

## CARACTERIZACIÓN DE LA INULINASA E INVERTASA EN *CANDIDA UTILIS*\*

M. Ros\*\*, J. C. Argüelles\*\* y M. Gacto\*\*

Recibido: noviembre 1984

### SUMMARY

#### Characterization of inulinase and invertase activities in *Candida utilis*

Invertase (E.C. 3.2.1.26) and inulinase (E.C. 3.2.1.7) were analyzed in *Candida utilis* CECT 1061 to determine whether one single enzyme with both activities or two enzymes with different substrate specificities were present in this yeast. The synthesis of both fructofuranosidase activities was under control of catabolite repression by glucose and they were present in whole cell extracts as well as in the extracellular culture fluids. The cell-associated activities appear mostly located in the periplasmic space. The two activities exhibited an identical optimum pH and similar profiles of thermal denaturation. In addition, a constant ratio was found between the inulinase and the invertase activities in a variety of culture conditions when extracellular media or cell extracts were assayed. From the results obtained it was concluded that both activities reside in a same protein of molecular weight close to 450,000 dalton which shows a different affinity for sucrose and inuline. Km values were 14 and 0,62mM, respectively.

### RESUMEN

La actividad invertasa (E.C. 3.2.1.26) e inulinasa (E.C. 3.2.1.7) se ha analizado en *Candida utilis* CECT 1061 para determinar si en esta levadura existe una única enzima con ambas actividades o dos enzimas diferentes con distinta especificidad de sustrato. La síntesis de ambas fructofuranosidasas parece regulada por represión catabólica por glucosa y ambas se presentan tanto en extractos celulares como extracelularmente. La actividad detectada en extractos celulares aparece fundamentalmente localizada a nivel periplásmico. Las dos actividades exhiben idéntico pH óptimo y similar resistencia a la desnaturalización por calor. Además, la relación de actividad inulinasa/actividad invertasa se mantiene constante en distintos medios de cultivo tanto en células como en el medio extracelular. Los resultados sugieren que ambas actividades se deben a una misma enzima de peso molecular próximo a 450.000 dalton que muestra diferente afinidad por sacarosa o inulina. Los valores Km fueron 14 y 0,62 mM, respectivamente.

### INTRODUCCIÓN

La inulina es un polímero lineal formado por moléculas de fructosa unidas mediante enlace 0-glicosídico de tipo *beta*-2.1. Este polisacárido presenta un grado de polimerización equivalente a 30-35 unidades de fructosa y constituye un carbohidrato de reserva en vegetales que es particularmente abundante en algunas plantas

compuestas (ZITTAN, 1981). Varios trabajos han resaltado el interés que ofrece la inulina como potencial fuente alternativa para la obtención industrial de fructosa (GUIRAUD *et al.*, 1981).

Se han descrito diversas enzimas de origen vegetal o microbiano capaces de hidrolizar la inulina. En los sistemas vegetales analizados, la actividad inulinasa es distinta de la invertasa y

\* Trabajo presentado, en parte, a la II Reunión del Grupo Especializado de Micología de la Sociedad Española de Microbiología, Barcelona, 1984.

\*\* Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Murcia.

no presenta acción sobre sacarosa (CHAUTARD *et al.*, 1981). En otros casos, sin embargo, una sola fructofuranosidasa parece actuar hidrolíticamente sobre ambos sustratos liberando tanto unidades terminales de fructosa a partir de inulina como glucosa y fructosa a partir de sacarosa (GUIRAUD *et al.*, 1982). Esto ha conducido a varios autores a negar la existencia generalizada de una verdadera inulinasa independiente y a proponer que, en algunos sistemas, la actividad sobre inulina puede corresponder a la acción de la fructofuranosidasa clásica o invertasa, con actividad inulinasa lateral (KOVALEVA & YURKEVICH, 1978).

