

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE POLIGALACTURONASAS DE *Aspergillus kawachii* IFO 4308

J.C. Contreras-Esquivel^{1,2*} y C.E. Voget¹

¹CINDEFI. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115 (1900). La Plata, Argentina. ²Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila, México.

*Fax 01 844 4390511/e-mail:coyotefoods@hotmail.com

Palabras clave: fibra de vidrio, caracterización, protopectinasa

Introducción. *A. kawachii* produce en forma parcialmente constitutiva poligalacturonasas (PGasas) activas a pH 2.0 y 4.7 con capacidad de solubilizar pectina altamente polimerizada de cáscara de limón. En estudios previos se demostró que la actividad solubilizadora de pectina es llevada a cabo por una endo-PGasa (1).

El objetivo del presente trabajo fue purificar y caracterizar parcialmente a las PGasas de *A. kawachii* producidas parcialmente constitutivas en el medio glucosa/triptona.

Metodología. Se utilizó una cepa de *A. kawachii* IFO 4308 la cual fue cultivada en presencia de glucosa (10 g/l), triptona (5 g/l) y sales. Los cultivos fueron incubados hasta consumo total de glucosa (30-35 h). La separación del micelio de la fase líquida fue llevada a cabo a través de tela muselina y centrifugación. El medio de cultivo fue ajustado a pH 3.0 y se filtro tres veces a través de filtro de fibra de vidrio (FFV). Se filtraron 300 ml de medio de cultivo fermentado por cada FFV. El filtrado fue concentrado a por evaporación a presión reducida, luego el concentrado fue reconcentrado por precipitación con acetona. Luego el material fue purificado por cromatografía de intercambio aniónico (CIA) y permeación por gel. La enzima obtenida bajo esta metodología fue denominada PGasa ácida (PGI). La actividad PG adsorbida a los FFV fue eluída a pH 5.0 y concentrado 30 veces. El material posteriormente fue purificado por cromatografía de intercambio catiónico (CIC). Las PGasas purificadas fueron analizadas en cuanto a su pureza y características físico-químicas.

Resultados y discusión. La PGasa ácida fue separada eficazmente de otras PGasas por medio de la filtración por fibra de vidrio. El permeado de medio de cultivo fue concentrado por evaporación a pH 3.0 ó 6.0, encontrándose una inactivación de la actividad PGasa a pH 6.0. El rendimiento por concentración con acetona fue del 80-90%. Se obtuvieron 460 µg de proteína (PGI) purificada de 3300 ml de cultivo lo que representa menos del 0.1% de la proteína originalmente presente en el medio. El rendimiento final en términos de actividad enzimática fue de 40%. LA PGI fue altamente tolerable a procesos de congelación y liofilización. Las PGasas adsorbidas a FFV constituyó el primer paso de purificación, y se realizó tomando en cuenta los resultados previamente descritos, es decir se filtraron 300 ml de permeado/filtro. El factor de purificación de la actividad PGasa luego del proceso de filtración fue de aproximadamente 100 veces, siendo en este sentido la operación comparable con otros procesos de purificación de

alta resolución. Las proteínas eluídas fueron purificadas por CIC y por tamiz molecular. La CIC permitió separar dos fracciones con actividad PGasa, una mayoritaria (>95% de la actividad total, PGII) y una minoritaria (PGIII). El análisis por SDS-PAGE del eluido de FFV y la CIC mostró que las PGasas son prácticamente las únicas proteínas presentes luego del proceso de filtración (adsorción/elución). Los pesos moleculares de la PGI, PGII y PGIII estimados por SDS-PAGE fueron de 60 ? 1.15, 41.1 ? 1.08, 43.6 ? 1.07 kDa, respectivamente. El peso molecular también fue estimado por cromatografía en permeación por gel. El punto isoeléctrico (pI) de la PGI fue de 3.5-3.6, mientras que el pI de la PGII fue de 5.33 (Figura 1). La PGI y PGII fueron adsorbidas a concavalina-A-Sepharose lo cual sugiere que ambas enzimas son glicoproteínas. La secuencia N-terminal de la PGI fue la siguiente: ST-C-T-F-T-D-A-A-T-A-S-E-S-K. El pH de óptimo para PGI sobre protopectina de limón y pectina de limón fue de 2.0 y 2.5, respectivamente. El pH óptimo para hidrólisis de ácido poligalacturónico se desplazó hacia la región menos ácida (pH 4.5). El perfil de pH/actividad para PGII sobre ácido poligalacturónico y protopectina fueron muy similares, presentando un valor máximo a pH 4.6-4.7. La PGIII presentó un pH óptimo sobre ácido poligalacturónico de pH 6.0. Ninguna enzima presentó actividad frente a carboxi-metilcelulosa, ramnoglacturonano, arabinogalactano, xilano, etc. Las tres enzimas presentaron un mecanismo de acción tipo endo.

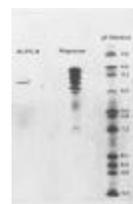


Fig. 1. Isoelectroenfoque de la PGII (izquierda) y una PGasa de *A. niger* (Centro) y patrones de p (derecha)

Conclusiones. *A. kawachii* produce tres PGasas parcialmente constitutivas en medio glucosa triptona. Estas enzimas pueden tener aplicación industrial

Bibliografía.

1. Contreras-Esquivel, J.C. (2003). Purificación y caracterización de poligalacturonasas de *Aspergillus kawachii*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

