerza iónica y cantidad de intercambiador para retener el máximo de impurezas.

Previo a la gel filtración la enzima, parcialmente purificada, fue concentrada por ultrafiltración con membrana Amicon PM 10.

La purificación obtenida en las distintas etapas fue controlada por electroforesis en gel de poli-acrilamida y por determinación del aumento de actividad específica.

Por este método se obtuvo una preparación de beta-amilasa altamente purificada como lo demuestra la homogeneidad en la electroforesis en gel de poli-acrilamida y la alta actividad específica alcanzada.

SUMMARY.-

The extraction of beta-Amilase from Ipomea batata was performed under different experimental conditions.

The extract was purified following a two step procedure: ionic exchange with DEAE Sephadex A-50 and gel filtration with Sephadex G-200.

Ionic force, pH, and amount of ion exchanger were optimized in order to retain the maximum amount of impurities on DEAE Sephadex A-50.

The partially purified enzyme was concentrated by ultrafiltration with an Amicon PM 10 membrane prior to gel filtration.

The purity was controlled at different stages by means of polyacrilamide gel electrophoresis and determination of the specific activity increment.

High purity beta-Amilase was obtained with this procedure, as shown by the above mentioned purity criteria.

* Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química, Montevideo, Uruguay.

INTRODUCCION.-

La beta-amilasa (1,4 alfa D-Glucanmaltohidrolasa o enzima 3.2.1.2.) es una exoenzima que libera sucesivamente unidades maltosa, desde el extremo no reductor, de una cadena de polisacárido por hidrólisis de enlaces glicosídicos alfa 1,4. Dado que no es capaz de hidrolizar los enlaces de ramificación alfa 1,6 presentes en polisacáridos como amilopectina o glicógeno, los productos finales de su acción son dextrinas límites.

Los vegetales son la fuente principal de obtención de esta enzima. Se encuentra en semillas como cebada, soya y en tubérculos como el boniato (*Ipomea batata*).

Muchos métodos han sido publicados para el aislamiento y la purificación de la enzima. *Bernfeld*⁽¹⁾, presentó un método el cual consiste en extracción, calentamiento a 60°C, precipitación con subacetato de plomo, fraccionamiento con sulfato de amonio, diálisis y sucesivas recristalizaciones. Este método largo y tedioso suele dar preparaciones impuras. *Gertler y Yehudith*⁽²⁾ a su vez publicaron un método para preparar beta-amilasa a partir de semilla de soya, introduciendo el uso de intercambiadores iónicos, además de fraccionamiento con sulfato de amonio y absorción inespecífica sobre hidroxil apatita. Este procedimiento comprendía siete etapas en total.

En el presente trabajo, se combinaron los principios de intercambio iónico y gel filtración, obteniendo un método más sencillo, en tres etapas y de mejor rendimiento y pureza.

MATERIALES Y METODOS.-

Reactivos.

Acido 2,4 dinitrosalicílico y almidón soluble se obtuvieron del laboratorio C. Erba (Milán, Italia) y DEAE Sephadex A-50 y Sephadex G-200 de Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suecia).

Los demás productos fueron de grado reactivo.

Determinación de la actividad beta-amilásica.

Fue realizada según el método de *Bernfeld*⁽¹⁾ incubándose a 20°C, 1,0 ml de almidón al 1% en buffer de actividad (acetato 0,016 M, pH 4,8) con 1,0 ml de la enzima convenientemente

diluida, por un período de tres minutos. La acción enzimática fue detenida por el agregado de 2,0 ml de DNS; se calentó por cinco minutos en un baño a 100°C y se diluyó por el agregado de 15 ml de agua, midiéndose la absorbancia a 540 nm.

Se hizo curva de calibración usando solución de maltosa patrón.

Por definición, como unidades de beta-amilasa (U.E.) se tomaron los miligramos de maltosa liberados en tres minutos en las condiciones de experiencia.

Determinación de proteínas.

Se determinaron espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 280 nm con celdas de cuarzo de 1 cm en espectrofotómetro Beckman modelo 25.

Una solución proteica con una lectura a 280 nm de 1,00 se definió que poseía una concentración de 1 UA/ml.

Actividad específica A.E.

Fue definida como el cociente entre unidades de beta-amilasa y concentración de proteínas (U.E./U.A.).

Ultrafiltración.