El presente trabajo ha abordado la caracterización del sistema hidrolítico de la levadura *Candida utilis* sobre inulina con objeto de averiguar si inulinasa (E.C. 3.2.1.26) e invertasa (E.C. 3.2.1.7) representan o no en este sistema un único tipo de enzima. Las evidencias señalan que en este microorganismo una sola fructofuranosidasa es capaz de hidrolizar ambos sustratos con diferente eficiencia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MICROORGANISMO Y CONDICIONES DE CULTIVO

La levadura *C. utilis* CECT 1061, procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo, fue utilizada en el desarrollo del presente trabajo. Los cultivos se realizaron en medio MM líquido (CIN<sub>4</sub>, 0'05%; NO<sub>3</sub>Na, 0'05%; extracto de levadura, 0'03%; PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub>, 0'02%; ClNa, 0'1%; SO<sub>4</sub>Mg.7H<sub>2</sub>O, 0'1%) con adición de un compuesto carbonado (glúcica, sacarosa o inulina) al 0'5%. Los cultivos se incubaron con agitación horizontal a 30°C en un incubador orbital Lab-Line a 150 r.p.m., y el crecimiento se estimó por seguimiento de las variaciones de densidad óptica a 600 nm en un fotocolorímetro Bausch & Lomb-20 o por recuento celular directo con cámara cuentaglóbulos.

### PREPARACIONES ENZIMÁTICAS

Para estimación de las actividades extracelulares se emplearon alícuotas del medio extracelular obtenido de los cultivos por centrifugación a 3.000xg durante 10 min. Las actividades periplásmicas se determinaron utilizando suspensiones de células enteras, lavadas y resuspendidas en tampón acetato pH 5'6 50 mM, de concentración celular conocida.

En las pruebas en que se analizó la actividad total ligada a células (actividades periplásmicas e intracelulares) se procedió a lavar repetidamente con agua destilada las células recogidas de los cultivos tras centrifugación a baja velocidad y a resuspenderlas finalmente en el tampón antes indicado. Las suspensiones celulares obtenidas se sometieron a ruptura mecánica con polvo de vidrio Ballotini (0'45-0'50 mm) en un desintegrador Braun MKS con refrigeración

acoplada. Los extractos celulares se centrifugaron a continuación a 18.000xg durante 20 min en una centrifuga Sorvall RC-2 refrigerada y los sobrenadantes resultantes se utilizaron directamente en los análisis enzimáticos correspondientes a actividad total asociada a células.

### VALORACIÓN DE INULINASA E INVERTASA

Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo en un volumen final de 1 ml, conteniendo 0'5 ml de la preparación enzimática correspondiente y 0'5 ml del sustrato apropiado (sacarosa o inulina) a una concentración final del 0'5% en tampón acetato pH 5'6 50 mM. Los ensayos se incubaron a 37°C durante tiempos variables y la reacción se detuvo por adición del reactivo alcalino de Somogyi. La liberación de grupos reductores se valoró por el método colorimétrico de SOMOGYI-NELSON (1952) y a lo largo de las determinaciones se dispusieron controles particulares sometidos a condiciones idénticas a las de los ensayos problema y en los que la actividad de las preparaciones fue previamente inactivada a tiempo cero antes del comienzo de las reacciones. De este modo, el incremento de grupos reductores libres determinado fue proporcional a la concentración de preparación enzimática y al tiempo de incubación y correspondió a la acción enzimática desarrollada sobre los respectivos sustratos bajo condiciones controladas.

Una unidad de invertasa o inulinasa se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar el equivalente a 1 micromol de fructosa por min, actuando respectivamente sobre sacarosa o inulina en las condiciones de pH y temperatura establecidas.

### LOCALIZACIÓN ENZIMÁTICA Y DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

La distribución *in situ* de la actividad ligada a células se estableció por inactivación selectiva mediante pretratamiento suave de las células con ácidos diluidos (ARNOLD, 1972). El porcentaje de células vivas tras los pretratamientos empleados en la localización de la fructofuranosidasa se estableció de acuerdo con la prueba del azul de metileno mediante recuento en cámara cuentaglóbulos (ARNOLD, 1972). Pruebas adicionales, basadas en el crecimiento en medio Winge líquido o sólido de células tratadas frente a células control, confirmaron el bajo efecto letal de los tratamientos en concordancia con datos previos (VILLANUEVA & GACTO, 1973).

### FILTRACIÓN EN GEL

Tanto los sobrenadantes de cultivo como los sobrenadantes de extractos celulares obtenidos por desintegración mecánica se utilizaron para determinar el comportamiento de las actividades estudiadas en cuanto a su elución en columnas de filtración en gel Sephadex G-200. El gel se preparó en columnas (40x2'5 cm) de acuerdo con las instrucciones de la casa suministradora (Farmacia) y se cromatografiaron en cada caso 2 ml de la correspon-

diente muestra enzimática, recogiendo fracciones de 3.5 ml mediante un colector de fracciones Gilson Microcol acoplado a la salida del eluyente y utilizando tampón acetato pH 5.6 50 mM en el desarrollo. Cada fracción resultante fue analizada para actividad invertasa e inulinasa y su contenido en proteína fue estimado mediante absorción espectrofotométrica a 280 nm en un espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu.

