

# Producción y caracterización de una invertasa extracelular de *Penicillium glabrum*

Rubio, M.e \*; Maldonado, M.e; Aznar, P y Navarro, A.R.

\*Instituto de Biotecnología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán - Argentina e.E.: biotec@unt.edu.ar

## Resumen

*Penicillium glabrum* produce una B- fructofuranosidasa fructohidrolasa (invertasa E.e. 3.2.1.26) cuando crece en un medio con sacarosa. Los mejores inductores para la síntesis de invertasa fueron fructosa, sacarosa y lactosa. La invertasa de *P. glabrum* fue purificada a homogeneidad por precipitación fraccionada con sulfato de amonio, filtración por gel y cromatografía de intercambio iónico. El peso molecular fue estimado en 120 KDa por filtración en gel analítica y

55 KDa por SDS-PAGE. Tiene un Km de 19,60 mM y una Vmax de 0,0166 mmol/min con sacarosa como sustrato, un pH y una temperatura óptima de 5 y 50°C respectivamente y una energía de activación de 4.600 cal/mol. La enzima fue estable durante 30 minutos a una temperatura de 20 a 40°C y un pH de 2,5 a 8,0. Su estabilidad al pH y a la temperatura, su condición de enzima extracelular y el uso de varias fuentes de carbono para su producción prometen un proceso industrial económico.

## Production and characterization of an extracellular invertase from *Penicillium glabrum*

### Summary

*Penicillium glabrum* produced an extracellular B-fructofuranosidase fructohydrolyase (invertase, E.C.3.2.1.26) when grown on medium containing sucrose. The best inducers for the invertase synthesis, fructose, sucrose and lactose.

Invertase from *Penicillium glabrum* was purified to homogeneity by ammonium sulfate fractionation,

gel filtration and anion exchange chromatography. Invertase molecular weight was estimated to be 120 KDa by analytical gel filtration and 55 KDa by SDS-PAGE. It has a Km of 19.60 mM and Vmax of 0.0166 mmol/min with sucrose as a substrate. The optimum pH is 5 and the optimum temperature is 50°C, its activation energy is 4,600 cal/mol. The enzyme is stable from 20° to 40°C and a pH 2.5 to 8.0 for up to 30 min. Its characteristic of stability at pH and temperature, its extracellular condition and the utilization of various carbon source made economical to process industrial.

## Introducción

La sacarosa es utilizada por muchos microorganismos vía conversión en fructosa y glucosa, reacción catalizada por la invertasa (B-D fructofuranosidasa fructohidrolasa; E.e.3.2.1.26). Es una enzima de importancia industrial, principalmente en la industria de los alimentos se la usa para la obtención de jarabe de glucosa y fructosa, que tiene un gran poder edulcorante y no cristaliza a concentraciones elevadas de estos azúcares (Hasal y col, 1992). Algunos microorganismos producen invertasa sólo en presencia de sacarosa como inductor, mientras que otros sintetizan la enzima independientemente de la fuente de carbono presente en el medio. El efecto de varios azúcares a diferentes concentraciones, han sido estudiados en detalle en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* o en hongos filamentosos del género *Aspergillus* (Vainstein and Peberdy, 1991; Hayashi y col, 1992a; Rubio y col, 1997). Sin embargo existen otros microorganismos capaces de

sintetizar esta enzima, los cuales son fuentes potenciales para la producción industrial. Hay muchas publicaciones sobre purificación de enzimas obtenidas de hongos filamentosos (Hayashi y col, 1991; Rubio y Maldonado, 1995), sin embargo no son muchas las que describen la producción de invertasa en *Penicillium*.

En este trabajo estudiamos por primera vez la producción, purificación y caracterización de una invertasa extracelular producida por *Penicillium glabrum*

## Materiales y métodos

### Micro-organismo

*Penicillium glabrum* MC 17 usada en este trabajo fue obtenida del Instituto de Biotecnología. Fue mantenida transfiriéndola mensualmente a tubos con medios de agar Czapek, incubada a 30°C y almacenada 4°C.

