

CARACTERIZACION DE INULINASA DE *Kluyveromyces fragilis* CDBL-278 Y DE INVERTASA DE *Saccharomyces cerevisiae* POR DICROISMO CIRCULAR

Presenta

**Miguel Angel Zavala Sánchez
para obtener el grado de Maestro en Química**

1995

Esta tesis se realizó en el área de Biofísicoquímica, del Departamento de Química de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la Dirección del Dr. Andrés Hernández Arana.

AGRADECIMIENTOS

Andrés, Por tu apoyo y dirección de la tesis

Alejandro, Por estar en los momentos difíciles y tu gran ayuda

Salvador, Por los tips y tu gran apoyo

Edgar, Por tu ayuda e infinita paciencia

Salud, Por tu interés y motivación para lograr esta meta

ANTECEDENTES

Las enzimas que hidrolizan los enlaces del tipo β -fructosídico han sido clasificadas en dos tipos: invertasas (β -D-fructo-furanoósido fructohidrolasas EC.3.2.1.26), que hidrolizan la sacarosa a glucosa y fructosa; e inulinasas (2- β -D-fructan fructohidrolasas EC. 3.2.1.7), las cuales actúan principalmente sobre polímeros de fructosa, pero también presentan actividad sobre la sacarosa. Ambas clases de enzimas presentan un alto contenido de carbohidratos, es decir, son glicoproteínas.

La producción de estas dos clases de glicoproteínas por diferentes microorganismos es conocida desde hace mucho tiempo y se ha determinado que está asociada al crecimiento celular del microorganismo sobre diferentes tipos de sustratos como la sacarosa y algunas D-fructanas. Estas proteínas son funcionalmente similares; sin embargo, presentan diferencias en la especificidad para degradar polímeros de fructosa de elevado peso molecular, como es el caso de la inulina obtenida de la dalia, la cual consiste de aproximadamente 28 a 30 residuos de fructosa unidos por medio de enlaces glucosídicos y un residuo de glucosa terminal. La hidrólisis de la inulina es generalmente catalizada por las inulinasas, pero, también puede ser catalizada, aunque muy lentamente, por las invertasas producidas por algunos microorganismos. Debido a lo anterior, la clasificación de ambos tipos de enzimas ha sido objeto de discusión^{1,2}. Se ha cuestionado la posibilidad de considerar a la inulinaasa como un tipo especial de invertasa o como un tipo de enzima totalmente diferente, con un modo de acción análogo. Para diferenciar la actividad enzimática de inulinaasa de la de invertasa se usa comúnmente la relación S/I (actividad relativa sobre sacarosa e inulina), sin embargo, éste método de diferenciación no se considera suficiente ya que depende de las condiciones en las que se determine la actividad enzimática.

Estudios realizados sobre la bioquímica de las inulinasas producidas por diferentes microorganismos demostraron que éstas tienen la misma especificidad por el tipo de sustrato, pero muestran diferencias en la estabilidad, pH y temperatura óptimos para la actividad enzimática³.

En el caso de las invertasas, se probó que en la producida por *Saccharomyces cerevisiae* existen diferencias estructurales entre la enzima excretada al medio de cultivo y la retenida en la pared celular⁴.

Tanto las inulinasas como las invertasas han sido objeto de numerosos estudios acerca de su producción, purificación, caracterización química y física y usos a nivel industrial. Sin embargo, en la actualidad los estudios acerca de la estructura de las inulinasas son muy limitados y no existe un estudio comparativo entre las posibles conformaciones de ambas enzimas (inulinasa e invertasa).

En el presente trabajo se pretende contribuir con el estudio estructural comparativo de ambas clases de enzimas por lo que se propone obtener la enzima inulinasa asociada a la pared de la levadura *Kluyveromices fragilis*¹, determinar el efecto de la temperatura y del pH sobre la estabilidad y actividad enzimática de la inulinasa, purificar la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* y caracterizar ambas enzimas por medio de espectroscopía de dicroísmo circular, para determinar si están o no estructuralmente relacionadas.

¹Actualmente la levadura *Kluyveromices fragilis* es conocida como *Kluyveromices marxianus*, ambos términos serán usados indistintamente en este trabajo, respetando la nomenclatura del autor que se cite.

Inulinasa

En 1900, se observó por primera vez, que *Saccharomyces marxianus*, poseía la capacidad de crecer sobre sustratos que contenían inulina como fuente de carbono, hecho que se atribuyó a la producción de un tipo de enzima, a la cual se le denominó como inulinasa (2- β -D-fructan fructohidrolasas EC. 3.2.1.7), ya que es capaz de degradar este tipo de sustrato. Se han aislado enzimas con actividad de β -fructosidasa (inulinasa) de plantas⁵, bacterias⁶, hongos⁷ y levaduras⁸. Esta actividad de inulinasa representa un uso potencial para la obtención de fructosa a nivel industrial a partir de desechos agrícolas, por lo que estas enzimas han sido estudiadas ampliamente.

La obtención de estas enzimas a partir de plantas presenta el inconveniente de que es muy difícil aislarlas y, además, tienen una marcada actividad de invertasa, por lo que actualmente se utilizan las enzimas de fuentes microbianas³. Las enzimas del tipo inulinasa producidas por diferentes microorganismos como los hongos: *Aspergillus ficuum*⁹ y *Fusarium oxysporum*¹⁰; las bacterias: *Bacillus subtilis* 430 A¹¹; y levaduras: *Candida salmenticensis*⁸, *Kluyveromices fragilis*¹² y *Debaryomices cantarelli*¹³, además de la actividad de inulinasa, presentan también diferentes grados de actividad de invertasa, y todas pertenecen al tipo β -fructosidasa. Algunas de las propiedades de este tipo de enzimas se presentan en la tabla I.

Se ha encontrado que la invertasa purificada de diferentes levaduras, presenta una ligera actividad de inulinasa a valores de pH y temperatura completamente diferentes a aquéllos en los cuales la enzima tiene actividad de invertasa en la misma preparación, por lo que se consideró que esta enzima poseía ambas actividades¹⁴; sin embargo, actualmente es aceptado que existen dos tipos de actividades enzimáticas completamente diferentes.

Estudios realizados sobre la producción de inulinasa por *Kluyveromices marxianus*, demostraron que el extracto de levadura es la mejor fuente de nitrógeno para la producción de esta enzima¹⁵. Se ha reportado que *K. fragilis* produce cantidades equivalentes de inulinasa en un intervalo amplio de pH (3.5-6.0), que la aereación es un factor determinante para el crecimiento de esta levadura y para la producción de la enzima, y que la temperatura óptima para obtener una mayor actividad se encuentra entre 30 y 40°C¹².

En diferentes especies de *Kluyveromices* se ha demostrado que a diferencia de la invertasa, la cual se encuentra principalmente dentro de la célula, la inulinasa es una glicoproteína extracelular, parcialmente asociada a la pared celular y parcialmente excretada al medio de cultivo, aunque también se ha encontrado enzima unida a la célula en cantidades apreciables². La diferencia en la localización de estas enzimas se atribuye, principalmente, al papel fisiológico que desempeñan en el metabolismo del microorganismo que las produce.

Se han desarrollado y reportado diferentes procedimientos para la purificación y caracterización de la inulinasa producida por diferentes microorganismos³. En el caso de la inulinasa producida por *K. fragilis*, esta fue semipurificada inicialmente por Snyder y Phaff¹⁵, los cuales introdujeron el uso de la relación S/I para diferenciar la actividad de inulinasa, (valores menores a 50 de esta relación, indican actividad de inulinasa³); y posteriormente fue purificada por Grootwasink y colaboradores¹² (tabla II), así como por otros investigadores.

Workman y Day⁶ purificaron la inulinasa producida por *Kluyveromices fragilis*, encontrando que dicha enzima es una glicoproteína con un contenido de carbohidratos del 66% en peso, estable a 50°C, con un pH óptimo de 4.5, cuya actividad disminuye a temperaturas mayores de 55°C, con un pI de

aproximadamente 4.0. Estos autores sugieren que además de los estudios de electroforesis, se debe considerar la determinación del punto isoelectrico (pI) como un parámetro para demostrar la pureza de la enzima. También determinaron los valores de K_m de la inulinasa sobre sacarosa (13.6 mM a pH 5.0) y sobre rafinosa (46.1 mM a pH 5.0), encontrando que la actividad enzimática es inhibida por la configuración de furanosa de la fructosa, pero no mencionan el peso molecular de la enzima purificada, la posible conformación de ésta, y tampoco reportan datos acerca de la determinación de la K_m sobre inulina.

Resultados obtenidos por Rouwenhorst y colaboradores¹⁷ sobre la purificación y caracterización de la inulinasa extracelular de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, indican un peso molecular de 64 kDa para la cadena polipeptídica con un contenido variable de carbohidratos del 26 al 37%, y que éstos carbohidratos están formados principalmente por oligosacáridos con un alto contenido de manosa unidos a residuos de asparagina de la cadena polipeptídica, puesto que pueden ser removidos con Endo β -N-acetilglucosaminidasa H, (Endo-H). Este grupo de investigación propone que la enzima liberada al medio de cultivo y la enzima asociada a la pared celular tienen subunidades idénticas, y que la diferencia entre las dos enzimas es el estado de agregación. Proponen que la enzima liberada al medio de cultivo está formada de dos subunidades con un peso molecular de 165 kDa y la enzima asociada a la pared consiste de un tetrámero con un peso molecular de 350 kDa; sin embargo, no descartan la posibilidad de que la enzima liberada al fluido sea un tetrámero disociado. Los resultados de las determinaciones de la actividad enzimática, considerando un grado de glicosilación del 26%, demostraron que la inulinasa excretada presenta una mayor actividad específica que la enzima retenida en la pared celular, sobre rafinosa, sacarosa e inulina, a

pH 4.5 (tabla III). Estos investigadores encontraron un valor de 16 para la relación S/I, usando sacarosa e inulina purificada de alcachofa, a pH 4.5 y 50°C, y calcularon un coeficiente específico de absorción para una solución de 1 mg/ml ($A_{280}^{0.1\%}$) de 1.03 para el dímero y de 1.00 para el tetrámero.

Rouwenhorst y colaboradores¹⁷, demostraron que conjuntamente a la acción de la inulinasa se encuentra presente la actividad de la invertasa, proponiendo que aunque las actividades no se pueden separar, existen dos enzimas diferentes, inulinasa e invertasa, debido a que ellos encontraron poca homología entre la secuencia amino terminal de la enzima inulinasa producida por *K. marxianus* y la invertasa producida por *Saccharomyces cerevisiae* (figura 1). También compararon la secuencia de los primeros veinte aminoácidos de la inulinasa excretada al medio de cultivo y de la retenida en la célula y encontraron que esta secuencia es idéntica.

Laloux y colaboradores¹⁸ purificaron y determinaron la secuencia de los aminoácidos del extremo amino terminal de la inulinasa producida por *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* y compararon esta secuencia con la de la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*, encontrando que de acuerdo a lo reportado por Rowenhorst¹⁷, los primeros veinte residuos de aminoácidos no concuerdan con los de la invertasa; sin embargo, estos autores clonaron y secuenciaron el gen de la inulinasa (INU1), y dedujeron la secuencia de aminoácidos, encontrando una homología global del 68 % (figura 2), a partir de estos resultados proponen un peso molecular para la inulinasa retenida en la pared celular de 59 672 Da. En base a esto, proponen que ambas proteínas deben de estar estrechamente relacionadas con diferencias sólo en el grado de especificidad al sustrato; pero Laloux y colaboradores no consideran las diferencias estructurales de la enzima propuestas por Rouwenhorst.

TABLA I

**CARACTERISTICAS DETERMINADAS DE ALGUNAS INULINASAS
OBTENIDAS DE DIFERENTES MICROORGANISMOS**

Microorganismos	Temperatura óptima de producción °C	Temperatura de incubación °C	Tiempo (min)	Actividad Residual (%)	pH óptimo	Rango de estabilidad de pH	Referencia
<i>Penicillium sp.</i>	45	50	10	80	4.5	4.0-7.0	7
<i>Aspergillus niger</i>	45	50	30	75	5.3	4.0-7.5	7,
<i>Candida kefyrgens</i>	50	60	10	40	4.5	3.8-8.0	8
<i>Candida salmenticensis</i>	46	50	30	71	3.5		3
<i>Kluyveromices fragilis</i>	55	55	60	95	5-5.2		1
<i>Kluyveromices fragilis</i>		60	10	68			3
<i>Kluyveromices fragilis</i>	49	55	120	85	5.5		2
<i>Kluyveromices fragilis</i>		60	5	60			3
<i>Debaromices cantarelli</i>	30	50	5	20	4.0		13
<i>Debaromices cantarelli</i>		50	5	95			3

TABLA II

METODOLOGIA DEL PROCESO DE PURIFICACION DE LA INULINASA PRODUCIDA POR *Kluyveromices fragilis*, REPORTADA POR Grootwasink y Fleming en 1979.

Proceso de purificación	Actividad enzimática U/mg de proteína
Se purificó la inulinasa intracelular	
El medio de cultivo se centrifugó	
Se lisaron las células a pH de 5.0 por 13 horas a 50 °C	
Se centrifugó a 30 000 rpm	450
Se realizó una ultrafiltración con una membrana de tamaño de corte de 50 000	2224
Se precipitaron las impurezas con acetona al 40 % v/v	
Se precipitó la inulinasa con acetona al 80 % v/v	2678
Se secó a temperatura ambiente y el residuo se disolvió en una solución de acetato de sodio 0.1 M a pH de 5.0 a 0 °C	
Se determinó la pureza, la cual no fue del 100 %	
La recuperación de la enzima fue del 83 %	

TABLA III

VALORES APARENTES DE K_m Y ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA INULINASA SOBRENADANTE (DIMERO) Y DE LA PARED CELULAR (TETRAMERO) DE *K. marxianus* CBS 6556 SOBRE TRES SUSTRATOS^a.

Sustrato	Inulinasa	K_m (mM)	Actividad especifica de inulinasa (U/mg de proteina) ^b
Sacarosa	Dímero	14.6	1.388
	Tetrámero	14.7	634
Rafinosa	Dímero	5.6	469
	Tetrámero	5.3	205
Inulina	Dímero		88
	Tetrámero		40

^aValores tomados de Rouwehorst¹⁷

^bPara el cálculo de la concentración de proteína se consideró un 26 % de glicosilación.

Inulinasa	¹ Ser-Gly-Asp-Ser-Lys-Ala-Ile-Thr-?-Thr-Thr-Phe-?-Leu-Asn-Arg-Pro-Ser-Val- ²⁰ Tyr-
Invertasa	¹ Ser-Met-Thr-Asn-Glu-Thr-Ser-Asp-Arg-Pro-Leu-Val-His-Phe-Thr-Pro-Asn-Lys-Gly- ²⁰ Trp-

Figura 1. Secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal de la inulinasa de *K. marxianus* CBS 6556 y de la invertasa de *S. cerevisiae*¹⁷.