Para calibración del peso molecular se siguió el método de ANDREWS (1965) empleando como proteínas marcadoras de peso molecular conocido ferritina (450.000), catalasa (240.000) y aldolasa (158.000), que fueron suministradas por Boehringer.

## PRODUCTOS Y REACTIVOS

Glucosa, sacarosa e inulina fueron obtenidas de Merck. Cicloheximida se obtuvo de Sigma. El resto de productos y reactivos utilizados fue de calidad analítica.

## RESULTADOS

### PRODUCCIÓN DE INVERTASA E INULINASA

La producción extracelular de invertasa e inulinasa durante la curva de crecimiento de *C. utilis* se analizó en medio MM conteniendo como fuente carbonada glucosa, sacarosa o inulina. A tiempos determinados se tomaron alícuotas de los medios y se determinó el nivel de azúcares reductores, evolución del pH, crecimiento celular y unidades de invertasa e inulinasa presentes.

La figura 1 representa la aparición de invertasa extracelular en medio suplementado con glucosa (arriba) o con sacarosa (abajo). La dinámica de aparición de inulinasa en tales medios fue superponible a la registrada para invertasa, aunque los niveles de dicha actividad fueron comparativamente mucho más bajos. En ambos casos, la aparición de las actividades enzimáticas se produce durante la fase estacionaria, coincidiendo con un notable descenso de los grupos reductores presentes en el medio.

La figura 2 ilustra el crecimiento con inulina y los niveles de actividad inulinasa registrados. Con esta fuente carbonada no se alcanzan en el cultivo concentraciones celulares elevadas y la liberación de fructosa terminal a partir del polímero parece ser el factor limitante que determina el lento crecimiento. En los sobrenadantes de cultivo con inulina la actividad inulinasa detectada se acompañó a su vez de actividad invertasa, que presentó una dinámica de aparición análoga a la inulinasa, pero alcanzando niveles de actividad comparativamente más elevados.

Los resultados de estos experimentos de-

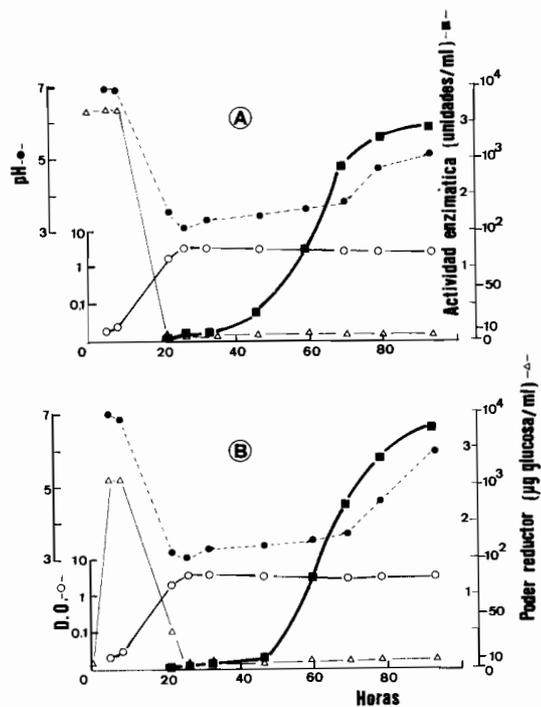


FIGURA 1. A. Producción de invertasa en medio MM con glucosa. B. Producción de invertasa en MM con sacarosa. En ambos casos, los azúcares reductores presentes en el medio de cultivo se expresaron como equivalentes de glucosa.

A. Invertase production in MM with glucose. B. Invertase production in MM with sucrose. The reducing sugars in the culture media were expressed as glucose-equivalents.

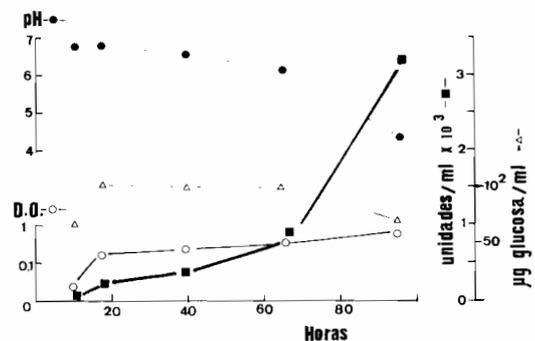


FIGURA 2. Producción de inulinasa en MM con inulina. Las condiciones y símbolos son iguales que los indicados en la figura 1.