### Producción de invertasa

Al medio de producción que contiene en g/l: 3, Na-

N03; 1, K,HP04; 0,5, MgSO4 7 H2O; 0,5, KCl, se agregó separadamente 5 g/l de cada una de las siguientes fuentes de carbono: ácido cítrico, fructosa, galactosa, glucosa, glicerol, lactosa, maltosa, rafinosa, sacarosa, L-sorbosa y xilosa. El medio de producción fue inoculado con  $2,6 \times 10^6$  conidias/ml del cultivo stock. La producción se realizó a 28°C en erlenmeyers de 500 ml, con 100 ml del medio de producción. Después de 30h de incubación el micelio fue separado por filtración usando papel de filtro, fue lavado varias veces con agua destilada y secado a 105°C hasta peso constante para determinar biomasa. El filtrado (extracto crudo) fue mantenido a 4°C para los ensayos enzimáticos.

#### *Purificación de la enzima*

El proceso fue realizado a 4°C de la siguiente forma: 700 ml de extracto crudo obtenido del medio de sacarosa fue fraccionado por adición de sulfato de amonio al 45% de saturación; el precipitado fue eliminado por centrifugación a 17.000 g, durante 20 minutos. Se realizó una segunda precipitación en las mismas condiciones, llevando el sobrenadante a 80% de saturación. Después de centrifugar, el precipitado fue llevado a 2 ml con tampón ácido acético-acetato de sodio 0,2M, pH 5 Y dializado contra el mismo tampón toda la noche.

El extracto dializado fue aplicado a una columna de Sephadex G-150 (2,5 x 45 cm) y eluido con el mismo tampón. La velocidad de elusión fue 30 ml/h y se recogieron fracciones de 2 ml. Se reunieron las fracciones que tenían actividad invertasa (25 a 35). Estas fueron concentradas por ultrafiltración hasta un volumen de 2 ml, el cual fue aplicado a una columna de DEAE Sephacel (1,5 x 18 cm), equilibrada con tampón ácido acético-acetato de sodio y eluida con un gradiente lineal (180 ml) de NaCl entre 0 y 1 M. La velocidad de elusión fue de 30 ml/h y se recogieron fracciones de 2 ml. Se reunieron las fracciones que presentaron mayor actividad invertásica (18 a 23). El extracto purificado fue dializado contra el tampón ácido acético-acetato de sodio, 0,2M, pH 5 durante 8 h y almacenado a 4°C. El mismo fue usado para la determinación de las características de la enzima.

#### *Determinación del peso molecular*

Fue estimado de acuerdo a Andrews (1964), usando una columna de Sephadex G-150 (45 x 2,5 cm), equilibrada y eluida con tampón ácido acético-acetato de sodio, 0,2M (pH 5). Las proteínas estándar fueron Ovoalbúmina (PM, 45.000); Seroalbúmina bovina (PM, 67.000); Fosfatasa alcalina (PM, 100.000) Y Catalasa (PM, 250.000). Para la electroforesis en gel de poli-acrilamida al 10% con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) se usó un kit de proteínas estándar (PM, 36.000 a 205.000) de SIGMA. Los geles fueron revelados con ur'la solución alcalina de nitrato de plata.

#### *Constantes cinéticas*

La constante de Michaelis-Menten (Km) y la velocidad máxima (Vmax) fueron determinadas como una

función de la concentración de sacarosa (0,05 a 1 M) a pH 5.

Especificidad de sustrato: los sustratos usados en las mezclas de reacción fueron: celobiosa; estaquirosa, maltosa, lactosa, rafinosa, trealosa y sacarosa (0,2M) e inulina a 1 % (p/v).

#### *Efecto del pH y de la temperatura*

El efecto del pH sobre la actividad de invertasa fue determinado usando las siguientes soluciones tampón: glicina-HCl, 0,2M (pH 2,6 a 3); ácido acético-acetato de sodio, 0,2M (pH 4 a 5) y fosfato potásico mono y dibásico, 0,2M (pH 7 a 8). La influencia de la temperatura sobre la actividad enzimática fue determinada incubando la mezcla de reacción a temperaturas de 20 a 65°C, a pH 5. Para determinar la estabilidad de la enzima, ésta fue incubada durante 30 minutos a cada pH y a cada temperatura. La actividad residual fue medida a 37°C y pH 5.