INU1	1 MKFAYSLLLPLAGVSASVINYKRDGDSKAITNTTFLSLNRPSVHF TPSHGW 50
SUC2	1 . MLLQAFLLLAGFAAKISASMTMETS DRPLVHFTPNKGW 39
	51 MNDPNGLWYDAKEEDWHLYYQYNPAATIWGTPLYWGHAVSKDLTSWTDYG 100
	40 MNDPNGLWYDEKDAK WHLYFQYNPNDTVWGTPLFWGHATSDDLTNWEDQP 89
	101 ASLPGSDDAGAFSGSMVIDYNNTSGFFNSSVDPRQRAVAVWTLKGPSQ 150
	90 I A IAPKRNDGAFSGSMVVDYNNTSGFFNDTIDPRQRCVAIWTYNTPESE 139
	151 AQHISYSLDGGYTFEHYTDNAVLDINSSNFRDPKVFWEHENGEDG RWIM 200
	140 EQYISYSLDGGYTFTEYQKNPVLAANSTQFRDPKVFWYEPSQ KWIM 185
	201 AVAESQVFSVLFYSSPNLKNWTLESNFTHHGWTGTQYSPGLVKVPYDSV 250
	186 TAAKSQDYKIEIYSSDDLKSWKLESAFANEG F LGYQYSPGL I EVPTE . . 233
	251 VDSSNSSDSKPDSAWVLFCS INPGGPLGGSVTQYFVGDFNGTHFTPIDGQ 300
	234 QDPSKSYWVMFISINPGAPAGGSFNQYFVGSFNGTHFEAFDNQ 276
	301 TRFLDMGKDYYALQTFENT . PNEKDVYGIAWASNWQYAQQAPTPWRSSM 349
	277 SRVVDGKDYALQTFENTD PTYGSA LGIAWASNWEYS AFVPTNPWRSSM 326
	350 SLVRQFTLK .DFST NPNSADVVLNSQPDLNYDALRKNGTYS ITNYTVTS 398
	327 SLVRKFSLNTEYQANPETEL I NLKAEP I LNI SNAGPWSR . . FATNTTLTK 374
	399 ENGKKIKLDNPSGSLEFHLEYVFNGSPDIKSNVFADLSLYFKGNDDNEY 448
	375 ANSYNVDLSNSTGTLEFELVYAVNTTQTISKSVFADLSLWFKGLEDPEEY 424
	449 LR LGYETNGGAFFLDRGHTKI PF VKENLFFTHQL AVTNPV . . SNYTTNVF 496
	425 LRMGFEVSA SS FFLDRGNSKVKFVKENPYFTNRMSVNNQPFKSEN DLSYY 474
	497 DVYGVIDKN II ELYFDNGNVVST NTFF F STNNVI GEI D I KSPY DKAYTIN 546
	475 KVGGLLDQNILELYFND GDVVSTNTYFMTTGNALGSVNMTTGVDNL FYID 524
	547 SFNVTQFN V 555
	525 KFQVREVK . 532

Figura 2. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la inulinasa (INU1) de *K. marxianus* y de la invertasa (SUC2) de *S. cerevisiae*¹⁸.

Inulina

La inulina es un carbohidrato de reserva de origen vegetal que se encuentra en plantas de las familias *Compositae* y *Graminae*. Su nombre se origina del género *Inula* (Alant) de la familia de las *Compositae*, aunque otro tipo de plantas como dalia, diente de león y alcachofa también presentan grandes cantidades de este tipo de carbohidrato³.

La inulina y los análogos de ésta, como las polifruktananas, consisten de una cadena lineal de moléculas de fructosa unidas por enlaces $\beta(2,1)$, que termina en un residuo de glucosa unido por medio de un enlace $\beta(1,4)$ tipo sacarosa (figura 3). Se ha encontrado que la inulina obtenida de la dalia contiene aproximadamente 30 unidades de fructosa y una de glucosa por cadena, mientras que un promedio de 18 moléculas de fructosa y un residuo de glucosa se han encontrado en el carbohidrato de la alcachofa. Con estos resultados se propone para la inulina por lo menos un peso molecular de 5 400. Sin embargo, debido a la variación en la longitud de la cadena se estima que el peso molecular puede variar entre 3 500 y 5 500.

La inulina presenta las siguientes características fisicoquímicas; es insoluble en agua fría, ligeramente soluble en agua a 55°C, precipita en mezclas de etanol-agua. Se hidroliza en medios ácidos a temperaturas de 70-80°C¹⁹. Las inulinasas de plantas y de fuentes microbianas son capaces de hidrolizarla a fructosa y a otros oligosacáridos mas pequeños bajo condiciones muy suaves. La hidrólisis de la inulina también puede ser catalizada por la invertasa, aunque a una velocidad mucho menor, por lo que la clasificación de las dos enzimas (inulinasa e invertasa), se encuentra hasta la fecha en discusión.

La presencia de inulina en un medio de cultivo se considera un requisito imprescindible para la producción de la enzima inulinasa. Sin embargo, en *K. fragilis* se ha determinado que el primer inductor de la enzima es la fructosa²⁰.

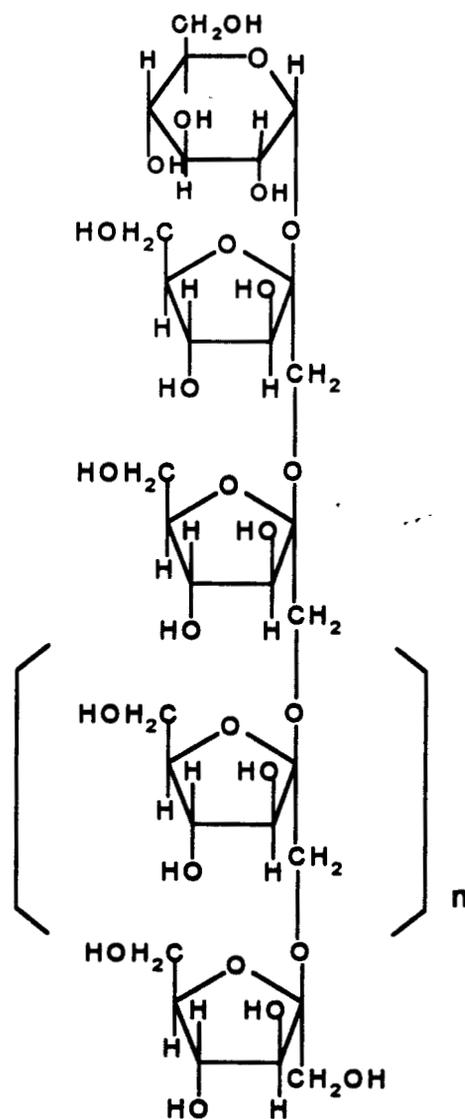


Figura 3. Estructura del polímero de inulina.
 n depende de la fuente de la cual se obtenga la inulina.

Invertasa

La invertasa (β -D-fructofuranosidasa, EC 3.2.1.26) es producida por diferentes levaduras y excretada al medio de cultivo. Fue aislada inicialmente por Berthelot en 1860, quien logró separarla del medio de cultivo por precipitación con alcohol. A partir de entonces esta enzima ha sido ampliamente estudiada²¹.

En levaduras del género *Saccharomyces* se ha demostrado la presencia de dos tipos de enzima con actividad de invertasa; un tipo de invertasa excretado al medio de cultivo, denominada como “invertasa externa” y otra llamada “invertasa interna”, la cual es retenida en la pared celular del microorganismo que la produce. Ambos tipos de enzima presentan la misma actividad específica sobre rafinosa y muy similar sobre sacarosa; sin embargo, la invertasa externa presenta un alto grado de glicosilación (50 %), predominando la manosa, y su síntesis es reprimida por la presencia de glucosa. En cambio, la invertasa interna no contiene carbohidratos y su producción no se ve afectada por la concentración de glucosa presente. Aunque ambas enzimas presentan la misma relación pH-actividad y una máxima actividad a pH 4.5, la estabilidad de ambas enzimas a 30 °C es diferente; la invertasa externa es estable a valores de pH que van de 3 a 7.5 y la invertasa interna a valores de pH que van de 6 a 9⁴.

Se ha demostrado que la invertasa externa existe principalmente en forma de dímeros. Las subunidades que conforman esta enzima han mostrado ser idénticas con un peso molecular de 60 kDa para la parte protéica por subunidad, con aproximadamente 9 cadenas de oligosacáridos compuestos principalmente de 26 a 54 residuos de manosa²². Se han realizado diferentes estudios acerca del efecto de los carbohidratos en la invertasa externa y se ha determinado que estos permiten que la enzima sea estable a valores de pH de 4.0, valor al cual la invertasa no glicosilada no es estable²³. También protegen a

la enzima de la proteólisis y promueven la formación de estructuras oligoméricas de peso molecular variable, que van desde la forma de dímero (2×10^5 Da), hasta la forma octamérica ($PM 8 \times 10^5$ Da)²⁴, considerando a la enzima glicosilada.

La estructura de los carbohidratos de la invertasa externa ha sido ampliamente estudiada, y debido al gran contenido de manosa esta enzima también es considerada como una manoproteína. Se ha encontrado que las largas cadenas de polimánosa se encuentran unidas a través de residuos de di-N-acetilcitobiosa con los residuos de asparagina de la parte protéica²⁵.

Inicialmente se consideró que la invertasa externa y la interna eran codificadas por genes diferentes, ya que se determinaron diferentes composiciones de los residuos de aminoácidos entre estas dos enzimas⁴. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que ambas proteínas son codificadas por el mismo gen²⁶ y comparando el contenido de residuos de aminoácidos de ambos tipos de invertasas (tabla IV), por lo que se considera que las cadenas polipeptídicas de ambas proteínas son idénticas.

La forma oligomérica de la invertasa externa es aceptada generalmente. Sin embargo, estudios realizados por microscopía electrónica han demostrado que la invertasa interna (no glicosilada), puede también encontrarse en forma octamérica, dependiendo principalmente de la concentración de la proteína²⁷. Estudios comparativos entre las propiedades de la invertasa interna con la externa, confirman los estudios realizados por otros autores, coincidiendo en el peso molecular de los dos tipos de invertasa y en las características cinéticas de ambas enzimas²⁸.

La estructura secundaria de la invertasa determinada por dicroísmo circular, figura 4, muestra que en esta enzima predomina la conformación de hoja- β con un máximo negativo a aproximadamente a 218 nm y un máximo

positivo a 232 nm. La estructura secundaria ha sido usada para realizar diferentes estudios acerca del papel que juegan los carbohidratos en la invertasa externa producida por *Saccharomyces cerevisiae* y se ha demostrado que la enzima glicosilada y la no glicosilada, no presentan diferencias detectables²³.

Estudios de espectroscopía de dicroísmo circular de la invertasa producida por *Saccharomices cerevisiae* han permitido determinar la influencia del grado de glicosilación en el proceso de desnaturalización-renaturalización de esta enzima en clorhidrato de guanidina 8 M²⁹. Dentro de estos estudios también se reporta el espectro de la enzima nativa determinado a 25 °C y en el cual las elipticidades molares se calcularon en base a 54 480 Da de peso molecular, considerando 512 aminoácidos/subunidad. Los espectros experimentales mostraron que la invertasa nativa presenta una pequeñísima cantidad de α -hélice, y que no hay diferencias significativas entre la estructura secundaria de las enzimas nativa y renaturalizada.

TABLA IV

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LAS INVERTASAS INTERNA Y EXTERNA DE *Saccharomyces cerevisiae*

Aminoácidos	Deducidos de la secuencia de DNA ²⁶	Invertasa Interna ²⁸	Invertasa Externa ²⁸
	residuos / subunidad mol		
Acido cistéico	2	2	3
Aspartato	76	75	75
Treonina	39	38	38
Serina	47	46	48
Glutamato	48	51	49
Prolina	26	27	27
Glicina	30	33	31
Alanina	29	30	30
Valina	29	30	29
Metionina	10	9	9
Isoleucina	18	18	18
Leucina	34	36	34
Tirosina	31	29	29
Fenilalanina	36	34	35
Histidina	4	4	4
Lisina	25	24	24
Arginina	13	14	13
Triptofano	16	15	15
Total	513	515	511
Glucosamina		0	18

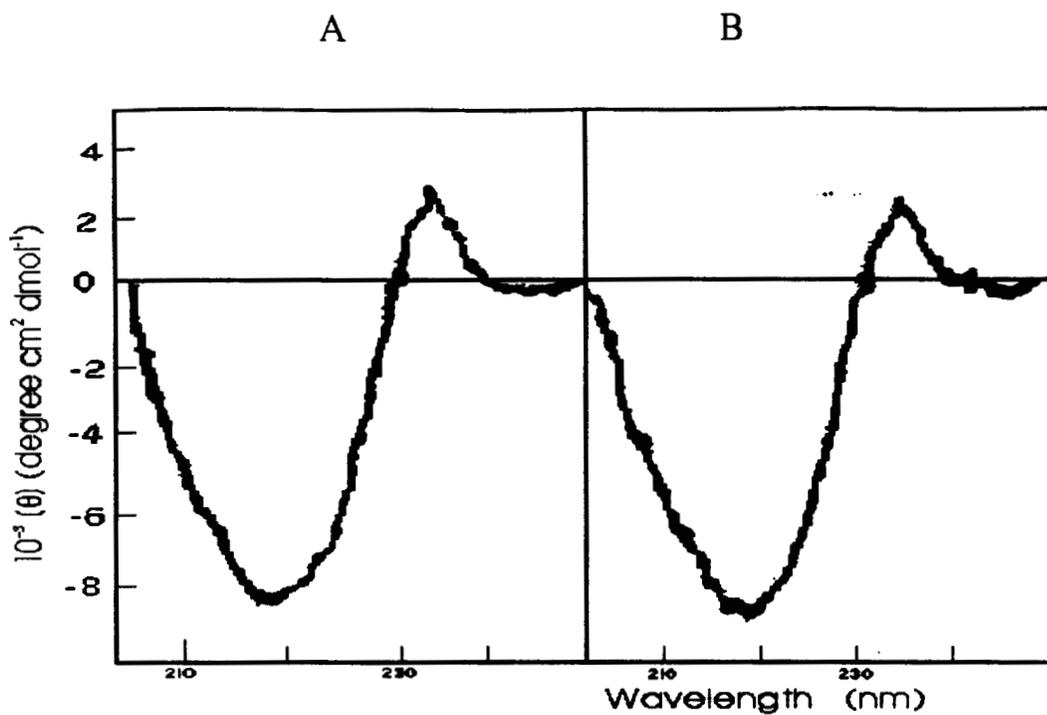


Figura 4. Espectros de dicroísmo circular de A) Invertasa glicosilada B) Invertasa no glicosilada. Reportados por Chu. F. K. y colaboradores²³.

METODOLOGIA

Microorganismo

Se utilizó la levadura *Kluyveromyces fragilis* CDBL-278 obtenida del cepario del Departamento de Biotecnología del CINVESTAV del IPN, la cual fue conservada en tubos con Agar Soya-tripticaseína (ST) y mantenida a 4°C. La invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* fue adquirida en forma comercial de Merck (México).

Producción de inulinasa

A) Medio de Cultivo

Para la producción de la enzima se utilizaron dos medios de cultivo:

i) Un medio definido que consistió de tres soluciones, a) (g/l) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ EDTA 0.1, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2.1 mg/l, H_3BO_3 2.8, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.08, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.024, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.00075, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.024: b) Pantotenato 800 $\mu\text{g/l}$, Tiamina 800 $\mu\text{g/l}$, Piridoxina 800 $\mu\text{g/l}$, Mesoinositol 800 $\mu\text{g/l}$, Ac. nicotínico 1 mg/l, Biotina 8 $\mu\text{g/l}$: c) Inulina al 1%. Las sales se esterilizaron 15 min a 15 lb/plg². Las vitaminas se esterilizaron por filtración en millipore 0.22 μm y la inulina se esterilizó 10 min a 10 lb/plg². El pH final se ajustó a 4.5 por la adición de HCl, 0.2 M.

ii) El otro medio de cultivo consistió de extracto de levadura 0.5% e inulina 1%, y se esterilizó 15 min a 15 lb/plg². El pH final también se ajustó a 4.5.