Para concentrar proteínas se usó un ultrafiltro Amicon de 50 ml, con una membrana PM 10, utilizando nitrógeno como gas impulsor.

Electroforesis sobre geles de poliacrilamida

Se realizó según el método de *Orstein y Davis* modificado⁽³⁾, aplicando 3 mA por tubo y usando azul de bromo fenol como indicador de corrida.

Cromatografía en columna.

Se utilizaron columnas de plexiglas con placa filtrante; el flujo fue regulado con una bomba peristáltica P-3 (Pharmacia); recogiendo fracciones de 3 ml con un recolector SMI 12050.

Detección de actividad enzimática sobre geles de poliacrilamida.

Para cada etapa de purificación se corrieron dos geles en paralelo, uno de los cuales fue revelado específicamente. A este gel se lo cortó en discos de 2 mm de largo, los cuales fueron disgregados mecánicamente en el citado buffer de actividad, deter-

minándose la actividad del extracto resultante. Se correlacionó la actividad encontrada con la posición de las bandas en el gel correspondiente revelado con amido black.

PARTE EXPERIMENTAL

Extracción de la enzima.

Se estudiaron distintas condiciones de extracción de la enzima de las estructuras celulares.

Cada experimento se llevó a cabo con 400 g de boniatos lavados y pelados, molidos en un Waring Blendor por dos minutos y medio con 240 ml de líquido extractante. Se estudiaron los siguientes extractantes: agua destilada, solución al 0,4% v/v de Triton X-100, solución de mercaptoetanol 100 mM, solución al 0,4% v/v de Triton X-100 y 100 mM en mercaptoetanol. Se centrifugó a 5000 rpm por 20 minutos en centrífuga Sorvall en cámara refrigerada, determinándose proteínas y actividad enzimática en los sobrenadantes.

La tabla 1 resume los resultados alcanzados.

Adsorción en DEAE Sephadex A-50.

Se hizo un estudio previo de fraccionamiento del extracto en DEAE Sephadex A-50 en columna de 1,5 x 40 cm. Haciendo una adsorción a pH 6,0 con buffer citrato fosfato y eluyendo la enzima por aumento de fuerza iónica mediante gradiente de cloruro de sodio de 0 a 1,0 M se separó la beta-amilasa de la mayoría de las impurezas proteicas y de los pigmentos.

Se logró una buena recuperación de la enzima con la consiguiente purificación.

Con la finalidad de procesar un mayor volumen de extracto en menor tiempo se buscaron las condiciones de adsorción negativa en las cuales se retenían la máxima cantidad de impurezas y la cantidad mínima de enzima.

Las condiciones estudiadas fueron: pH, fuerza iónica y cantidad de intercambiador.

Los pH estudiados fueron: 4,8; 5,2 y 5,8.

Para cada experimento se utilizó 1 g de DEAE Sephadex A-50 previamente hinchado y suspendido en 25 ml de buffer aceta-

to 0,1 M, 0,2 M en NaCl, del pH correspondiente. Se agregó a cada uno, 25 ml del extracto que equivalen al 20% de la capacidad total del gel calculada a partir del dato de capacidad respecto a hemoglobina agitados mecánicamente durante toda la noche.

Se midió absorbancia a 280 nm y actividad amilásica en los sobrenadantes.

La tabla 2 resume los resultados obtenidos.

Se estudiaron tres fuerzas iónicas diferentes logradas por el agregado de NaCl al buffer acetato pH 5,8; 0,1 M, de forma que quedó 0,2, 0,4 y 1,0 M en NaCl. Para cada experimento se utilizó 1 g de intercambiador previamente hinchado y suspendido en 25 ml de buffer de fuerza iónica correspondiente y 25 ml de extracto crudo, agitándose mecánicamente durante toda la noche.

Se determinó absorbancia a 280 nm y actividad beta-amilásica en los sobrenadantes.

Los resultados se resumen en la tabla 3.

Se determinó la cantidad de gel necesario para retener el máximo de impurezas en las condiciones de adsorción negativa. Los experimentos se llevaron a cabo con 61; 30,5; 15,25 y 7,6 gramos de intercambiador equilibrado con buffer acetato 0,1 M pH 5,8; 0,2 M en NaCl y escurridos en placa filtrante. A cada uno se agregó 25 ml de extracto diluido al medio con buffer acetato 0,1 M pH 5,8 y 0,4 M en NaCl, agitándose mecánicamente durante tres horas. Se determinó la absorbancia a 280 nm y la actividad beta-amilásica de los sobrenadantes.