Inulinase production in MM with inulin. Conditions and symbols are as those indicated in figure 1.

mostraron la coexistencia de ambas actividades en esta levadura, con independencia de la naturaleza de la fuente de carbono presente en el medio. La determinación de las actividades ligadas a células, en vez de las extracelulares, condujo a idéntica conclusión.

#### RELACIÓN I/S

Para obtener pruebas a favor o en contra de la existencia de una única enzima con capacidad para degradar sacarosa e inulina se determinó en los sobrenadantes de los cultivos anteriormente citados la razón de actividades sobre inulina y sobre sacarosa como sustratos alternativos (cociente I/S) a lo largo de la curva de crecimiento. La relación I/S correspondió en todos los casos a un valor próximo a  $8 \times 10^{-4}$ . Este valor fue constante e independiente del tiempo de incubación del cultivo en fase estacionaria para cada uno de los tres medios empleados. Este hecho, en correspondencia con la aparición paralela de invertasa e inulinasa en los cultivos analizados, sugirió que se trataba de la valoración de una misma enzima extracelular con dos actividades.

La misma relación I/S se obtuvo cuando se determinaron las actividades inulinasa e invertasa utilizando muestras de sobrenadantes de extractos celulares obtenidos de células crecidas en los distintos medios (tabla 1). Sin embargo, tal relación decreció significativamente cuando se utilizaron suspensiones de células

enteras como preparaciones enzimáticas, lo que se interpretó como debido a una dificultad estérica de la inulina para acceder a la enzima a través de la pared celular por razón de su alto peso molecular respecto a la sacarosa. En consecuencia, se investigó a continuación la localización de la fructofuranosidasa en células para determinar la validez de dicha interpretación.

#### LOCALIZACIÓN ENZIMÁTICA

La enzima responsable de la hidrólisis de sacarosa debe estar externamente localizada en células ya que este disacárido no es transportado a través de la membrana citoplásmica (GROOTWASSINK, 1983). Por lo tanto, si inulinasa e invertasa fueran una misma enzima en *C. utilis*, cabría esperar que la distribución de ambas actividades fuera preferentemente pericelular.

Con objeto de verificar la localización de la actividad fructofuranosidasa se procedió a pretratar células enteras con ácidos diluidos y observar la actividad enzimática residual respecto a células control procesadas de idéntica manera pero sin pretratamiento ácido. Para la realización de estas pruebas se dividió en dos partes iguales un cultivo de *C. utilis* conteniendo células en fase estacionaria. Las células se obtuvieron por centrifugación a baja velocidad, se lavaron, y las de una parte se utilizaron como control resuspendiéndolas en tampón fosfato pH 6.50 mM, mientras que las de la otra parte

TABLA 1. Relación I/S de las actividades extracelulares, ligadas a células y periplásmicas, en distintos medios de cultivo.

I/S ratios for extracellular, cell-associated and periplasmic activities in different culture media.

SOBRENADANTES DE CULTIVO	INVERTASA (unidades/ml)	INULINASA (unidades/ml)	I/S x 10 <sup>-4</sup>
MM + Glucosa	4.0	3.2 x 10 <sup>-3</sup>	8.0
MM + Sacarosa	2.6	2.1 x 10 <sup>-3</sup>	8.0
MM + Inulina	1.5	1.2 x 10 <sup>-3</sup>	8.0
SOBRENADANTES DE EXTRACTOS CELULARES			
	4.2	3.4 x 10 <sup>-3</sup>	8.1
MM + Sacarosa	3.8	3.1 x 10 <sup>-3</sup>	8.1
MM + Inulina	2.0	1.6 x 10 <sup>-3</sup>	8.0
SUSPENSIONES DE CÉLULAS ENTERAS			
MM + Glucosa	5.0	<1 x 10 <sup>-3</sup>	<8.0
MM + Sacarosa	3.9	<1 x 10 <sup>-3</sup>	<8.0
MM + Inulina	2.8	<1 x 10 <sup>-3</sup>	<8.0

TABLA 2. Efecto del pretratamiento con ácidos diluidos sobre la fructofuranosidasa ligada a células.

Effect of mild acid pretreatments on the cell-associated fructofuranosidase.