#### *Efecto de iones y p-cloromercuribenzoato (PCMB)*

El efecto de cationes Cu<sup>+</sup>, Co<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup> Hg<sup>+</sup>, Mg<sup>+</sup> (todos como cloruros) fueron agregados a la mezcla de reacción a una concentración de 5mM (pH 5 con HCl 1 N). Se determinó el efecto de PCMB a una concentración 3,25mM con y sin el agregado de sacarosa (0,2M).

Actividad enzimática: fue determinada a 37°C y a pH 5 midiendo los azúcares reductores liberados con el reactivo de Somogy Nelson (1952). Una unidad de invertasa fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 mmol de sacarosa por minuto.

#### *Determinación de proteínas*

Las proteínas fueron medidas por el método de Bradford (1976) con seroalbúmina como estándar.

## **Resultados y discusión**

#### *Purificación de la invertasa*

Los perfiles de elusión de las columnas de filtración por gel y DEAE Sephacel mostraron un pico simple con una distribución simétrica de la actividad enzimática. La purificación de la invertasa de *P. glabrum* se muestra en la Tabla 1; la actividad específica del extracto crudo, expresado como unidades de invertasa por mg de proteína, aumentó de 12,02 a 100. El peso molecular determinado por filtración en gel fue 120 KDa; en SDS-PAGE dio una banda simple de proteína con un PM de 55 KDa (Fig.1). Esta diferencia indica la presencia de subunidades en la estructura de la enzima, resultados similares fueron observados en invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* Y 2180 Y *Aspergillus niger* sp. (Babczynski y col, 1980; Rubio y Maldonado, 1995).

FIGURA 2: Efecto del pH sobre la actividad (Actividad relativa, -) y la estabilidad (Actividad residual, -) de la invertasa.

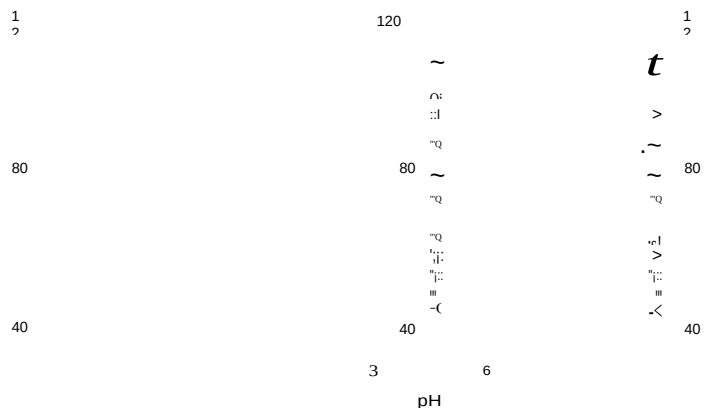


FIGURA 3: Efecto de la temperatura (Actividad relativa, -) y la estabilidad (Actividad residual, -) de la invertasa.

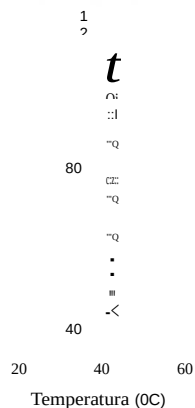


FIGURA 4: Secreción de invertasa durante el desarrollo de *Penicillium glabrum* en un medio con sacarosa. Biomasa (-), actividad invertásica micelial (-) y actividad invertásica extracelular (-).