La tabla 4 resume los resultados obtenidos.

Purificación por salting out con sulfato de amonio.

Se intentó una mayor purificación del sobrenadante de la adsorción negativa haciendo un fraccionamiento con sulfato de amonio.

El sobrenadante fue llevado a 20, 40, 55 y 70% de saturación.

No se logró purificar por este método.

Gel filtración en Sephadex G-200.

Previo a la cromatografía por gel filtración, el sobrenadante de la adsorción negativa fue concentrado por ultrafiltración. Para

la gel filtración se utilizó una columna de plexiglas de 3,2 x 35 cm, equipada con placa filtrante, con gel previamente equilibrado con buffer acetato 0,1 M, pH 4,8. La muestra aplicada fue de 3,2 ml y las fracciones recogidas de 3 ml. Se reguló el flujo de la columna a 9 ml/hora utilizándose con tal fin una bomba peristáltica. Se determinó absorbancia a 280 nm y actividad beta-amilásica de cada fracción.

Los resultados se muestran en la figura 1.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se realizó la electroforesis de acuerdo al método de *Orstein y Davis* modificado⁽³⁾, del extracto crudo en agua destilada, del sobrenadante de la adsorción negativa en DEAE Sephadex A-50 y de los eluidos activos de la columna de Sephadex G-200, (fracciones 14, 15 y 16), previamente concentrados por ultrafiltración.

Los resultados se muestran en la figura 2.

DISCUSION.-

Se estudiaron las condiciones de extracción de la enzima de las estructuras celulares. Los extractantes utilizados fueron: agua destilada, Triton X-100, mercaptoetanol y una mezcla de éstos.

Se incluyó en las condiciones de extracción el Triton X-100 porque ha sido reportado⁽⁵⁾ su efecto restaurador de la actividad de la enzima desnaturalizada.

No se observó variación en la actividad (tabla 1) al usarse Triton X-100, concluyéndose que no se presentan los fenómenos de desnaturalización prevenidos por su uso.

Ha sido reportado que el mercaptoetanol posee el efecto de pasar la enzima de la forma zimógeno a la activa⁽⁶⁾. Al no observarse variación en la actividad (tabla 1) se concluye que la enzima es extraída en su forma activa. De acuerdo con los resultados de la tabla 1 el mejor extractante de los estudiados es el agua destilada.

Se buscó purificar la enzima del extracto crudo por intercambio iónico. Se trabajó en un principio con una columna de DEAE Sephadex A-50 encontrándose las mejores condiciones de pH y fuerza iónica para la purificación. Con la finalidad de aumentar la

cantidad de extracto procesado y disminuir la duración del proceso, se utilizaron los resultados obtenidos para lograr una separación en batch por adsorción negativa. No se observa variación en el comportamiento electroforético de los eluidos de la columna y de la adsorción negativa.

Los pH estudiados para el intercambio fueron 4,8 (punto isoeléctrico de la enzima), 5,2 y 5,8. En esta etapa se logró la retención de impurezas proteicas y pigmentos difíciles de separar de otra manera.

De acuerdo con los resultados resumidos en las tablas 2, 3 y 4, las mejores condiciones de intercambio para la purificación de beta-amilasa son: 1 g de DEAE Sephadex A-50 seco y buffer acetato pH 5,8, 0,1 M y 0,2 M en NaCl (concentración final).

= 30.5g de gel escumido

Las proteínas no adsorbidas por el DEAE Sephadex A-50 eran similares en su comportamiento frente al salting out efectuado por sulfato de amonio.

No se encontró aumento de la actividad específica ni variación en el comportamiento electroforético del extracto concentrado por ultrafiltración, por lo cual se concluye, la ausencia de proteínas y polipéptidos con un peso molecular inferior a 1000, no resultando útil como etapa de purificación.

Visto que las propiedades eléctricas de la enzima y sus impurezas eran similares, se buscó su separación recurriendo a posibles diferencias en sus pesos moleculares. Esto se logró por gel filtración en Sephadex G-200 (fig. 1).

La tabla 5 resume los resultados de la purificación de beta-amilasa en tres etapas en las condiciones óptimas determinadas en los estudios previos ya descriptos.