PRETRATAMIENTO	UNIDADES ENZIMÁTICAS		ACTIVIDAD RELATIVA (%)	VIABILIDAD CELULAR
	INVERTASA	INULINASA		
Ninguno	11'6	9'2 x 10 <sup>-3</sup>	100-100	97%
CIH 0'1N	4'1	3'3 x 10 <sup>-3</sup>	35-33	95%

se resuspendieron en idéntico volumen conteniendo CIH 0'1N. Las células se mantuvieron a 18°C, se centrifugaron y posteriormente se lavaron en ambos casos con agua destilada hasta obtener un pH próximo a 6 en los sobrenadantes desechados de la suspensión pretratada con ácido. En cada caso, las células se resuspendieron finalmente en 5 ml de tampón acetato pH 5'6 50 mM y se determinó la actividad enzimática ligada a células valorando los productos de hidrólisis sobre sacarosa o inulina como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se expresan en la tabla 2.

La actividad fructofuranosidasa recuperada tras el tratamiento ácido fue el 33-35% de la obtenida con células no pretratadas. Estos resultados sugieren que aproximadamente dos tercios de la actividad presente en células es periférica y el resto puede considerarse como debido a enzima intracelular en vías de secreción e insensible al ácido. La conclusión alcanzada sobre la localización preferentemente pericelular de las actividades ligadas a células está apoyada por el hecho de que en sobrenadantes de cultivo la inulinasa e invertasa solubles son rápidamente inactivadas *in vitro* a pH 1.

La actividad fructofuranosidasa en extractos de células control sometidos a centrifugación aparece en la fracción soluble y no se recoge en la fracción particulada de paredes celulares. Esto parece indicar que la enzima no se encuentra covalentemente unida a la pared sino situada en el espacio periplásmico entre dicha estructura y la membrana, de donde se libera en forma soluble tras la rotura mecánica de la pared celular.

#### REPRESIÓN DE INULINASA E INVERTASA POR HEXOSAS

La aparición de invertasa e inulinasa detectable se relaciona con tasas de crecimiento reducidas (véase figs. 1 y 2). El incremento de actividad ocurre en todos los casos cuando el crecimiento celular es lento o está detenido y no

existe correspondencia con un aumento paralelo del número de células presentes. Esta observación sugirió la posibilidad de que la regulación de la expresión de ambas actividades pudiera deberse a una liberación de la represión catabólica ejercida por altas concentraciones relativas de glucosa o fructosa. La posibilidad de que la mera detención del crecimiento condujera a una conversión a formas activas de enzimas preformados en forma inactiva también fue considerada. Sin embargo, la adición del inhibidor de síntesis proteica cicloheximida a cultivos en fase exponencial estabilizó y detuvo el crecimiento sin provocar simultáneamente un aumento en el nivel de actividad enzimática detectable.

A fin de determinar si la síntesis de ambas actividades está controlada por represión catabólica, se investigó el efecto de la glucosa en la producción de invertasa e inulinasa. Para ello, un cultivo de células estacionarias en medio MM con inulina fue dividido en dos suspensiones paralelas, una con adición de glucosa a concentración final del 2% y otra sin adición de este azúcar. Ambos cultivos se incubaron a 30°C y a diversos tiempos se estimó comparativamente en ellos la presencia de grupos reductores en el medio (fig. 3a), la evolución de la densidad óptica (fig. 3b) y las actividades invertasa o inulinasa ligadas a células (fig. 3c). Los resultados expresados en la figura 3 indicaron que mientras la actividad invertasa aumentó notablemente en el cultivo sin glucosa, el que recibió dicho metabolito experimentó un claro bloqueo en la producción de enzima pese a haber multiplicado por 29 la densidad celular inicial al cabo de 10 horas. El efecto represor de la glucosa se aprecia más claramente en la parte superior de la figura 3 mediante la expresión de los mismos datos de la actividad enzimática, pero referidos en ambos casos a un número fijo de células ( $1'8 \times 10^8$ ). La detención de la síntesis de enzima, superpuesta a la activa división celular, ocasiona en el cultivo suplementado con glucosa que la actividad por célula descienda rápidamente. El mismo efecto cualita-