B) Fermentación

En matraces Erlenmeyer de 1 000 ml, se colocaron 500 ml de medio de cultivo y se inocularon con 0.1-0.15 mg de células provenientes de un cultivo de 18 h. La suspensión se incubó a 30°C en una incubadora rotatoria por 24-30 h. Las células fueron recuperadas en la fase exponencial, centrifugando a 10 000 rpm por 10 min a 4°C en una centrífuga refrigerada Sorvall, el sobrenadante fue desechado y el paquete celular se utilizó para la obtención de la enzima asociada a la pared.

Determinación de Biomasa

El crecimiento celular se determinó por peso seco, relacionando éste con la absorbancia por medio de una curva estandar realizada de la siguiente manera:

De un cultivo de células de *Kluyveromyces marxianus* crecidas en un medio de cultivo mínimo por 24 h, se tomaron por duplicado alícuotas de 0.25, 0.50, 1.0 1.5, 2.0 y 2.5 ml, se centrifugaron, se lavaron dos veces con solución salina al 0.85%; una de las alícuotas se usó para leer su absorbancia en un espectrofotómetro Spectronic 20 a 660 nm y la otra muestra fue filtrada a través de una membrana millipore de 0.22 micras previamente pesada en una balanza analítica Mettler H51AR. La membrana se mantuvo a 60 °C hasta obtener un peso constante. El peso de la masa celular se determinó por la diferencia del peso de la membrana seca conteniendo las células y el peso de la membrana al inicio, (Figura 5).

Extracción de la enzima

Para la liberación de la enzima inulinasa asociada a la pared celular, se utilizó una modificación del método reportado por GrootWassink²⁹. El paquete

celular se suspendió en una solución reguladora de fosfatos 0.3 M, pH 7 con cisteína 8 mM (1 ml de buffer por 100 mg de células). La suspensión se incubó a 50°C por 3 horas. Posteriormente, la suspensión se centrifugó por 10 min a 10 000 rpm, a 4°C en una centrifuga refrigerada Sorvall 3B. Al sobrenadante se le determinó la cantidad de proteína y la actividad enzimática y posteriormente se dializó en membranas de un límite de retención de 15 kDa contra un buffer de acetatos 0.01 M, pH 4.5, durante 48 h. La solución fue concentrada en un microconcentrador provisto de una membrana con límite de retención de 15 kDa hasta un volumen de 25 ml. Al final de este período se tomó una alícuota de 100 µl para cuantificar la proteína y la actividad enzimática.

Purificación de la enzima inulinasa

a) Cromatografía por filtración en gel.

El extracto crudo se purificó por filtración en gel usando una columna de 900 x 15 mm con gel de Agarosa (Biorad), con límites de exclusión de 10 a 500 kDa acoplada a un colector de fracciones Frac-100 (Pharmacia) equipado con un detector UV ajustado a 280 nm. La columna se estabilizó con una solución reguladora de acetatos 0.05 M, pH 4.5; el extracto crudo fue introducido a la columna y se eluyó con la misma solución; se colectaron fracciones de 6 ml y se les determinó su actividad enzimática. Las fracciones activas se concentraron y se sometieron a otra cromatografía por filtración en gel en las mismas condiciones.

b) Cromatografía por intercambio iónico

Las fracciones activas obtenidas de la segunda filtración en gel se juntaron, se concentraron a un cuarto del volumen inicial. La solución obtenida

se filtró a través de una membrana de 0.45µm (Millipore) y se pasó a través de una columna PD-10 equilibrada con un amortiguador de citratos 0.05M, pH 3.5. La enzima se purificó por cromatografía de líquidos de alta presión en un instrumento Varian 5 000 equipado con una columna de intercambio iónico TSK-SP5PW (0.75 x 7.5 cm), usando como eluyente el amortiguador de citratos a pH 3.5 y un gradiente salino de NaCl 0-300 mM en el mismo amortiguador.

Purificación de Invertasa

La invertasa se purificó de acuerdo a la metodología descrita para la purificación de la inulinasa, en la cual se usó un buffer de acetatos 0.2 M, pH 4.0, como eluyente en la cromatografía por filtración en gel, y un buffer de citratos 0.1 M a pH 3.0 como fase móvil en la cromatografía de líquidos de alta presión.

Caracterización y criterios de pureza

Determinación de proteína

La cantidad total de proteína fue determinada de acuerdo al método descrito por Lowry y colaboradores³⁰, utilizando albúmina sérica bovina como un estándar de concentración de proteína.

Determinación de azúcares reductores

Los azúcares reductores se determinaron por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), reportado por Miller, G.L.³¹.

Para la determinación de los azúcares se preparó una mezcla de reacción de manera que el volumen final de la mezcla fuera de 1.5 ml; cuando fue necesario el volumen se ajustó con la solución reguladora correspondiente. Se

adicionaron 3 ml del reactivo DNS y se calentaron las muestras a ebullición por 5 minutos. Posteriormente, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se llevó a un volumen final de 20 ml con agua destilada. Se agitó y se determinó su absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm. Se realizaron curvas estándar con glucosa y fructosa en cantidades de 100 a 1000 μg de cada uno de los carbohidratos (figuras 6 y 7).

Actividad enzimática

La actividad enzimática fue determinada por la aparición de azúcares reductores. La mezcla de reacción, conteniendo 1 ml de sustrato (inulina al 6%) en un amortiguador de acetatos pH 5.0, un equivalente a 100 μg de proteína y el volumen necesario de buffer para tener un volumen final de 1.5 ml, fue incubada por 30 min a 50°C; al término del tiempo, la reacción fue detenida por adición del reactivo (DNS) y se procedió a cuantificar los azúcares reductores liberados. Una Unidad Enzimática (U.E.) está definida como los μmoles de azúcares reductores liberados por mg de proteína por min ($\text{UE} = \mu\text{mol AR mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

El efecto del pH sobre la actividad enzimática de la inulinasa se determinó usando una solución de inulina al 6.0% disuelta en la solución amortiguadora apropiada para tener valores de pH desde 2.0 hasta 6.0 con incrementos de 0.5. A 1 ml de esta solución se le adicionó el equivalente a 100 μg de enzima y el volumen necesario de la solución reguladora correspondiente para obtener un volumen final de 1.5 ml; la reacción se detuvo por la adición del reactivo de DNS y se determinaron los azúcares reductores liberados.

El efecto de la temperatura se determinó con inulina al 6.0 % en una solución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH 4.5. A 100 μg de inulinasa se le adicionaron 1 ml de la solución de inulinasa y el volumen de solución

amortiguadora necesario para tener el volumen final de 1.5 ml, la solución resultante se incubó a 30, 50, 70 y 90 °C durante 5 y 10 minutos. La reacción se detuvo adicionando el reactivo DNS y se determinaron los azúcares reductores liberados.

La actividad enzimática de invertasa fue determinada también por la aparición de azúcares reductores, usando como sustrato una solución de sacarosa al 10 % en una solución amortiguadora de acetatos a pH 5.0. El procedimiento fue el mismo que el utilizado para determinar la actividad de inulinasa.

Determinación del contenido de carbohidratos

El contenido de carbohidratos de la inulinasa e invertasa se determinó por el método del fenol-sulfúrico reportado por Dubois³². Se tomaron alícuotas de 50 y 100 µl de solución enzimática, la cantidad de proteína se determinó usando $A_{280}^{\text{mg/ml}}=2.24$ para la inulinasa y $A_{280}^{\text{mg/ml}}= 2.17$ para la invertasa. La suspensión se colocó en un tubo de ensaye y se adicionó agua destilada para tener un volumen final de 1 ml; después se adicionaron 100 µl de fenol al 80 %. La suspensión anterior se mezcló vigorosamente con 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla final se dejó enfriar a temperatura ambiente y se determinó su absorbancia a 490 nm. Se hizo un blanco con 1 ml de agua destilada. La determinación del contenido de carbohidratos se hizo interpolando el valor de absorbancia obtenido de las soluciones enzimáticas sobre una curva estándar realizada con glucosa de 10 a 100 µg/ml, (Figura 8).

Determinación del peso molecular.

El peso molecular de la inulinasa e invertasa en su forma nativa, se determinó por filtración en gel en una columna de Agarosa con límites de

exclusión de 10 a 500 kDa estabilizada con una solución de acetatos 0.05 M, pH 4.5. La columna se calibró con los siguientes estándares de peso molecular: mioglobina (Sigma), Mr 16900; ovoalbúmina (Sigma), Mr 43000; albúmina (Sigma), Mr 67000; β -amilasa (Sigma), Mr 220000 y apoferritina (Sigma), Mr 443000. Los estándares y las soluciones enzimáticas se eluyeron con la misma solución amortiguadora.

Punto isoeléctrico

El punto isoeléctrico se determinó en un equipo PhastSystem de Pharmacia, según el método indicado en el manual del fabricante, usando placas comerciales de poliacrilamida de dimensiones, 0.45 X 43 X 50 mm con un gradiente de pH 4-6.5, a 2 000 V, 20 mA y 15°C. Se usaron los siguientes marcadores de pI: amyloglucosidasa, pI 3.5; glucosa oxidasa, pI 4.15; inhibidor de tripsina de frijol de soya, pI 4.55; β -lactoglobulina A, pI 5.2; anhidrasa carbónica bovina B, pI 5.85; y anhidrasa carbónica humana B, pI 6.55. Las proteínas se fijaron, tiñeron y destiñeron de acuerdo al método reportado por Neuhoff y colaboradores³⁴

Electroforesis en SDS

La electroforesis se realizó en una placa en gel homogéneo de poliacrilamida de las dimensiones descritas para el pI, en presencia de dodecilsulfato de sodio, en el equipo descrito para el punto isoeléctrico, a 15°C, 0.5 W, 50 V y 0.1 mA. 100 μ l de solución enzimática se colocaron en un tubo Eppendorf y se le adicionaron 100 μ l de una solución de dodecilsulfato de sodio al 2.5% y β -mercaptoetanol al 5.0%; la solución resultante se calentó a 100 °C durante 5 minutos. Se usaron los siguientes estándares de calibración: α -lactoalbúmina, Mr 14 400; Inhibidor de tripsina, Mr 20 100; Anhidrasa

carbónica, Mr 30 000; Ovoalbúmina, Mr 43 000; Albúmina, Mr 67 000; y Fosforilasa b, Mr 94 000. La tinción de las proteínas se realizó de igual manera que para el punto isoeléctrico.

Coefficiente específico de extinción.

La determinación del coeficiente de extinción para la inulinasa se realizó por tres métodos: peso seco, por medio de la ecuación de Scopes³⁵ y a partir de la composición de aminoácidos, usando el método reportado por Stanley³⁶.

La determinación del coeficiente de extinción por peso seco, se realizó en pesafiltros los cuales se pusieron a peso constante a 60 °C, se adicionó un mililitro de solución proteínica al cual previamente se le determinó su absorbancia a 280 nm y los pesafiltros se pusieron a 60 °C hasta peso constante. El peso de la proteína se determinó por la diferencia de los pesos final e inicial.

Para la determinación del coeficiente por diferencia de absorbancias, se tomó un mililitro de solución enzimática y se le determinó su absorbancia a 280 nm, posteriormente se realizó una dilución 1 a 50 y se determinó su absorbancia a 205 nm, los resultados se sometieron a la ecuación de Scopes.

El coeficiente de extinción a partir de la composición de aminoácidos (tirosina, triptofano y cisteína) fue determinado con 1 ml de solución de inulinasa al que se le determinó su absorbancia a 280 nm, posteriormente se desnaturalizó en una solución de clorhidrato de guanidina 6 M y se determinó su absorbancia nuevamente a la longitud antes mencionada. Para la determinación del $E_{280}^{mg/ml}$ se usó el peso molecular de 59 672 reportado por Laloux y colaboradores¹⁸.

Para la invertasa el coeficiente de extinción se calculó a partir de la composición de aminoácidos reportada por Taussig y colaboradores, aplicando

el método reportado por Stanley³⁶, usando la misma metodología que para la inulinasa.

Dicroísmo Circular

Los espectros de dicroísmo circular (D.C.), se obtuvieron a 25 °C en un espectropolarímetro Jasco J-500A calibrado con ácido (+)-10-camforsulfónico (10). Los registros se realizaron en la región del UV lejano (185-240 nm) usando una celda de 0.1 cm de recorrido óptico y una concentración de proteína de 0.1 a 0.2 mg/ml. La concentración de proteína se determinó utilizando $A_{280}^{mg/ml} = 2.24$ para la inulinasa y $A_{280}^{mg/ml} = 2.17$ para la invertasa (ambos valores determinados en este trabajo). Los valores de D.C. se reportan como elipticidad residual promedio $[\theta]_{m.r.w}$, la cual se calculó utilizando un valor promedio de peso molecular por residuo de 112 para la inulinasa y de 114 para la invertasa.

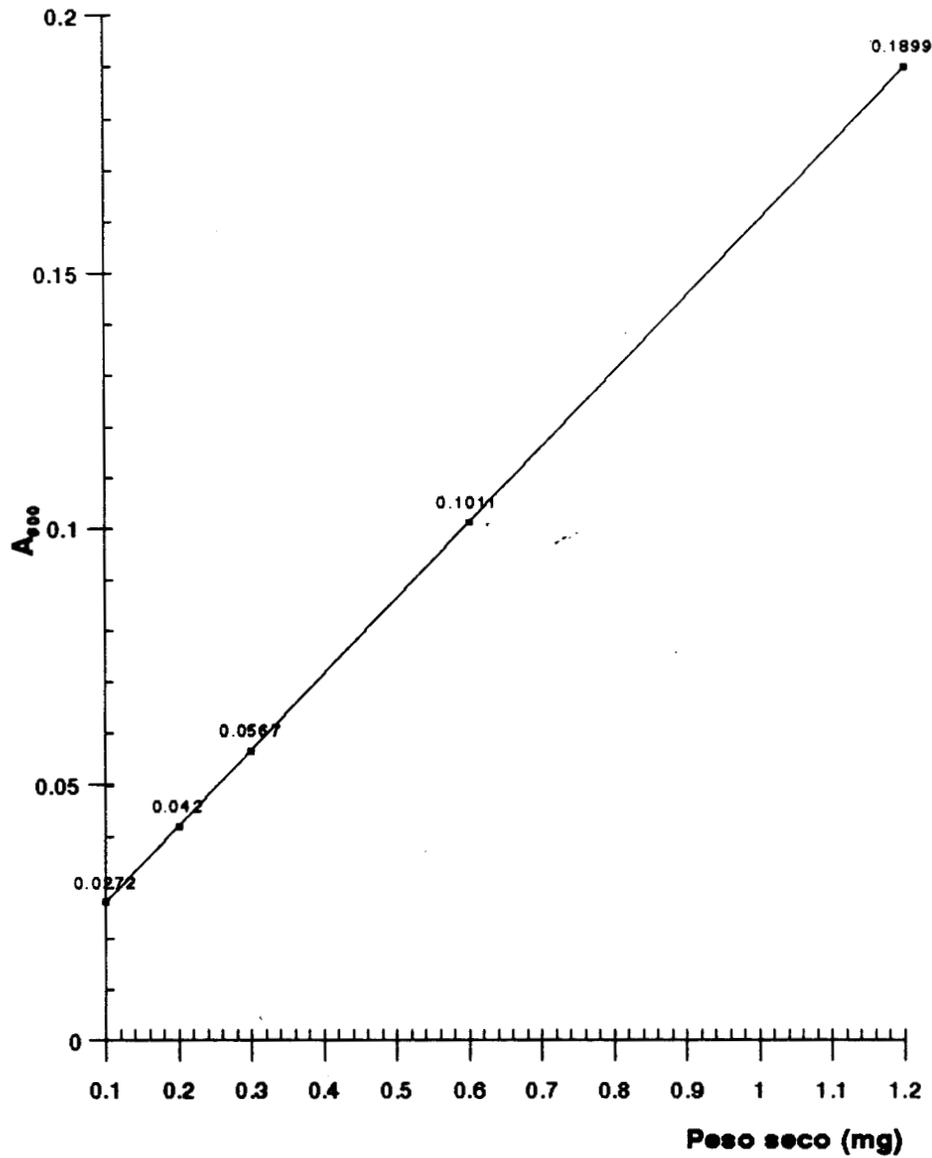


Figura 5. Curva de relación entre absorbancia y peso seco de *Kluyveromices fragilis* CDBL-278 para la determinación de biomasa.