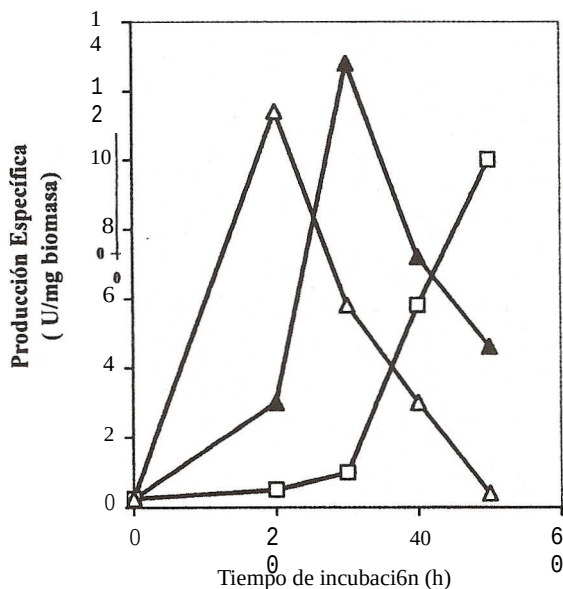


FIGURA 5: Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la síntesis de invertasa de *Penicillium glabrum*. 1- Ácido cítrico; 2- L-sorbose; 3- Maltosa; 4- Glicerol; 5- Glucosa; 6- Xilosa; 7- Rafinosa; 8- Galactosa; 9- Lactosa; 10- Sacarosa; 11- Fructosa.

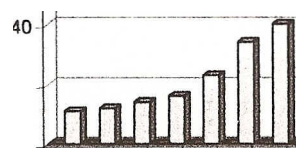
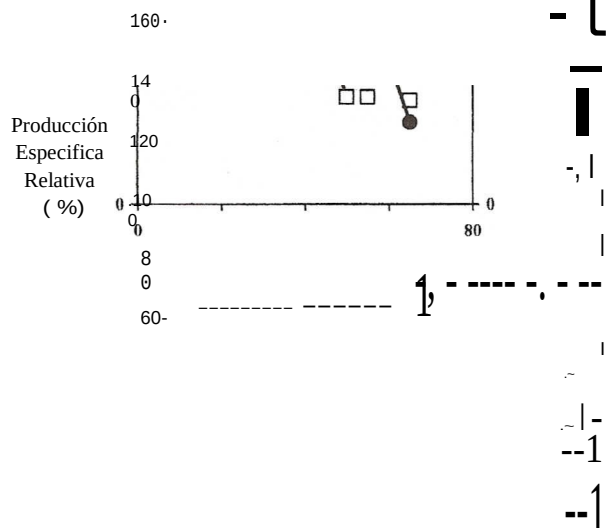


TABLA 1: Pasos de purificación de la invertasa de <i>Penicillium glabrum</i>					
Pasos de Purificación	Unidades Totales	Proteínas Totales (mg)	Actividad Específica (U/mg prot.)	Factor de Purificación	Rendimiento (%)
Crude extract	119,00	9,90	12,02	1,00	100,00
Sulfato de amonio al 45 a 80%	38,08	0,67	56,80	4,72	32,00
Sephadex G-150	2,64	0,04	69,47	5,77	2,22
DEAE Sephacel	2,40	0,02	100,00	8,20	2,02

2  
0  
0

1 2 3 4 j 6 7 8 9 10 11 12

Hidratos de carbono (5 gn)

*Propiedades y características de la enzima*

- Constantes cinéticas: de acuerdo con las gráficas de Lineweaver-Burk, los valores de Km y Vmax fueron 19,6 mM y 0,0166 mmol/min, respectivamente, para sacarosa. El valor del Km fue similar para la enzima de *Schwanniomyces occidentalis*, 20m M (Klein y col, 1989) y es aproximadamente 20 y 10 veces más bajo que aquellos obtenidos para la invertasa de *Aureobasidium* sp ATCC 20254, 0,42M (Hayashi y col, 1992) y para la enzima de *Aspergillus japonicus*, 0,21 M (Hayashi y col, 1992 b), respectivamente.