La preparación obtenida presentaba una actividad específica, de 168 UE/UA, pero si se aplica el coeficiente de extinción reportado para beta-amilasa pura ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 17,7$) resulta una actividad específica de 298 UE/mg de proteína.

En la figura 2 se muestra el comportamiento electroforético de: extracto crudo, sobrenadante de adsorción negativa en DEAE Sephadex A-50 y eluidos activos de Sephadex G-200, demostrando que la preparación final es electroforéticamente pura.

No fue optimizado. Simplemente sumó un an.
 Se usó 40g gel hidratado de en Ac 0,1M pH 5,8, 0,2 M en NaCl.
 para DEAE-celulosa
 el 80 ml de extracto en

Utilizando el revelado específico se demostró que la banda de menor movilidad electroforética corresponde a la fracción beta-amilasa.

TABLA 1

Condiciones de extracción de beta-amilasa				
Extractante	VOLUMEN	PRO- TEINAS	ACTIVI- DAD	A.E.
	ml	UA/ml	UE/ml	UE/UA
Agua destilada	270	40,5	186,3	4,6
Triton X-100	340	37,4	138,4	3,7
Mercaptoetanol	285	32,7	91,6	2,8
Triton con mercaptoetanol	230	24,3	109,4	4,5

Los resultados indicados corresponden a la extracción de 400g de boniatos con 240 ml del extractante correspondiente: agua destilada, triton X-100 al 0,4 % vlv, mercaptoetanol 100 nM y tritón X-100 al 0,4% vlv con mercaptoetanol 100 mM.

TABLA 2

Influencia del pH en la adsorción negativa de beta-amilasa				
pH	VOLUMEN	PROTEINAS	UE	A.E.
	ml	UA/ml	totales	UE/UA
4,8	50	4,6	250	1,09
5,2	49	9,4	612,5	1,33
5,8	52	4,9	650	2,55

Se incubaron 25 ml de extracto crudo con 1 g de DEAE-Sephadex A-50 previamente hinchado y suspendido en 25 ml de buffer acetato 0,1 M, 0,2 M en NaCl del pH indicado.

TABLA 3

Influencia de la fuerza iónica en la adsorción negativa de beta-amilasa				
MOLARIDAD FINAL EN NaCl	VOLUMEN ml	PROTEINAS UA/ml	UE totales	A.E. UE/UA
0,1	52	4,9	650	2,55
0,2	53	5,6	3684	12,41
0,5	52	9,0	3328	7,11

Se incubaron 25 ml de extracto crudo con 1 g de DEAE-Sephadex A-50, previamente hinchado, suspendido en 25 ml de buffer acetato 0,1 M, pH 5,8, cuya concentración en NaCl era: 0,2; 0,4 y 1,0 M respectivamente.

TABLA 4

Influencia de la cantidad de intercambiador en la adsorción negativa de beta-amilasa			
PESO DE GEL SECO (g)	PESO DE GEL ESCURRIDO (g)	PROTEINAS UA/ml	A.E. UE/UA
2,0	61,0	2,36	10,6
1,0	30,5	3,91	10,5
0,5	15,25	6,47	7,7
0,25	7,26	8,46	6,4

Se equilibraron los pesos de DEAE Sephadex A-50 que se indican con buffer acetato 0,1 M, pH 5,8, 0,2 M en NaCl y se escurrieron en placa filtrante.

A cada uno se le agregó 25 ml de extracto crudo diluido al medio con buffer acetato 0,1 M, pH 5,8 0,4 M en NaCl. Se agitó mecánicamente por tres horas.

TABLA 5

Purificación de beta-amilasa							
ETAPA	VOL ml.	UE/ml	UEx10 ⁻³ totales	PRO- TEINAS UA/ml	A.E. UE/UA	R (a)	P (b)
Extracto crudo	250	460	115	24,2	19,0	-	-
DEAE Sephadex A-50	420	133	55,9	5,1	26,0	48	1,4
Sephadex G-200 (c)	(1390)	13,3	(18)	0,079	168,0	16	8,9

Se homogeneizaron 400 g de boniatos lavados y pelados con 240 ml de agua destilada durante 2 minutos. Se centrifugó durante 20 minutos a 5000 rpm a 4 °C. El sobrenadante fue mezclado con igual volumen de buffer acetato 0,1 M, pH 5,8, 0,4 M en NaCl, se agregó 305 g de DEAE Sephadex A-50 hinchado y equilibrado en el buffer citado anteriormente pero 0,2 M en NaCl. Se agitó mecánicamente durante toda la noche. El sobrenadante resultante fue concentrado al doble por ultrafiltración en equipo Amicon con membrana PM10. Se aplicaron 3 ml del sobrenadante concentrado a una columna de Sephadex G-200 (3,2 X 35 cm) con una velocidad de 9 ml/hora regociéndose fracciones de 3 ml.