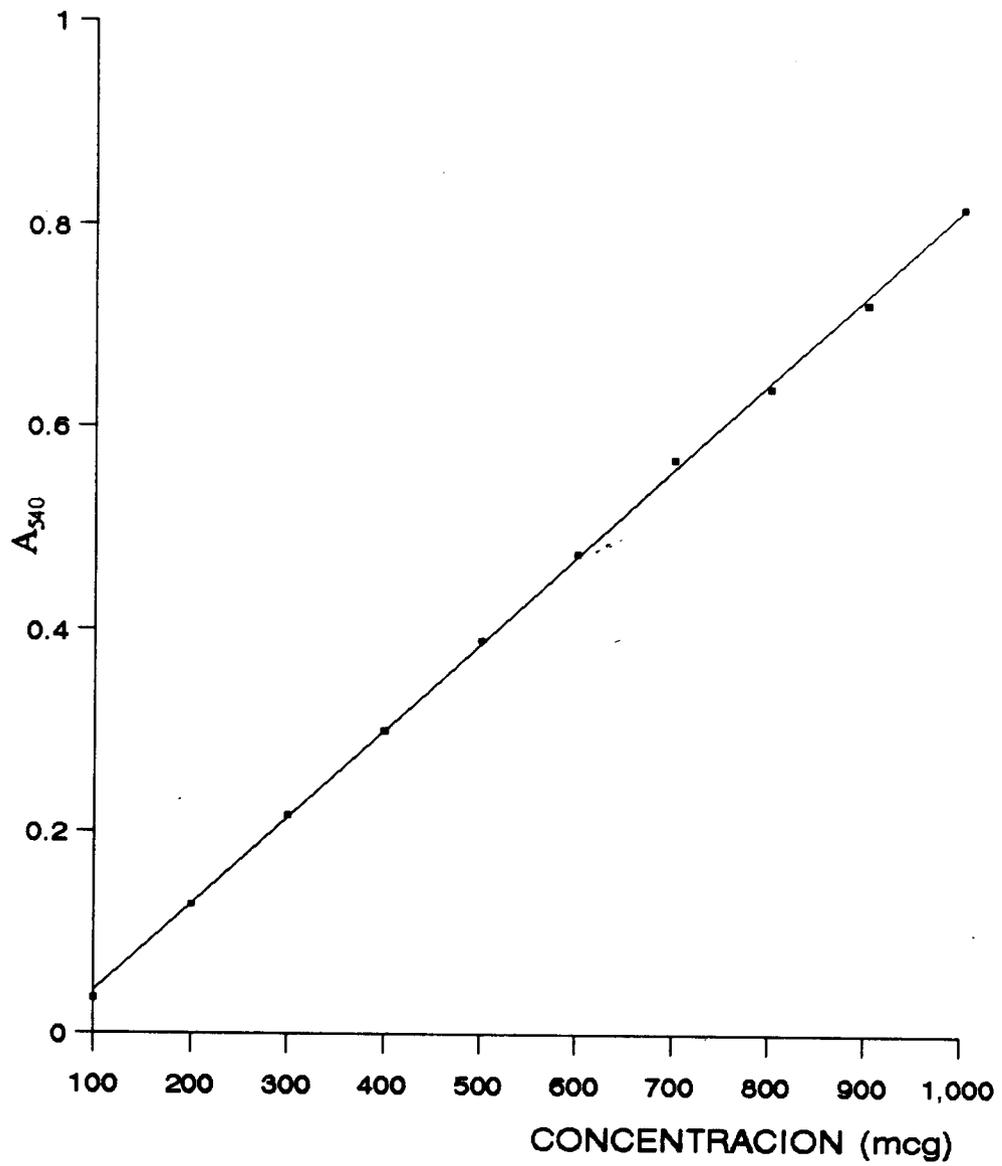


Figura 6. Curva estandar para la determinación de azúcares reductores con glucosa como estandar

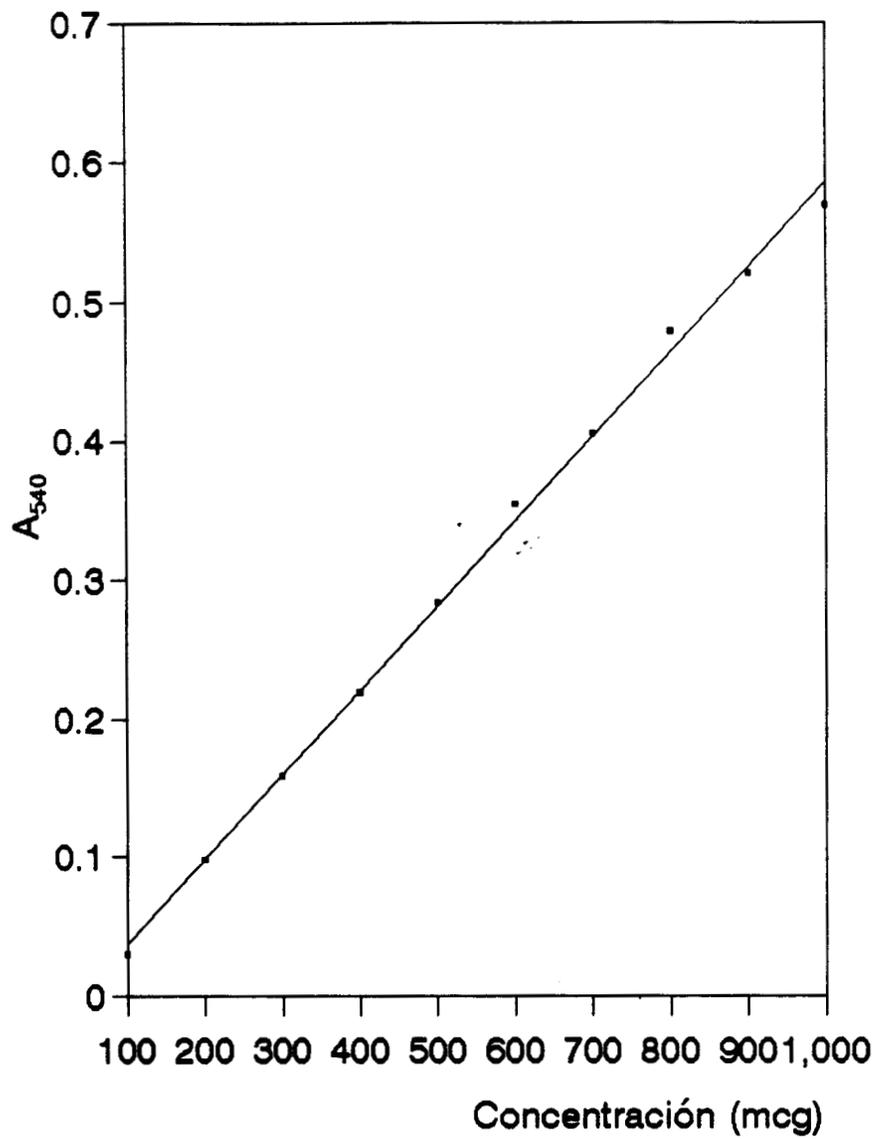


Figura 7. Curva estandar para la determinación de azúcares reductores usando fructosa como estandar

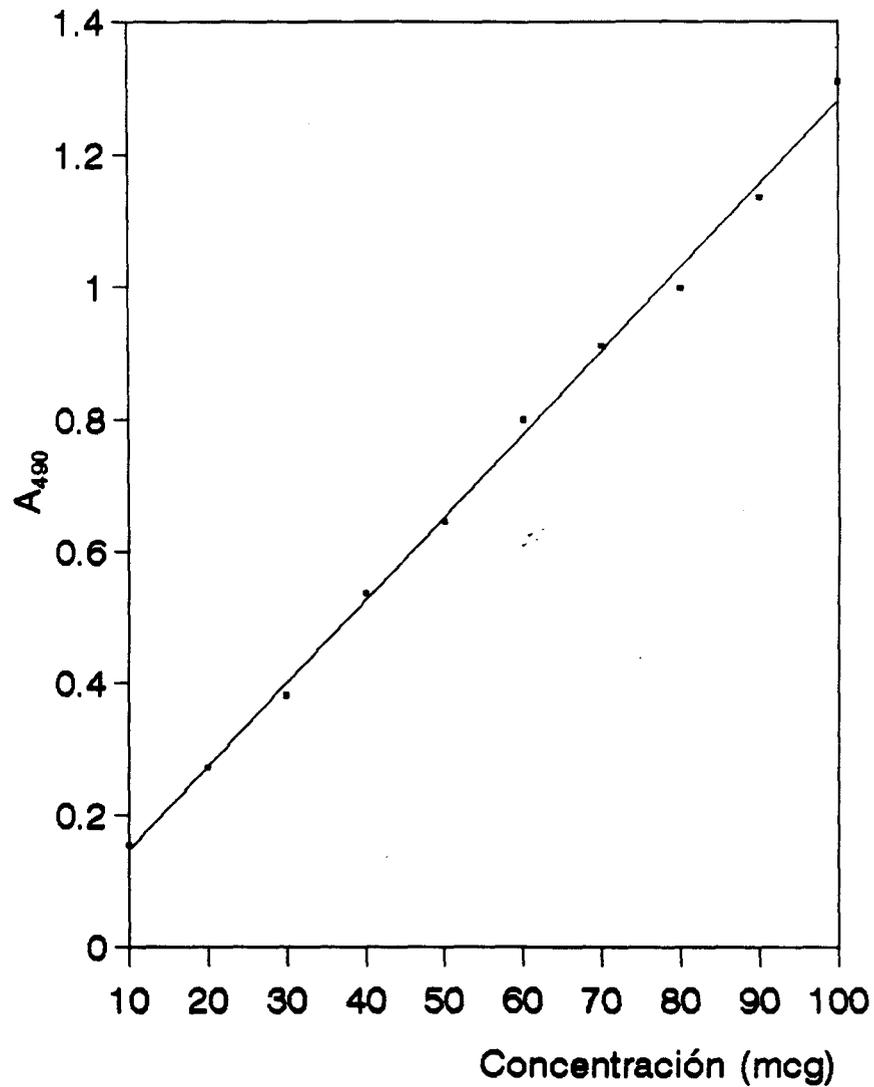


Figura 8. Curva estandar para la determinación del contenido de carbohidratos de las proteínas inulinasa e invertasa realizada por el método fenol-sulfúrico³³, con glucosa como estandar

RESULTADOS Y DISCUSION

La inulinasa de *K. fragilis* es una enzima que se excreta en gran cantidad en el medio de cultivo; sin embargo, para el desarrollo experimental se decidió usar la enzima asociada a pared, considerando que la liberación de la enzima permite tener una menor mezcla de proteínas, además de que se ha determinado que las estructuras primarias de ambas proteínas son idénticas, por lo que sería indistinto, en principio, determinar el espectro de dicroísmo circular de la enzima asociada a la pared o de la enzima excretada.

Los resultados obtenidos de las fermentaciones realizadas con los dos medios de cultivo se muestran en la tabla V, en la cual se puede observar que no hay diferencias significativas en la producción de la enzima inulinasa asociada a la pared al usar uno u otro medio de cultivo. Para la realización del presente trabajo se decidió usar el medio de cultivo constituido por inulina al 1 % y extracto de levadura al 0.5 %, por representar éste un costo menor y un medio rápido de preparar.

En la tabla V también se presenta la cantidad total de proteína liberada de la pared celular, la cual es mucho menor que la proteína secretada al medio de cultivo, lo cual es indicativo de que este tipo de enzima es excretada principalmente. En esta tabla también se puede observar que el método de liberación de la enzima asociada a la pared celular fue satisfactorio, ya que la actividad de la enzima inulinasa determinada en las células (actividad residual), es despreciable.

El total de proteína obtenida después de liberar la enzima, dializarla contra una solución reguladora de acetatos 0.1 M, pH 4.5, y concentrarla fue de 425 mg en un volumen total de 25 ml, esta preparación se consideró como el extracto crudo.

Para la filtración en gel se introdujeron a la columna volúmenes de 15 ml de solución enzimática con un contenido de proteína de aproximadamente 2 mg/ml. El patrón de elución del extracto crudo de inulinasa se presenta en la figura 9, en la que se observa la presencia de 2 picos importantes que presentan un hombro menor, obtenidos en 24 fracciones de 6 ml cada una; de éstas, sólo 9 presentaron actividad de inulinasa a las condiciones anteriormente descritas. Las fracciones con actividad de inulinasa se mezclaron y se concentraron, obteniéndose una recuperación de proteína con actividad de inulinasa del 30% (127.5 mg). Se procedió a realizar una segunda filtración, ya que como se mencionó anteriormente, en la figura 9 podemos observar que las fracciones activas forman parte de un pico mayor el cual probablemente contaminó a las fracciones activas. Los resultados de la segunda filtración se observan en la figura 10. Se puede observar que el patrón de elución de las fracciones activas, muestra sólo un pico formado por 6 fracciones de 6 ml cada una, el cual mostró poseer actividad de inulinasa. La recuperación de proteína de la segunda filtración fue del 75.3 % (96 mg). Las fracciones obtenidas se concentraron y se filtraron a través de una membrana de 45 μ m

La enzima semipurificada se sometió a un cambio de pH por medio de una columna PD-10 estabilizada con una solución reguladora de acetatos 0.1 M, pH 3.5. Pruebas realizadas con anterioridad demostraron que la inulinasa congelada durante 15 días en esta solución amortiguadora no perdió notoriamente la actividad enzimática, por lo que estas condiciones se usaron para la purificación por intercambio iónico en el cromatógrafo de líquidos de alta presión.

La columna de intercambio iónico acoplada al cromatógrafo de líquidos de alta presión, se lavó y estabilizó con la solución reguladora de acetatos 0.1 M, pH 3.5, por 12 horas y posteriormente se introdujeron volúmenes de 1 ml de

suspensión enzimática con una concentración de proteína de 1.5 mg/ml. Los resultados se presentan en la figura 11. En esta figura se puede observar un pico mayoritario, el cual presentó actividad enzimática; la recuperación total de la enzima fue del 60 % (34 mg) la fracción activa se concentró hasta obtener una concentración de aproximadamente 1.4 mg/ml de proteína y se determinó el grado de pureza por análisis del pI figura 14 (línea 4) y por electroforesis en presencia de SDS, (figura 12, líneas 2 y 4).