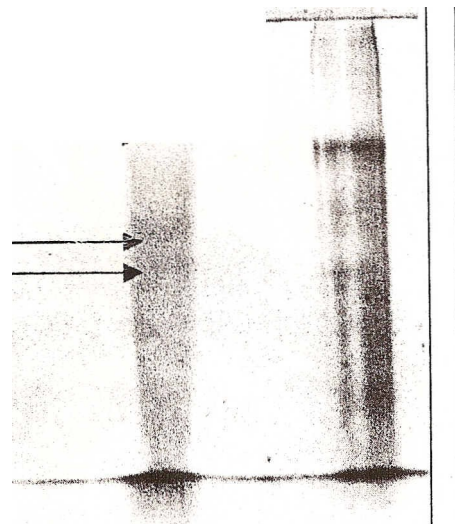
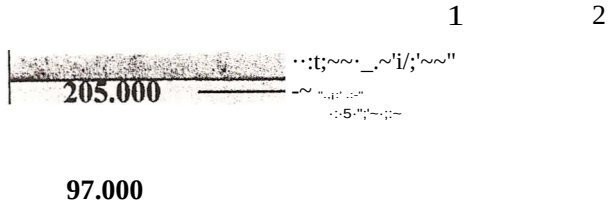
- Efecto del pH y la temperatura: la máxima actividad de la invertasa de *P. g/abrum*, al igual que otras invertasas fúngicas (Hayashi y col, 1992; Rubio y Maldonado, 1995), se encuentra principalmente en el rango de pH de 4 a 6 (Fig.2) con un máximo a pH 5. La enzima fue estable bajo condiciones de pH ácidas y alcalinas. Resultados similares fueron obtenidos con la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Vitolo y col, 1995).

Cuando se determinó el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se encontró que la máxima es a 50°C (Fig. 3) Y es estable hasta una temperatura de 40°C. La energía de activación calculada de la representación gráfica de la ecuación de Arrhenius es 4.600 cal/mol.

- Efecto de iones y PCMB: Co<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, disminuyeron la actividad de invertasa un 50% y el Ca<sup>2+</sup> un 16% respecto a la máxima obtenida en el control (sin iones). K<sup>+</sup> y Mg<sup>2+</sup> no inhibieron la actividad de la enzima. PCMB (3,25 mmol/l) disminuyó un 52% la actividad de la enzima en presencia de sacarosa, mientras que en ausencia de sacarosa la inhibición fue del 90% de su actividad máxima. Esto muestra un fuerte efecto protector de la sacarosa sobre la actividad de la invertasa. Los resultados sugieren que el triptófano y la cisteína son aminoácidos esenciales en el sitio activo para la actividad enzimática, debido a que el PCMB y el Hg<sup>2+</sup> son agentes que bloquean los grupos mercaptos (SH-) de estos aminoácidos.

- Producción de invertasa: la biosíntesis y secreción de invertasa de *P. g/abrum* se produce durante las primeras 30 h de crecimiento en un medio con sacarosa como fuente de carbono (Fig. 4) Y disminuye con la edad del cultivo. La síntesis de la enzima en *P. g/abrum*, al igual que en *Aspergillus niger* (Rubio y col., 1997), fue influenciada por el azúcar usado como fuente de carbono. La Fig. 5 muestra que en los medios de producción que contienen ácido cítrico, glicerol, maltosa y L-sorbosa se obtuvieron niveles bajos de invertasa, esto se debe al nivel basal presente de la enzima; mientras que con galactosa la producción específica relativa fue 51 % respecto a la sacarosa. Con fructosa, lactosa y sacarosa se obtuvieron las mayores producciones específicas. Estos resultados indican que la invertasa es una enzima inducible y que existe una relación entre la estructura química del sustrato y el efecto inductor. Las características comunes de los hidratos de carbono que produjeron inducción es que contienen la molécula de fructosa, glucosa o ambas y el enlace B cuando se trata de un di o polisacárido. El enlace a no tiene efecto sobre la síntesis de la invertasa, como indica la baja inducción producida por la maltosa.