- (a) R simboliza el rendimiento expresado en porcentaje.
 (b) P simboliza la purificación obtenida en cada etapa respecto al extracto crudo.
 (c) Los datos que aparecen entre paréntesis en esta fila corresponden al procesamiento completo del sobrenadante del DEAE Sephadex A-50 realizado en fracciones de 3 ml.

PURIFICACION DEL SOBRENADANTE DE LA ADSORCION NEGATIVA POR GEL FILTRACION EN SEPHADEX G-200

Se aplicó una muestra de 3,2 ml de sobrenadante previamente concentrado al doble, en una columna de Sephadex G-200 (3,2 X 35 cm) equilibrado con buffer acetato 0,1 M, pH 4,8. Se recogieron fracciones de 3 ml con un flujo de 9 ml/hora. La línea llena corresponde a proteínas y la línea punteada indica actividad beta-amilásica expresada como miligramos de maltosa liberados en 3 minutos por ml de eluido.

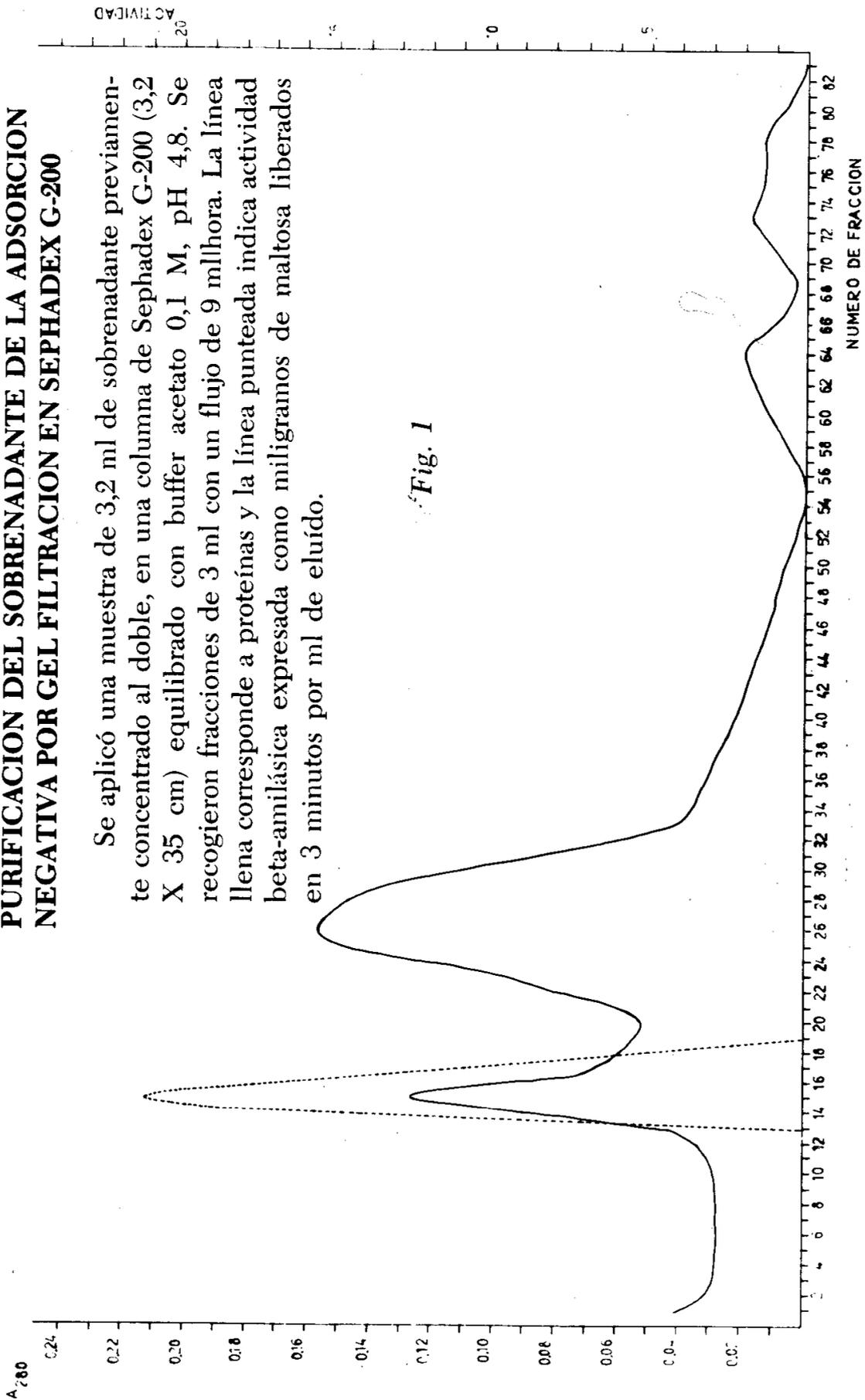


Fig. 1

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

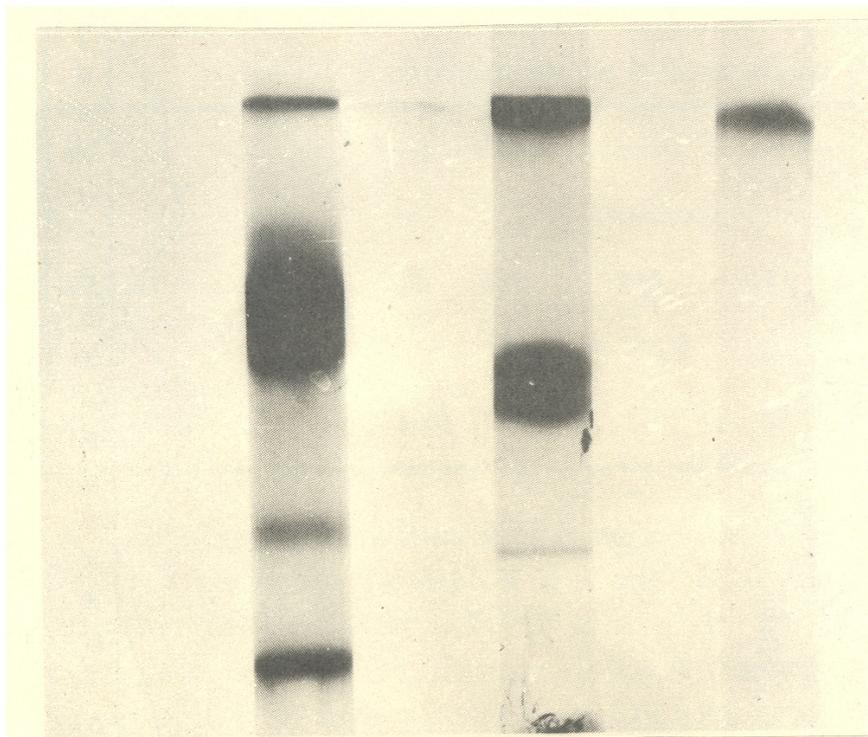


Fig. 2

La figura muestra, de izquierda a derecha, los resultados obtenidos con las siguientes muestras: extracto crudo en agua destilada, sobrenadante de la adsorción negativa en DEAE Sephadex A-50 y el eluido activo de la columna de Sephadex G-200 concentrado. Se efectuó la electroforesis en buffer Tris-glicina pH 8,3, aplicándose a cada gel 3 mA. Se utilizó como revelador proteico amidoblack en solución saturada en metanol-acético-agua 50:50:10.

(Foto obtenida por el Bach. O. Montañez del Laboratorio Fotográfico de la Facultad de Química).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- *Bernfeld, P.* (1955). *Methods in Enzymology*; Vol. 1. *Collowick, S.P. & Kaplan, N.O.* (editores). New York. Academic Press.
- 2.- *Gertler, A.; Yehudith, B.* (1965). *Biochem J.*, 95: 621-627.
- 3.- *Orstein, L. & Davis, B.J.* (1964). *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 121: 321-450.
- 4.- *Spradlin, J. & Thoma, J.* (1970). *J. Biol. Chem.* 245: 117-127.
- 5.- *Takeda, Y. & Hizukuri, S.* (1972). *Biochim. Biophys. Acta*, 268: 175-183.