Los resultados de la determinación del pI mostraron únicamente una banda dispersa entre 3.5 y 4.55 para la inulinasa de *K. fragilis*. La dispersión de la banda es atribuida al efecto de la presencia del alto contenido de carbohidratos que se reportan para esta clase de enzimas. El resultado obtenido para esta enzima, es similar al reportado por Workman⁶, quien encontró un pI para la inulinasa de *K. fragilis* de 4.0.

Los resultados de la electroforesis (figura 12), en presencia de SDS muestran una sola banda, lo cual permite suponer que la enzima se purificó a homogeneidad.

Para la purificación de la invertasa se pesaron 150 mg del polvo comercial y se disolvieron en 25 ml de una solución reguladora de acetatos 0.1M pH 5.0. La solución se filtró a través de una membrana millipore de 0.22 μm , la solución filtrada se sometió a la cromatografía por filtración en gel usando la misma solución reguladora como eluyente, los resultados se muestran en la figura 15. El patrón de elución de la invertasa por filtración en gel muestra un solo pico compuesto de 7 fracciones, las cuales mostraron actividad enzimática sobre la sacarosa. Las fracciones activas se juntaron y el volumen obtenido se concentró a 20 ml, este volumen se pasó a través de una columna PD-10 estabilizada con un buffer de citratos 0.05 M pH 2.5. La recuperación de la invertasa fue de 23.7 mg.

La invertasa sometida a cromatografía por intercambio catiónico, mostró un solo pico, el cual mostró tener actividad de invertasa, figura 16. La fracción se concentró y también se analizó por determinación del pI (figura 14, línea 2), y por electroforesis en presencia de dodecilsulfato de sodio (figura 13, líneas 2, 4 y 6), en ambos casos se observó la migración de una sola banda.

El valor del pI determinado para la invertasa de *S. cerevisiae*, se encuentra entre 3.9 y 5.00, (figura 14, línea 2). La gran dispersión que presenta esta banda entre los valores indicados anteriormente, es atribuida, como en el caso de la inulinasa, al alto contenido de carbohidratos. El pI para la invertasa externa de *S. cerevisiae* reportado por Tammi y colaboradores²⁷ es de 4.5, resultado que se encuentra dentro de los valores determinados en este trabajo.

Se encontró un contenido de carbohidratos para la inulinasa de *K. fragilis* de aproximadamente 33 ± 0.3 %, resultado que es el promedio de 4 determinaciones y que concuerda con los valores reportados por Rouwenhorst y colaboradores², quienes determinaron un contenido de carbohidratos del 34 % para la inulinasa de *K. marxianus*. El contenido del 33 % de carbohidratos calculado en este trabajo se obtuvo al considerar $A_{280}^{mg/ml} = 2.24$.

Un contenido de carbohidratos del 50 ± 3.0 % fue encontrado para la invertasa de *S. cerevisiae*, considerando $A_{280}^{mg/ml} = 2.17$, este contenido de carbohidratos para la invertasa de *S. cerevisiae* ha sido determinado por Tammi²⁷, Williams²⁸, y otros autores.

La electroforesis en SDS mostró la migración de una sola banda difusa entre 83 y 97 kDa, para la inulinasa de *K. fragilis* (figura 17). Resultados que son aproximados a los obtenidos por Rowenhorst¹⁶, el cual determinó la migración de la bandas correspondientes a la enzima secretada y a la retenida en la pared celular, entre 87 y 102 kDa. Los resultados anteriores permiten suponer que la enzima inulinasa retenida en la pared celular está formada por

subunidades idénticas, puesto que no se determinaron bandas diferentes en los análisis de punto isoelectrico y de electroforesis en presencia de dodecil sulfato de sodio, como ha sido reportado por Rouwenhorst y colaboradores¹⁷.

Considerando que la determinación del contenido de carbohidratos para la inulinasa fue del 33 %, se estima un peso molecular por subunidad para la parte proteica de esta enzima, entre 56 y 62 kDa. Laloux y colaboradores¹⁸ reportan un peso molecular de 59 672 para la enzima madura de la pared celular, ya que ellos proponen que la enzima sufre una proteólisis posterior a su secreción.

Por filtración en gel se determinó un peso molecular para la inulinasa en estado nativo de aproximadamente 3.8×10^5 Da (figura 13), resultado que sugiere que la enzima asociada a la pared de *K. fragilis* consiste de un tetrámero en estas condiciones, lo cual coincide con lo reportado por Rowenhorst³, el cual sugiere que la enzima asociada a la pared consta de cuatro subunidades idénticas y considera un peso molecular por subunidad de 87 a 102 kDa.

El peso molecular de la invertasa nativa por filtración en gel no pudo ser calculado a las condiciones de trabajo reportadas ya que los límites de exclusión del gel usado (10 a 500 kDa) no lo permitieron; sin embargo el peso molecular de la enzima nativa debe ser mayor de 500 kDa, por lo que se puede suponer que la enzima se encuentra en un alto grado de oligomerización a estas condiciones.

Los resultados de la electroforesis en SDS de la invertasa de *S. cerevisiae* muestran una banda dispersa entre 100 y 120 kDa (figura 13). Tomando en cuenta que el contenido de carbohidratos determinado fue del 50 %, se determinó un peso molecular para la parte proteica de aproximadamente 50-60 kDa por subunidad, resultado que es comparable al determinado por Tammi y

colaboradores²⁷ de 58 480, calculado para un total de 512 residuos de aminoácido por subunidad

Se encontró un $A_{280}^{\text{mg/ml}} = 1.57 \pm$ un error estándar del 10 % para la inulinasa de *K. fragilis* por medio de peso seco, este resultado es el promedio de tres determinaciones, considerando un contenido de carbohidratos del 33%, el coeficiente de extinción se calculó para un valor de $A_{280}^{\text{mg/ml}} = 2.24$. La determinación se realizó por triplicado con tres muestras cada una.

El método de Scopes dió como resultado un $A_{280}^{\text{mg/ml}} = 1.27$; sin embargo este método parece ser menos preciso ya que se obtuvo una variación del 15 %.

El coeficiente de extinción molar para la inulinasa, determinado a partir de la secuencia de aminoácidos reportada por Laloux y colaboradores, es de $E_M^{280} = 126\ 430$. Considerando un peso molecular por subunidad de 59 672 Da se calculó un $A_{280}^{\text{mg/ml}} = 2.12$, valor que es similar al determinado por peso seco. Considerando el 33 % de carbohidratos en peso y los valores obtenidos por el método de desnaturalización en clorhidrato de guanidina, se obtuvo como resultado un valor de $A_{280}^{\text{mg/ml}} = 2.28$, resultado que fué usado para la determinación de la cantidad de proteína presente para los diferentes metodos de caracterización.

El coeficiente molar determinado para la invertasa a partir de la secuencia de aminoácidos dió un valor de 130 960, el cual considerando un peso molecular de 58 630 Da dió un valor de $A_{280}^{\text{mg/ml}} = 2.23$. Usando el método de desnaturalización y el contenido de aminoácidos el valor obtenido fue de $A_{280}^{\text{mg/ml}} = 2.17$, valor que es aproximado al determinado por Trimble²² quien reporta un $A_{280}^{\text{mg/ml}} = 2.25$ para la invertasa de *S. cerevisiae*.

Los resultados del proceso de purificación sobre la actividad enzimática de la inulinasa de *K. fragilis* CDBL-278 y de la invertasa de *S. cerevisiae* se presentan en la tabla VI. En esta tabla se observa un incremento de la actividad

específica desde 48 hasta 1200 U.E. para la inulinasa y desde 481 hasta 2 031.16 U.E. para la invertasa, el incremento en la actividad específica de la inulinasa también ha sido reportado por Grootwasink¹², quien encontró un aumento de la actividad desde 450 U.E. hasta 2678 U.E. durante la purificación de la inulinasa de *K. fragilis*.

Se determinó una relación S/I para la inulinasa de 8.5 (pH 4.5, 50 °C), resultado que de acuerdo a lo reportado por diferentes autores permite hacer la diferenciación entre la inulinasa y la invertasa. Se ha aceptado que valores menores de 50 para la relación S/I son indicativos de la actividad de inulinasa y que para diferenciar la actividad de invertasa el valor de esta relación debe ser mayor de 1 200³. Rouwenhorst¹⁷, ha reportado valores de la relación S/I para la inulinasa de *K. marxianus* de 13 y de 15 dependiendo del grado y método de purificación; Workman y Day¹⁶ reportan valores de S/I para la inulinasa de *K. fragilis* de 26 y Grootwasink y colaboradores¹² reportan un valor de 10.5 para esta relación. Es notoria la diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo y los reportados por estos autores; sin embargo, como se menciona al inicio de este trabajo, este método de diferenciación depende de las condiciones en las que se determine la actividad enzimática.

El valor de la relación S/I determinado para la invertasa fue de 2 800, a las mismas condiciones en que se determinó la relación S/I para la inulinasa, es de hacer notar que la determinación de azúcares reductores se realizó a los 5 minutos de incubación del sustrato con la enzima y que a este tiempo la actividad enzimática de la invertasa sobre la inulina fue menor a 1 U.E.

Los resultados de la determinación del efecto del pH y temperatura sobre la actividad enzimática de la inulinasa de *K. marxianus* en inulina como sustrato, se presentan en las figuras 18 y 19 respectivamente. Se determinó que la enzima es estable a pH de 3.5 a 6.0, condiciones a las cuales puede ser

congelada durante 1 mes sin pérdida notoria de la actividad enzimática. También se encontró que la temperatura a la cual se presenta una mayor actividad enzimática es de 50 °C y que arriba o abajo de esta temperatura la actividad se ve disminuida, encontrándose que arriba de 70 °C se observa la liberación de azúcares reductores del sustrato, lo cual es atribuible a la degradación química de la inulina que es fácilmente hidrolizada en estas condiciones¹⁹.

Para la inulinasa se determinaron valores aparentes de $K_m = 5.7$ mM y $V_{max} = 5.9$ U/mg a pH 4.5 y 50 °C sobre inulina como sustrato. El valor de K_m determinado es menor que los valores reportados por Vandamme y colaboradores³ para la inulinasa de *K. fragilis* que son de 8.00 y 7.4. Sin embargo, debido a la baja solubilidad del sustrato se llegó a una máxima concentración de 6.0 %, ya que a concentraciones mayores es necesario calentar arriba de 60 °C y la inulina es hidrolizada espontáneamente a estas condiciones. Debido a lo anterior los valores obtenidos de K_m y V_{max} no se pueden tomar como valores exactos de estos parámetros. Los cálculos se realizaron en base a un peso molecular de 5 400 Da para la inulina.

Los espectros de dicroísmo circular registrados de la invertasa y de la inulinasa se presentan en las figuras 20 y 21 respectivamente. Ambas curvas fueron registradas a pH 7.01 en una solución amortiguadora de fosfatos y 25 °C.

Para el registro de la inulinasa se usó una concentración de proteína de 0.104 mg/ml y para la invertasa de 0.11 mg/ml, calculados a partir de los coeficientes de extinción determinados en este trabajo. Los espectros se registraron en la región del UV lejano (190-250 nm), las señales de dicroísmo circular de una proteína en esta región, se deben principalmente a su estructura secundaria^{38,39}. En las figuras mencionadas se puede observar que existe una

gran semejanza entre los espectros registrados, que las características generales de ambos espectros son típicas de proteínas con un alto contenido de hoja β y con poca contribución de de α -hélice³⁸.

Las características principales del espectro de dicroísmo circular registrado para la inulinasa de *K. fragilis* (figura 21); son una banda positiva, con un máximo a 194 nm y una banda ancha negativa, con un máximo a 216 nm con intensidades de 11 000 y 10 000 grados $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ respectivamente.

El espectro de dicroísmo circular de la invertasa de *S. cerevisiae* muestra también dos bandas, una positiva con un máximo a 194 nm y una banda ancha negativa con un máximo a 214 nm, con intensidades de 8 300 y 7 200 grados $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ respectivamente.

La similitud entre los espectros de dicroísmo circular registrados experimentalmente, puede en principio ser atribuída a que la invertasa de *S. cerevisiae* y la inulinasa de *K. marxianus* presentan un 68 % de de conservación en la secuencia de aminoácidos y a que en solución, ambas enzimas presenten patrones de plegamiento similares; sin embargo, a pesar de la gran similitud, se puede observar en estas figuras que la diferencia principal entre los dos espectros es la intensidad de las bandas, diferencia que puede atribuirse al contenido de carbohidratos, al medio ambiente en el que se encuentren algunos residuos aromáticos, o a la presencia de enlaces disulfuro; aunque, en ambos espectros se presentan los máximos correspondientes (positivo y negativo) a longitudes de onda muy cercanas.

Para la estimación del contenido de estructura secundaria tanto de la inulinasa como de la invertasa, se utilizó el método LINCMB reportado por Perczel⁴⁰. Se decidió usar este método debido a que éste utiliza en su base de datos espectros de dicroísmo circular de proteínas con un alto contenido de hoja β , como pepsinógeno, inmunoglobulina C, concavalina A, etc.

Con los resultados obtenidos de este método de análisis se reconstruyeron las curvas que también se muestran en las figuras 20 y 21, las cuales reproducen los espectros determinados experimentalmente con un error promedio para cada punto de 580 grados $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ para la inulinasa y de 380 grados $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ para la invertasa.

El contenido de estructura secundaria de ambas enzimas se muestra en las tablas VII y VIII en las que se observa que la mayor contribución en ambas proteínas esta dada por la conformación de hoja- β , encontrando en ambos casos una contribución muy pequeña de helices en la estructura secundaria de esta enzimas. Es también notoria la contribución de grupos no peptídicos (grupos aromáticos y enlaces disulfuro).