**FIGURA 1: Purificación de invertasa determinada por electroforesis en gel de poliacríamida con SOSo**



**Propiedades y características de la enzima**

- Constantes cinéticas: de acuerdo con las gráficas de Lineweaver-811rk, los valores de Km y Vmax fueron 19,6 mM y 0,0166 mmol/min, respectivamente, para sacarosa. El valor del Km fue similar para la enzima de *Schwanniomyces occidentalis*, 20mM (Klein y col, 1989) y ps anroximad,lmnte 20 y 10 ve(es más bajo que ilquellos obtenidos rarél la invertasa de *Aureobasidium* sp ATCC 20254, 0,117M (Hayashi y col, 1992) y para la enzimil de *Aspergillus japonicus*, 0,21 M (Hayashi y col, 1997 b), respectivamente.

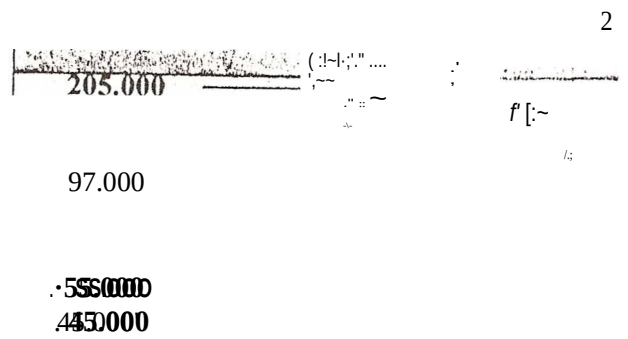
- Efecto del pH y la temperatura: la máxima actividad de 1" invertasil de *P. g/abrum*, al igual que otras invert21SilS flingicas (HaYélshi y col, 1992; Rubio y Maldonado, 1995), se ennJentra principalmente en el rango de pH de 4 a 6 (Fig.2) con un máximo a pH 5. La enzima ile estable bajo condiciones de pH ácidas y alcalinas. Resultados similélres fueron obtenidos con la invertasa de *Saeeharomyeps eerevisiae* (Vitola y col, 1995).

Cuando se determinó el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se encontró que la máxi-, ma es a 50°C (Fig. 3) Y es estable hasta una temperatura de 40°C. La energfa de activación calculada de la representación gráfica de la ecuación de Arrhenius es 11(,00 callmol.

- Efecto de iones y PCMB: Co", Na', Cu", Hg" disminuyeron la actividad de invertasa un 50% y el Ca" un '1 0% respecto a la máxima obtenida en el control (sin iones). K' y M9" no inhibieron la actividad de la enzima. PCMB (3,25 mmol/l) disminuyó un 52% la actividad de la enzima en presencia de sacarosa, mientras que en (lusencia de sacarosa la inhibición fue del 90% de su actividad máxima. Esto muestra un fuerte efecto proIf'ctor de la sacarosa sobre la actividad de la invertasa. los resultados sugieren que el triptófano y la cisteína son aminoácidos esenciales en el sitio activo para la actividad enzimática, debido a que el PCMB y el Hg" son ilgentes que bloquean los grupos mercaptos (51-1-) de "l aminoácidos.

- Producción de invertasa: la biosíntesis y secreción de invertasa de *P. g/abrum* se produce durante las primeras 30 h de crecimiento en un medio con sacarosa como fuente de carbono (r-ig. 4) y disminuye con la edad del cultivo. La síntesis de la enzima en *P. g/ abrum*, al igual que en *Aspergillus niger* (Rubio y col.,1997), fue influenciada por el azúcar usado como fuente de carbono. La Fig. 5 muestra que en los medios de producción que contienen ácido c(trico, glicerol, maltosa y L-sorbosa se obtuvieron niveles bajos de invertasa, esto se debe al nivel basal presente de la enzima; mientras que con galactosa la producción especffica relativa fue 51 % respecto a la sacarosa. Con fructosa, lactosa y sacarosa se obtuvieron las ma- yores producciones específicas. Estos resultados indican que la invertasa es una enzima inducible y que existe una relación entre la estructura química del Hlstrato y el efecto inductor. Las características comunes de los hidratos de carbono que produjeror\,inducción es que contienen la moléculi'l de fructosa, glucosa o ambas y el enlace B cUflndo se trata de un di o polisacárido. El enlace a no tiene efecto sobre la síntesis de fa invertasa, como indica la baja inducción producida por la ma/tosa.