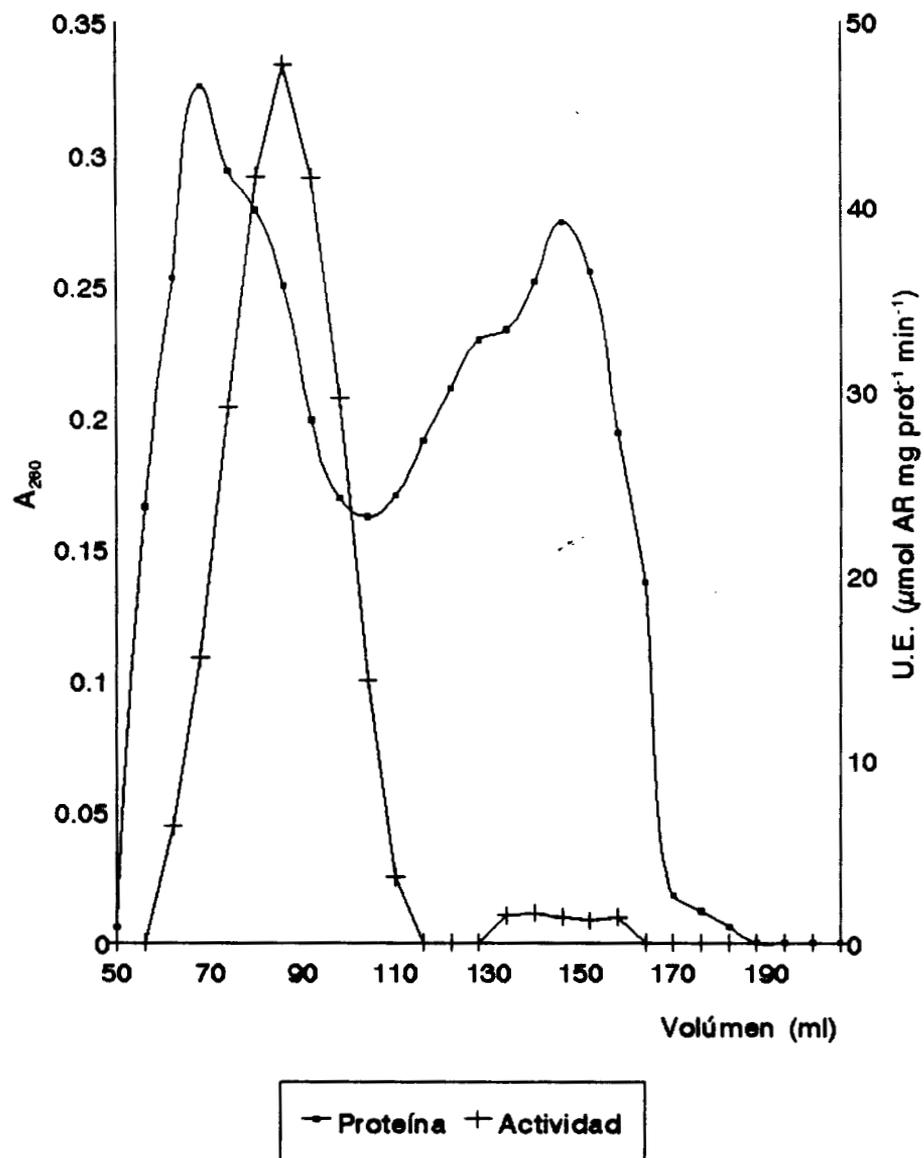


Fig. 9 Patrón de elución del extracto crudo de la inulinasa de *K. marxianus* por filtración en gel en una columna de agarosa eluída con una solución reguladora de acetatos 0.1 M, pH 4.5

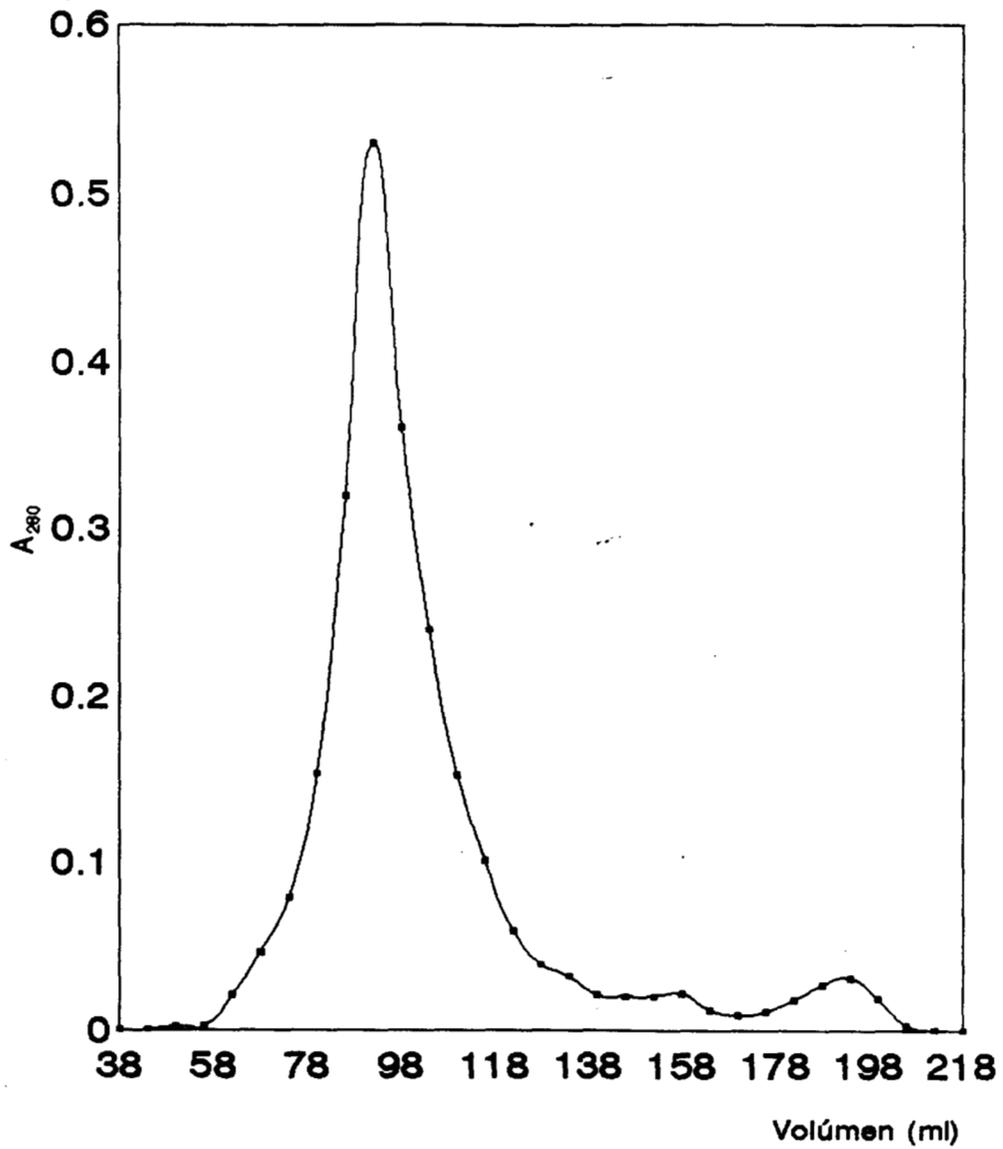


Fig.10 Patrón de elución de la fracciones activas de la primera filtración en gel (pH 4.5 en regulador de acetatos 0.1 M) de la inulinasa de *K.fragilis*

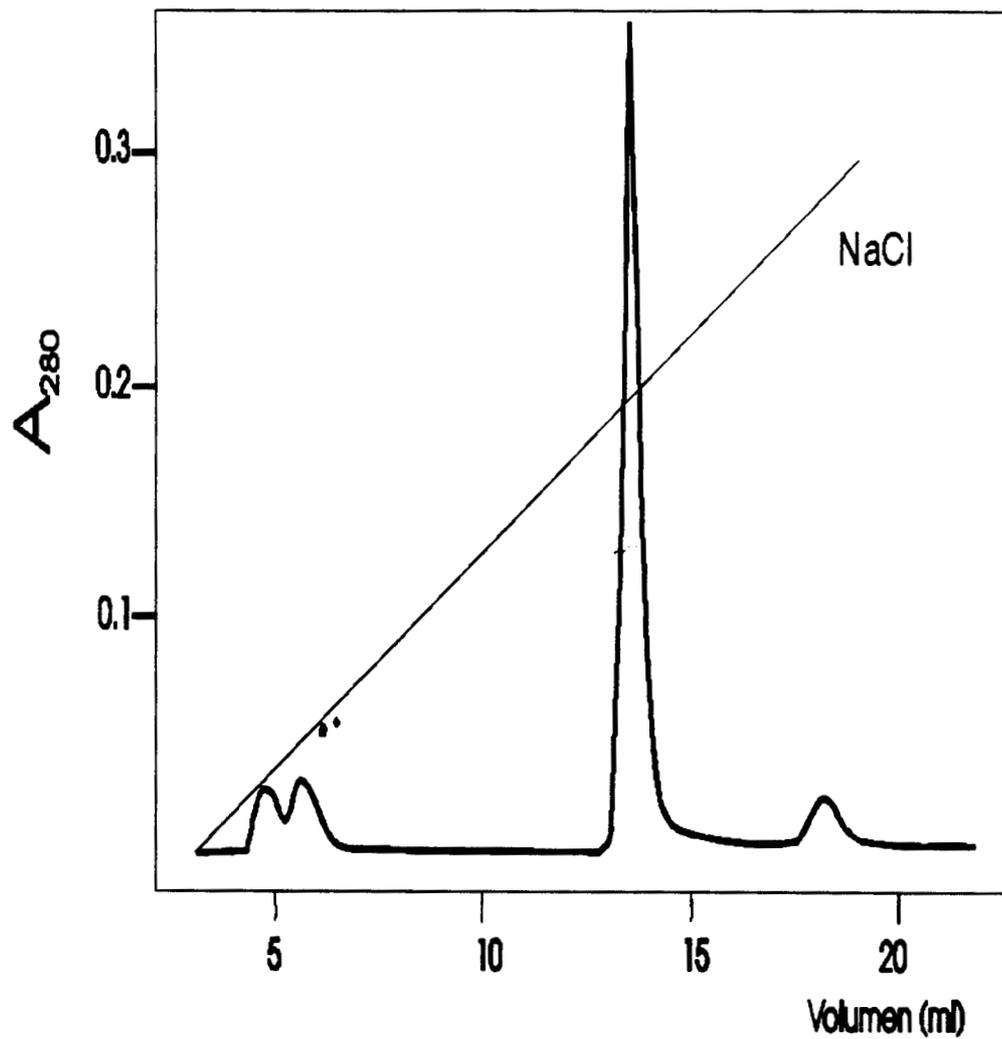


Fig. 11. Patrón de elución de la inulinasa de *K. fragilis* por intercambio iónico en columna TSK-5PW con una solución reguladora de citratos 0.05 M, pH 3.5 y un gradiente salino de NaCl 0-0.5 M

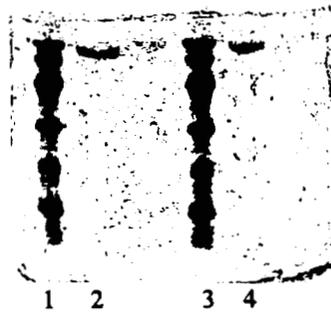


Figura 12. Resultados de la electroforesis en presencia de SDS de la inulinasa asociada a la pared de *Kluyveromyces fragilis* CDBL-278, (líneas 2 y 4). Las líneas 1 y 3 pertenecen a los marcadores de peso molecular usados (ver texto).

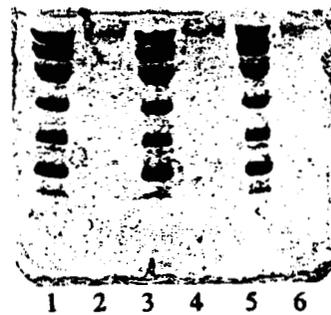
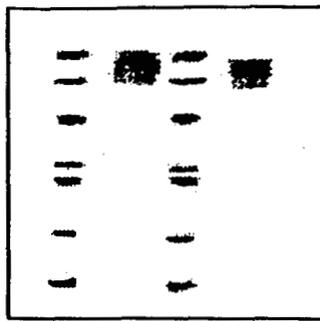


Figura 13. Resultados de la electroforésis en presencia de SDS de la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*, (líneas 2, 4 y 6). Las líneas 1, 3 y 5 pertenecen a los estándares de peso molecular usados (ver texto).



1 2 3 4

Figura 14. Resultados de la determinación del pI de la invertasa (línea 2) y de la inulinasa (línea 4). Las líneas 1 y 3 pertenecen a los diferentes marcadores de pI usados. (Ver texto)

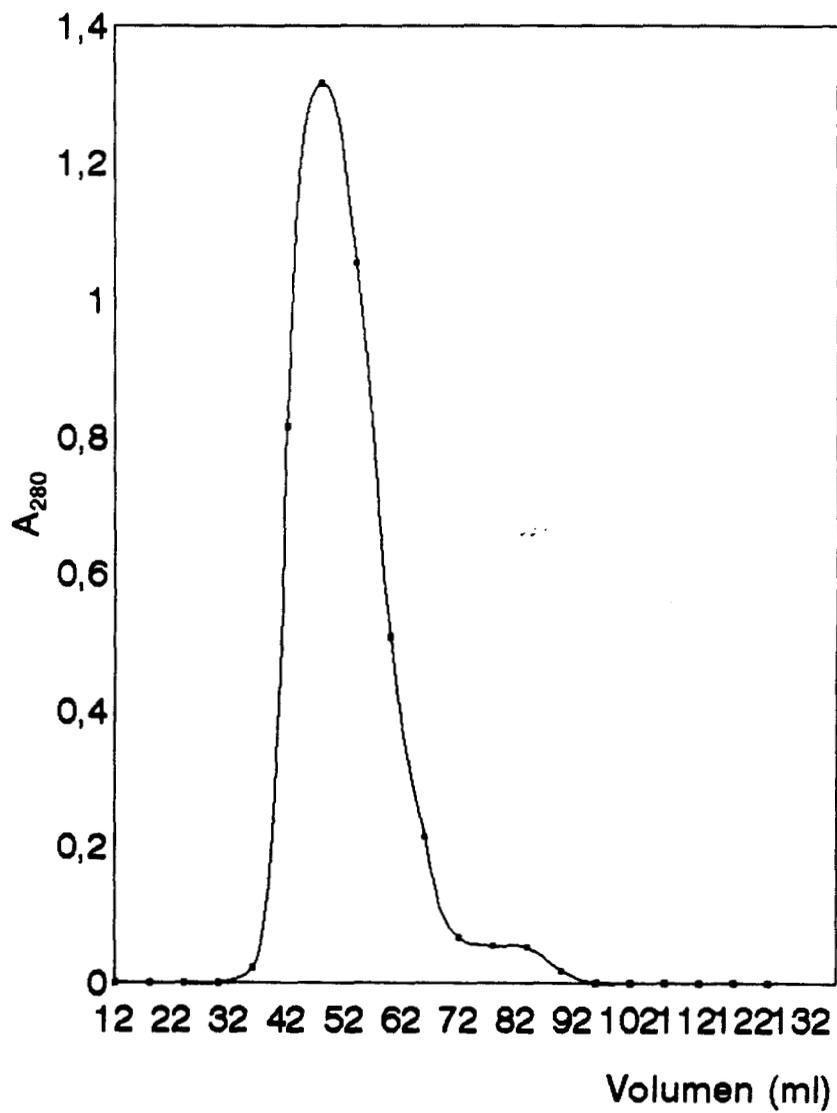


Fig. 15 Patrón de elución de la invertasa de *S. cerevisiae* en una columna de agarosa y eluida con una solución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH 5.0