FIGURA 1: Purificación de invertasa determinada por electroforesis en gel de poliacríamida con SpS.



Podemos concluir que la invertasa de *Penicillium g/abrum*, al ser una enzima extracelular, presenta un rango amplio de estabilidad al pH (2,5 a 8) y no es inhibida por K' y Mg". hace interesante su aplicación desde el punto de vista industrial, comparada con la invertasa de levadura (Vitola y col, 1995). Además hongos como *Aspergillus japonicus* y *Aspergillus niger* (Chen y Liu 1996; Rubio y col, 1997) producen invertasa intracelular en medios con sacarosa y rafinosa, en cambio *Penicillium g/abrum* produce la enzima en medios con fructosa, lactosa, rafinosa y sacarosa, esto permitiría el uso de diferentes sub-productos industriales que contienen estos azúcares (suero de leche, residuos de remolachas, melazas, etc.) como fuentes de carbono para la producción de invertasa por este hongo.

Referencias bibliográficas  
 ANDREWS, P (1964). Biochem J.: 222  
 BRAOFORD, M.M. (1976). Anal Biochem. 72: 248-254  
 BRADFORD, M.M. (1976). Anal Biochem. 72: 248-254  
 BARCZINSKI, P (1980). Biochim. Biophys. Acta 614: 121-133.  
 CHEN, W. AND LIU, CH. (1996). Enzyme Microbiol. Techno. 18: 153-160.  
 CHEN, W. AND LIU, CH. (1996). Enzyme Microbiol. Techno. 18: 153-160.  
 HASAL, P.; VOJTLSEK, K.; CEJKOVA, A.; KLECZEK, P.; KROFRONOVA, O. (1992). Enzyme Microbiol. Technol. 14: 221-229.  
 HAYASHI, S.; NONOGUCHI, M.; TAKASAKI, Y.; UENO, H AND IMADA, K. (1991). J. Ind. Microbiol. 7: 251-256.  
 HAYASHI, S.; NONOGUCHI, M.; SHIMOKAWA, Y.; TAKASAKI, Y AND IMADA, K. (1992). J. Ind. Microbiol. 9: 251-255  
 HAYASHI, S.; MATSUZAKI, K.; TAKASAKI, Y.; UENO, H AND IMAOA, K. (1992). World J. Microbiol. Biotechnol. 1: 153-159  
 HAYASHI, S.; MATSUZAKI, K. Y.; TAKASAKI, Y.; UENO, H AND IMADA, K. (1992). World J. Microbiol. Biotechnol. 2: 275-279  
 KLEIN, R.; DEBEL, M.; SARGENT, J.; ZURECHER, R.; REARDON, D AND HEIN, RIKSON, R (1989). Preparative Biochem. 19: 293-319.  
 RIKSON, R (1989). Preparative Biochem. 19: 293-319.  
 RUBIO, M. AND MALDONADO, M. (1995). Curr. Microbiol. 31: 80-83  
 RUBIO, M.; MALDONADO, M. AND NAVARRO, A. (1997). Microbiologie Aliments Nutrition 15: 17-22  
 SOMOGY, M. (1952). J. Biol. Chem. 195:19-23  
 SOMOGY, M. (1952). J. Biol. Chem. 195:19-23  
 VAINSTEIN, M. AND PEBERDY, J. (1991). J. Gen. Microbiol. 137: 315-321  
 VAINSTEIN, M. AND PEBERDY, J. (1991). J. Gen. Microbiol. 137: 315-321  
 VITOLA, M.; DURANTI, M. AND PELLEGRIM, M. (1995). J. Ind. Microbiol. 15: 75-79.  
 VITOLA, M.; DURANTI, M. AND PELLEGRIM, M. (1995). J. Ind. Microbiol. 15:75-79. f.)