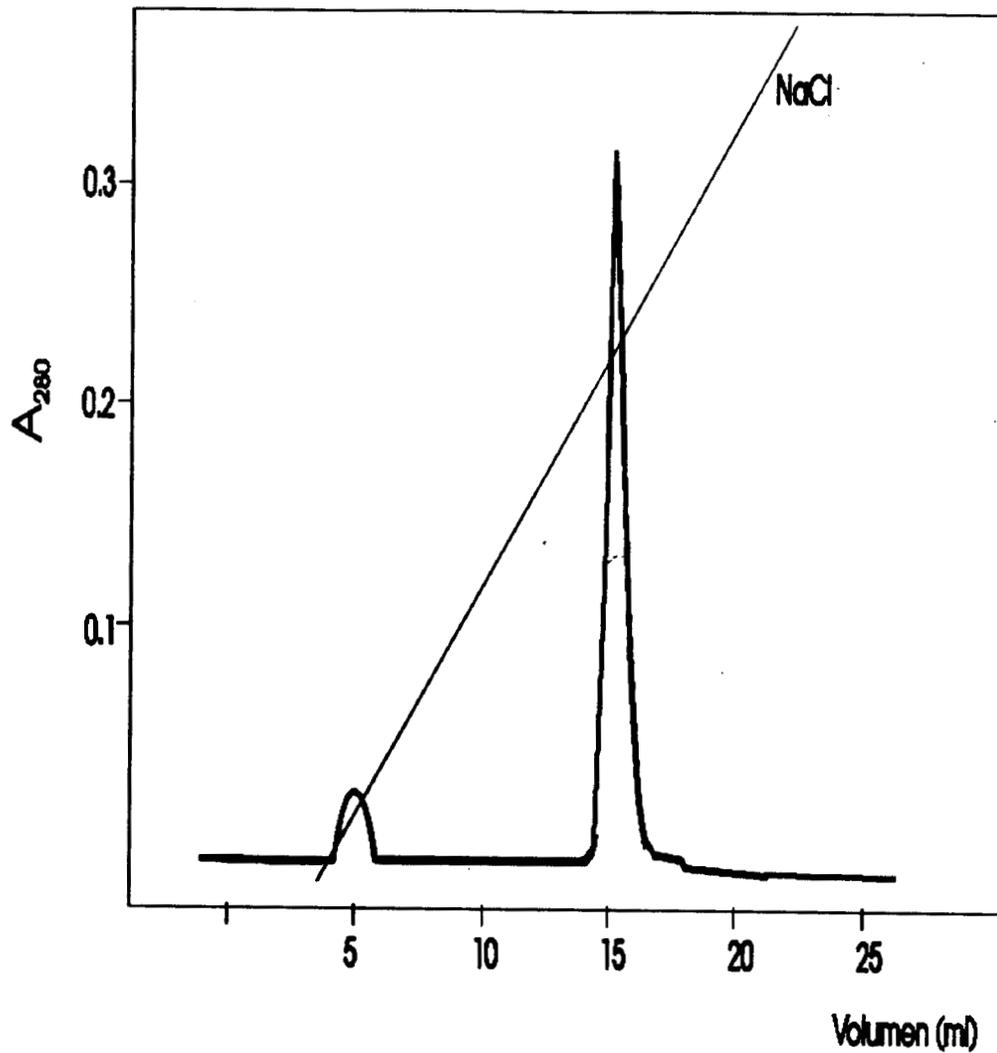


Fig. 16. Patrón de elución de la invertasa de *S. cerevisiae* por intercambio iónico en una columna TSK-5PW, con una solución amortiguadora de citratos 0.05 M pH 2.5 y con un gradiente de NaCl 0-0.4 M

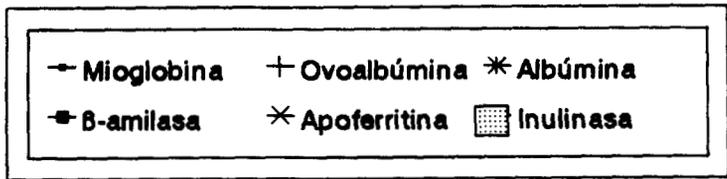
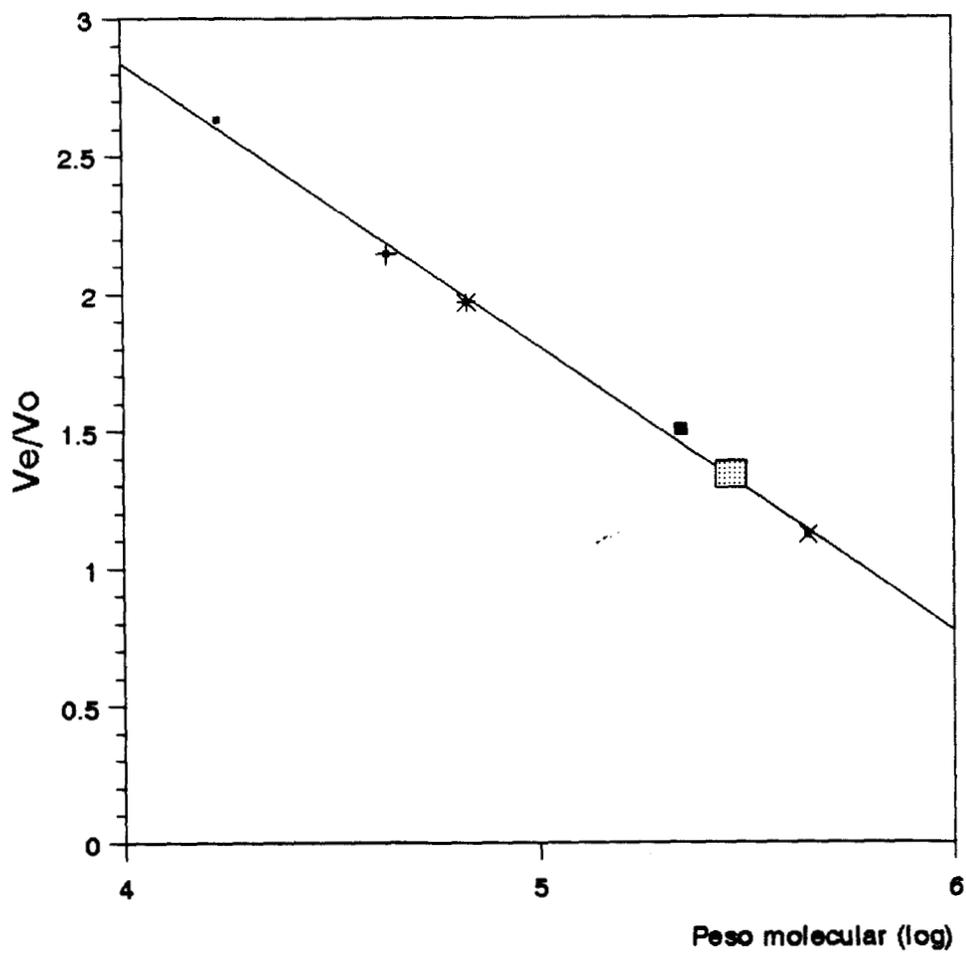


Figura 17. Curva de calibración para la determinación del peso molecular de las enzimas en estado nativo, en columna de agarosa eluidas con una solución reguladora de acetatos 0.05 M, pH 4.5

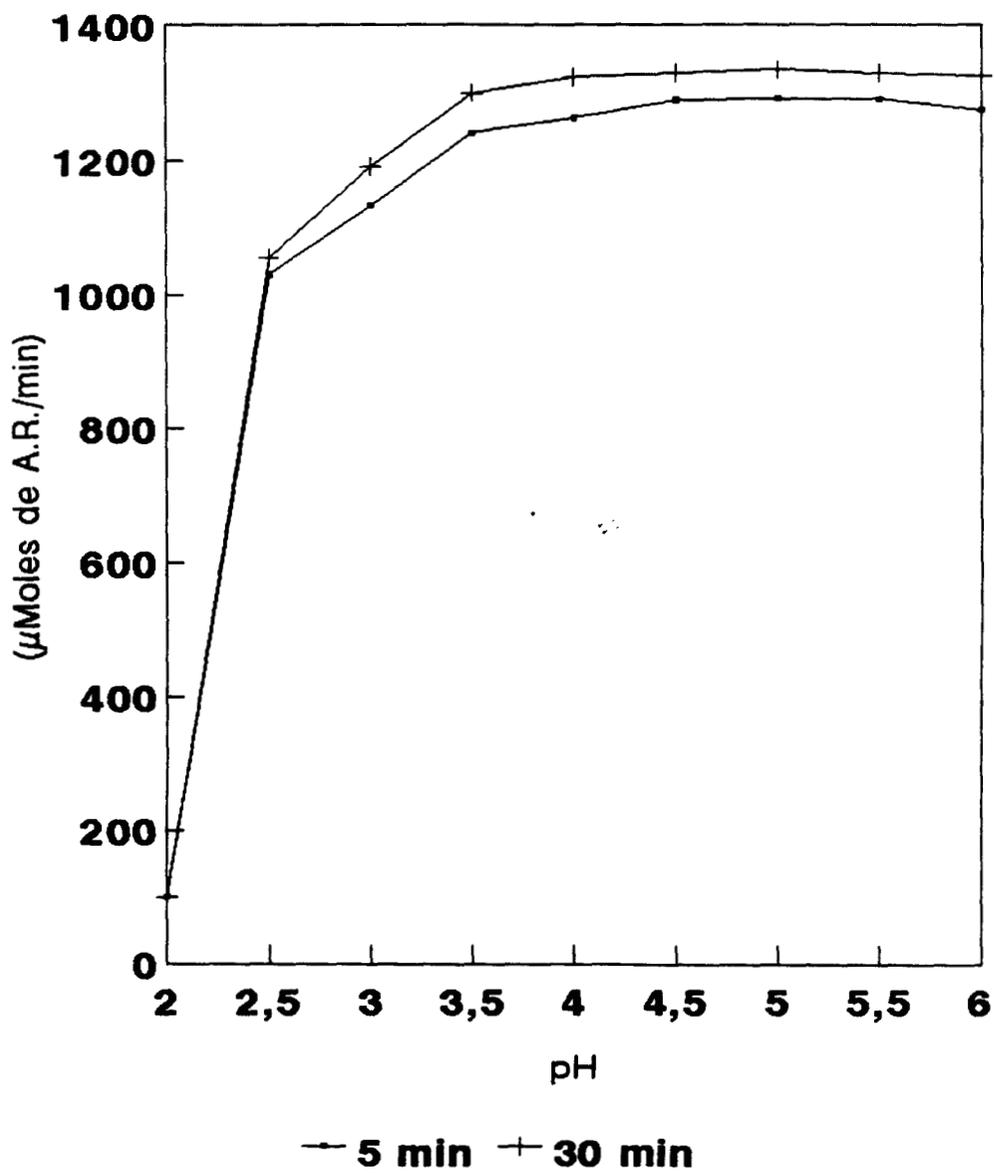


Fig. 18 Efecto del pH sobre la actividad de la inulinasa de *K. fragilis* CDBL-278 sobre inulina a 50 °C, determinada a diferentes tiempos.

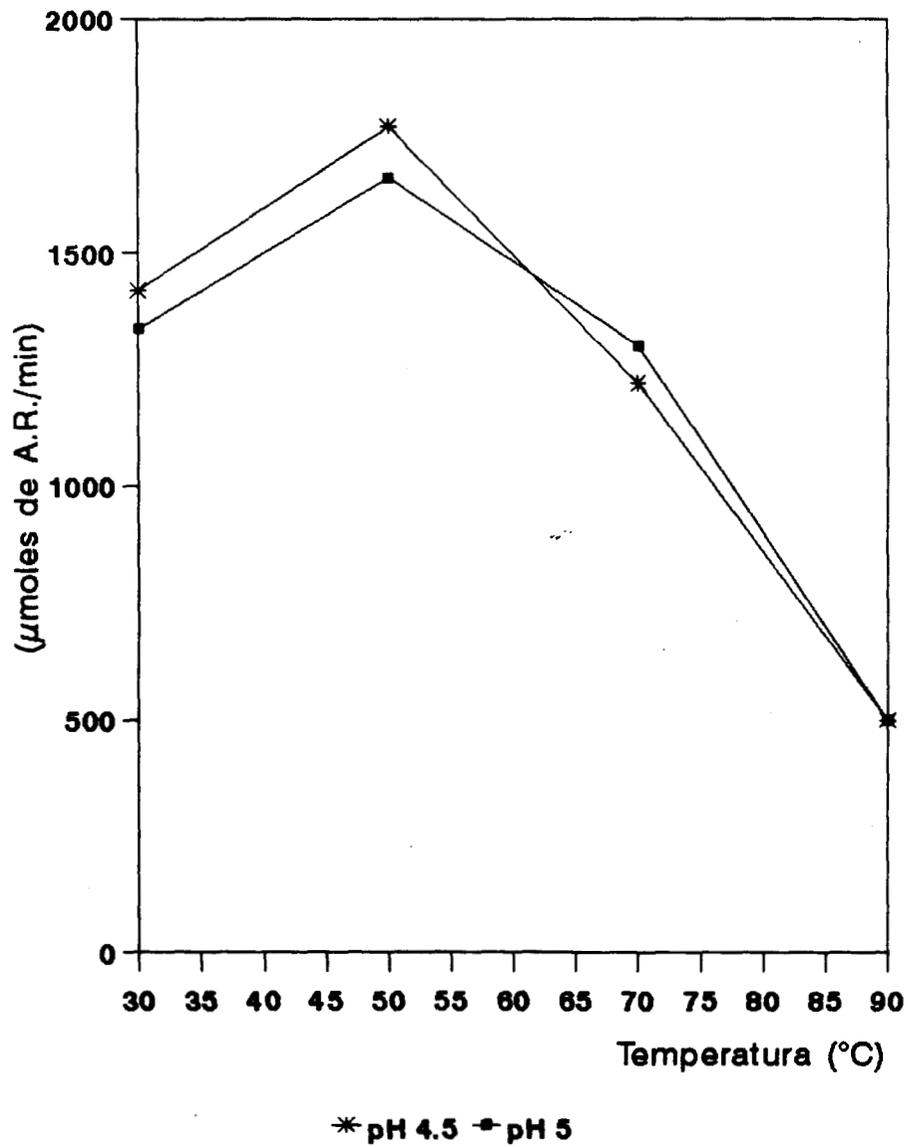


Fig. 19 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la inulinasa de *K. fragilis* CDBL-278 sobre inulina, determinada en solución amortiguadora de acetatos 0.1M, pH 4.5

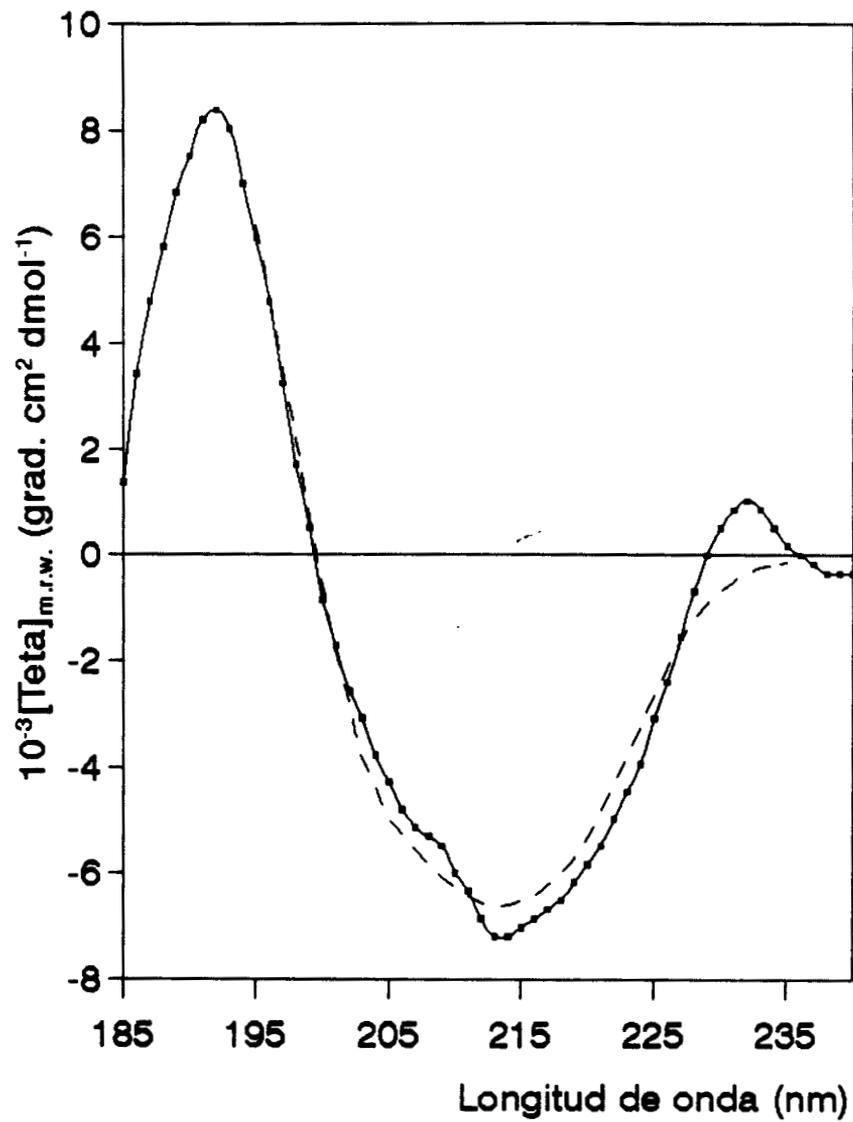


Fig.20 Espectro de DC de Invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*
 El espectro fue registrado en UV lejano 185-240 nm en una celda de 1 mm en un amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 7.00 (----)calculado, (—) observado.

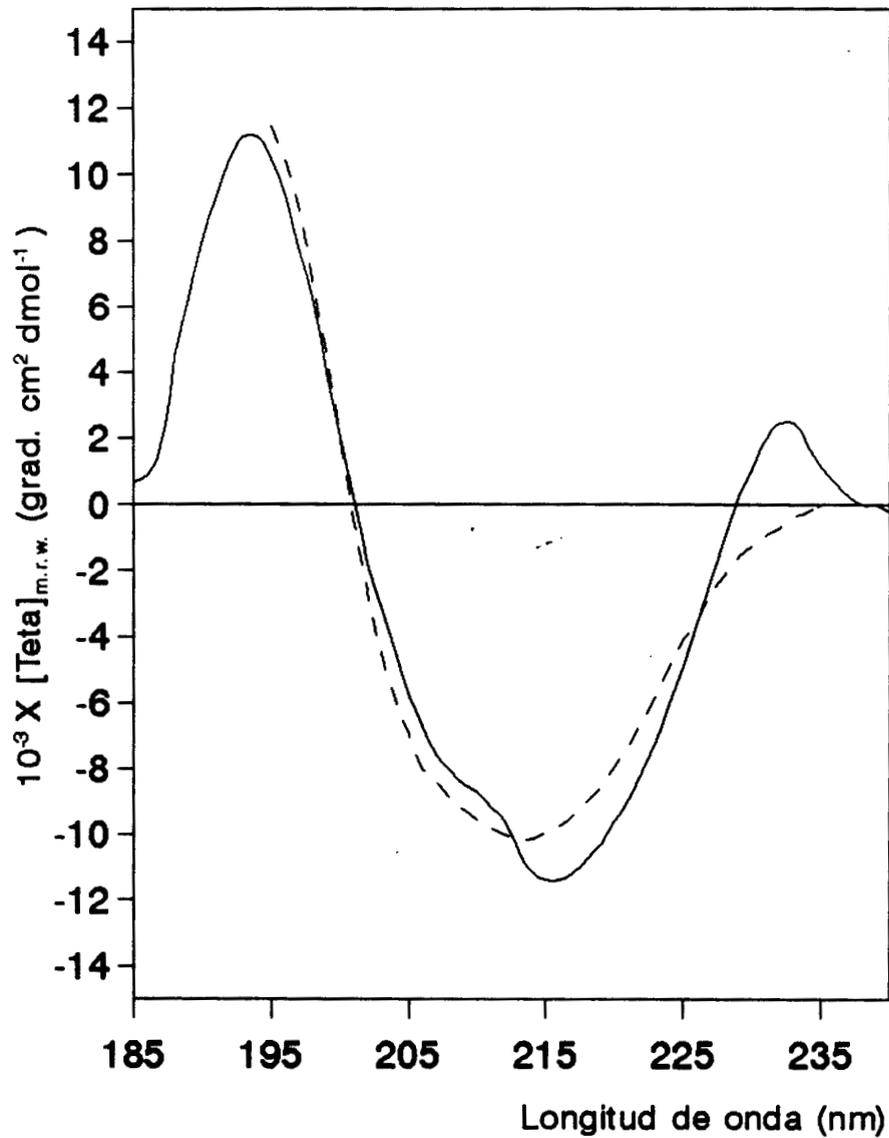


Fig. 21. Espectro de dicroísmo circular de la inulinasa de *K. fragilis* CDBL-278
 El espectro fue registrado a pH 7.0 en regulador de fosfatos 0.01 M
 (-----)espectro calculado (———) espectro experimental

TABLA VII

CONTRIBUCIONES RELATIVAS PORCENTUALES DE ESTRUCTURAS SECUNDARIAS Y CRÓMOFOROS NO PEPTIDICOS DE LA CURVA REGISTRADA POR DICROISMO CIRCULAR DE LA INULINASA DE *K. fragilis* CDBL-278

Contribución	Fracción (%)
α -hélice	0.62
Giros β y β -paralela	42.37
Hoja β -antiparalela	34.92
Estructura irregular	8.16
No peptídicos	13.93

TABLA VIII

CONTRIBUCIONES RELATIVAS PORCENTUALES DE ESTRUCTURAS SECUNDARIAS Y CROMOFOROS NO PEPTIDICOS DE LA CURVA REGISTRADA POR DICROISMO CIRCULAR DE LA INVERTASA DE *S. cerevisiae*

Contribución	Fracción (%)
α -hélice	8.04
Giros β y β -paralela	13.58
Hoja β -antiparalela	28.12
Estructura irregular	20.79
No peptídicos	29.57

CONCLUSIONES

La enzima inulinasa producida por fermentación de la levadura *Kluyveromices fragilis* CDBL-278, en el medio de cultivo con inulina al 1% y extracto de levadura al 0.5%, es principalmente excretada al medio de cultivo, ya que la proteína retenida en la pared celular y extraída por el tratamiento con cisteína en la solución amortiguadora de fosfatos 0.3 M pH 7.0, representó la quinta parte de la proteína total determinada en el preproceso de fermentación, resultados que coinciden con lo reportado en la literatura.

Los resultados obtenidos de los diferentes métodos analíticos empleados, muestran que tanto la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* como la inulinasa de *Kluyveromices fragilis* CDBL-278, fueron purificadas a homogeneidad, por lo que se puede afirmar que la metodología y condiciones fueron las adecuadas para la purificación de este tipo de proteínas.

Los pesos moleculares determinados por electroforesis en SDS para la invertasa (50-60 kDa) e inulinasa (87-102 kDa) para la enzima glicosilada y (57-62 kDa) para la enzima no glicosilada, considerando un contenido de carbohidratos del 33 %, son similares a los reportados por diferentes investigadores^{2, 12,16,17, 22,23,24}.

El peso molecular de la inulinasa en estado nativo, determinado por filtración en gel 3.8×10^5 , permite suponer que la enzima en estas condiciones se encuentra formada por cuatro subunidades idénticas.

De acuerdo con otros investigadores la inulinasa de *K. fragilis* muestra una alta actividad sobre sacarosa; sin embargo, la invertasa de *S. cerevisiae* presenta muy lenta actividad sobre inulina, por lo que se puede considerar que ambas enzimas poseen diferente especificidad por el tipo de sustrato.

Los valores de $K_m = 5.7$ mM y $V_{max} = 5.9$ U/mg determinados en este trabajo para la inulinasa sobre la inulina, son valores aparentes ya que la baja solubilidad de la inulina no permitió alcanzar concentraciones mayores del 6 %.

Las relaciones S/I determinadas, 8.5 para la inulinasa y 2 800 para la invertasa, según lo reportado por Vandamme³, permiten en este caso, hacer la diferenciación entre una y otra actividad enzimática.

Los espectros de dicroísmo circular de ambas proteínas muestran que en la estructura secundaria de éstas la principal contribución esta dada por hojas- β y que la contribución de α -hélice es muy pequeña. La estimación del contenido de estructuras secundarias obtenido por el método descrito por Perczel, para ambas enzimas muestra que el contenido de α -hélice es muy pequeño y que la contribución de no peptídicos (residuos aromáticos y enlaces disulfuro) es importante, especialmente en el caso de la invertasa.

La homología del 68 % encontrada entre en la secuencia de aminoácidos de la inulinasa de *K. marxianus* y de la invertasa de *S. cerevisiae* reportada por Laloux y la gran similitud que presentan los espectros de dicroísmo circular; permiten considerar que ambas enzimas provienen de un ancestro común por lo que pueden ser consideradas como miembros de la misma familia, con diferencias en la especificidad por el tipo de sustrato.

La diferencia en la intensidad de los espectros registrados, puede en principio ser atribuída al medio ambiente que rodea a algunos residuos aromáticos o a la diferencia en el contenido de carbohidratos que presentan la inulinasa e invertasa (17 %)

Sin embargo, como se ha demostrado anteriormente, enzimas pertenecientes a la misma familia presentan espectros similares de dicroísmo circular, como es el caso de la familia de las proteasa ácidas⁴¹ y de las proteasa cisteínicas⁴², aunque se ha encontrado que algunos miembros de estas familias

cisteínicas⁴², aunque se ha encontrado que algunos miembros de estas familias presentan espectros de dicroísmo circular con diferencias importantes⁴³.

En base a lo anterior, se pueden considerar a la itulinasa de *K. fragilis* CDBL-278 y a la invertasa de *S. cerevisiae*, miembros de la familia de las β -fructosidasas; además, que ambas enzimas en solución presentan patrones de plegamiento similares.

Bibliografia

1. Rouwenhorst, R. J., Visser, L. E., Van Der Bhan, A. A., Scheffers, W. A. and Van Dijken, J. P. (1988) *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 1131-1137
2. Rouwenhorst, R. R., Ritreester, W.S., Scheffers W. A., and Van Dijken. J. P. (1990) *Applied and Environmental Microbiology* **56(11)**, p.3324-3336
3. Vandamme, E. J. and Dericke, D. G.. (1983) *Advances in Applied Microbiology*. **29**: 139-176
4. Gascón, S., Neumann N. P. and Lampen, O. (1968) *J. of Appl. Chem.* **243(7)**: 15733-1577
5. Gupta, A.K., Kaur, N. and Singh, R. (1989) *Biological Wastes* **29**: 73-77
6. Wim J. Drent, Greetje A. Laphor, Wim M. Wiegant and Jan C. Gottschal. (1991) *Applied and Environmental Microbiology* **57(2)**: 455-462
7. Mukherjee, K., and Sengupta, S. (1987) *Canadian J. Microbiol.* **33**: 520-524
8. Guiraud, J. P., Viard-Gaudin, Ch. and Galzy, P. (1980) *Agric. Biol. Chem.* **44(6)**: 1245-1252
9. Carniti, P., Beltrame, P. L., Guardione, D., Focher, B. and Marzetti, A. (1991) *Biotechnology and Bioengineering* **37**: 575-579
10. Kaur, N., Kaur, M., Gupta, A. K. and Singh, R. (1992) *J. Chem. Tech. Biotechnol* **53**: 279-284
11. Vullo, D. L., Coto, C. E. and Siferiz, F. (1991) *Applied and Environmental Microbiology* **57(8)**: 2392-2394
12. Grootwasink, J. W. D. and Fleming, S. E. (1980) *Enzyme Microb. Technol.* **2**: 45-53
13. Bernit, G. C. and Galzy, P. (1980) *Folia Microbiol.* **27(1)**: 19-24

14. Adams M., Richtmeyer K. and Hudson C.S. (1943) *J. Am. Chem. Soc.* **65**: 1369-1380
15. Snyder, H. E., and Phaff, H.J. (1960) *A. Van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.* **26**: 433-452
16. Workman W.E. and Day D.F. (1983) *FEBS Letters*, **160(1,2)**: 16-20
17. Rouwenhorst, R. J., Hensing, M., Verbaket, J., Scheffers, W. A. and Van Dijken, J. P. (1990) *Applied and Environmental Microbiology* **56(11)**: 3337-3345
18. Laloux, O., Cassart, Jean-Pool., Delcour, J., Van Beeumen, J. and Vanderhaute, J. (1991) *FEBS* **289(1)**: 64-68
19. Phelps, C. F. (1965) *Biochem. J.* **95**: 41-47
20. Efstathiou, Y., Reysset, G. and Troffaut, N. (1976) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25(2)**: 143-149
21. Neumann, N. P. and Lampen, J. O. (1967) *Biochem.* **6(2)**: 468-475
22. Trimble, R. B. and Maley, F. (1977) *J. Biol. Chem.* **252(12)**: 4409-4412
23. Chu, F. K., Trimble, R. B. and Maley, F. (1978) *J. Biol. Chem.* **253(24)**: 8691-8693
24. Chu, F. K., Watorek, W. and Maley, F. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* **233(2)**: 543-555
25. Lehle, L., Cohen R. E. and Ballou, C. E. (1979) *J. Biol. Chem.* **254(23)**: 12209-12218
26. Taussig, R. and Carlson, M. (1983) *Nucleic Acids Research* **11(6)**: 1943-1954
27. Tammi, M., Ballou, L., Taylor, A. and Ballou, C. E. (1987) *J. Biol. Chem.* **262(9)**: 4895-4401

28. Williams, R. S., Trumbly, R. J., MacColl, R., Trimble, R. B. and Maley, F. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**(24):13334-13341
29. Schülke, N. and Schmid, F. X. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**(18): 8832-8837
30. Lam, K. S. and GrootWasink, J. W. D. (1985) *Enzyme Microb. Technol.*, **7**: 239-242
31. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem* **193**: 265-275
32. Miller, G. L. (1959) *Annual Chem.* **31**: 426-428
33. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956) *Anal. Chem.* **28**(3): 350-356
34. Neuhoff, V., Stamm, R. and Eibl, H (1985) *Electrophoresis* **6**: 427-448
35. Scopes, R.K. (1974) *Anal. Biochem.* **59**: 277-282
36. Gill, S. C. and Von Hippel. P. H. (1989) *Anal. Biochem.* **182**: 319-326
37. Taussig, R. and Carlson, M. (1983) *Nucleic Acids Research*, **11**(6): 1943-1955
38. Manavalan, P. and Johnson W. C. Jr. (1983) *Nature*, **305**(27): 831-832
39. Hennesy, J. P. and Johnson, W. C. (1981) *Biochemistry* **20**: 1085-1094
40. Perczel, A., Hollosi, M., Tusnady, G. and Fasman, G. D. (1991) *Protein Eng.* **4**: 669-679
41. Tellos-Solís, S. R., Rodríguez-Romero A. and Hernández-Arana A. (1994) *Biochemistry and Molecular Biology International* **33**(4): 759-768
42. Solis-Mendiola, S., Arroyo-Reyna, A and Hernández-Arana A. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1118**: 288-292

43. Arroyo-Reyna, A., Hernández-Arana A. and Arreguín-Espinoza R (1994)
Biochem. J. **300**: 107-110