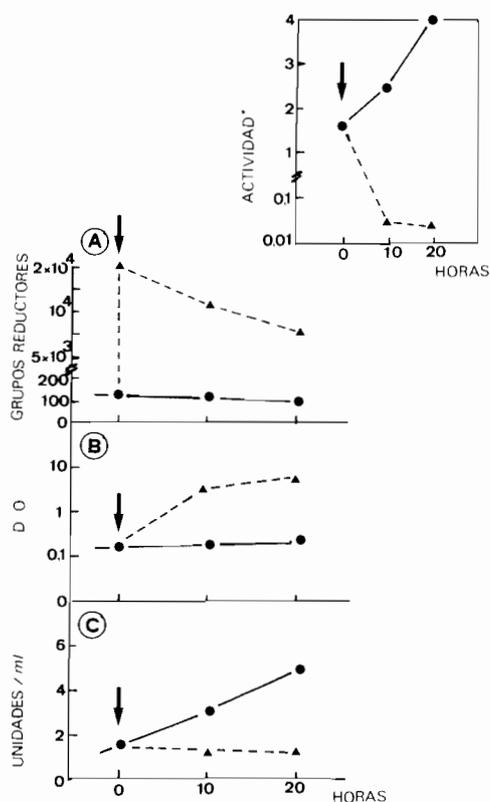


FIGURA 3. A. Nivel de grupos reductores en el medio suplementado con glucosa y sin suplementar. B. Incremento de la concentración celular determinado como densidad óptica de los cultivos a 600 nm. C. Actividad invertasa. En todos los casos la línea discontinua representa el cultivo suplementado con glucosa y la continúa el cultivo control. El recuadro superior indica unidades de invertasa por  $1.8 \times 10^8$  células.

A. Levels of reducing sugars in the culture media with or without added glucose. B. Increase in cell concentration as measured by the optical density of the cell cultures at 600 nm. C. Invertase activity. In all cases the discontinuous line represents the glucose-supplemented culture and the continuous line control culture. Upper insert indicates invertase activity per  $1.8 \times 10^8$  cells.

tivo se evidenció cuando se valoró inulinasa en vez de invertasa.

Por otra parte, experimentos similares en los que se aportó fructosa exógena, en lugar de glucosa, dieron resultados análogos a los descritos como sería de esperar dada la relación metabólica existente entre ambas hexosas.

#### DETERMINACIONES DEL PESO MOLECULAR

Los datos anteriores apoyan que las activida-

des fructofuranosidasas estudiadas en este sistema se deben a una misma enzima con dos diferentes actividades, cuya expresión está controlada por la presencia o ausencia de hexosas. Ante la posibilidad de que ambas actividades pudieran, no obstante, deberse a la expresión de genes distintos sometidos a un control de expresión coordinada, se abordó adicionalmente la determinación del peso molecular de invertasa e inulinasa mediante filtración en gel.

Cuando alícuotas de sobrenadantes de medios de cultivo o de sobrenadantes de extractos celulares se cromatografiaron en Sephadex G-100 Superfino, tanto la actividad invertasa como la inulinasa resultaron excluidas del gel y aparecieron en las fracciones correspondientes al volumen muerto de la columna, lo que indicó que ambas actividades podían ir asociadas a una enzima de peso molecular superior a 100.000 dalton.

La elución en Sephadex G-200 (fig. 4) reveló la elución de ambas actividades a una relación volumen de elución/volumen muerto igual a 1'125, lo que corrobora la identidad sugerida por otras pruebas comentadas. Además, la relación I/S en las fracciones con actividad enzimática fue constante y similar a la establecida en preparaciones enzimáticas no fraccionadas. Estas evidencias, en su conjunto, apoyan fuertemente la existencia en *C. utilis* de una sola fructofuranosidasa capaz de exhibir actividad hidrolítica sobre sacarosa y sobre inulina con distinta eficiencia.

Tras revelar la absorbancia a 280 nm de las fracciones de elución de una columna de Sephadex G-200 calibrada con proteínas de peso molecular conocido, se puso de manifiesto que la ferritina se recoge en la misma fracción en que eluye el pico mayoritario de actividad fructofuranosidasa ( $V_e/V_o = 1'125$ ) mientras que catalasa y aldolasa eluyen posteriormente. Por tanto, con arreglo al criterio de su comportamiento en filtración en gel, los datos sugieren un peso molecular aproximado para la enzima próximo a 450.000 dalton.

#### OTROS PARÁMETROS ENZIMÁTICOS

Los sobrenadantes de cultivo y los sobrenadantes de extractos celulares procedentes de células crecidas sobre glucosa, sacarosa o inulina presentaron valores iguales para ciertos parámetros enzimáticos que fueron adicionalmente analizados empleando sacarosa o inulina como sustratos. El pH óptimo de actividad en las condiciones estándar establecidas fue investigado en el rango de valores de 2 a 9, mediante utilización de los tampones CIH/CIK,

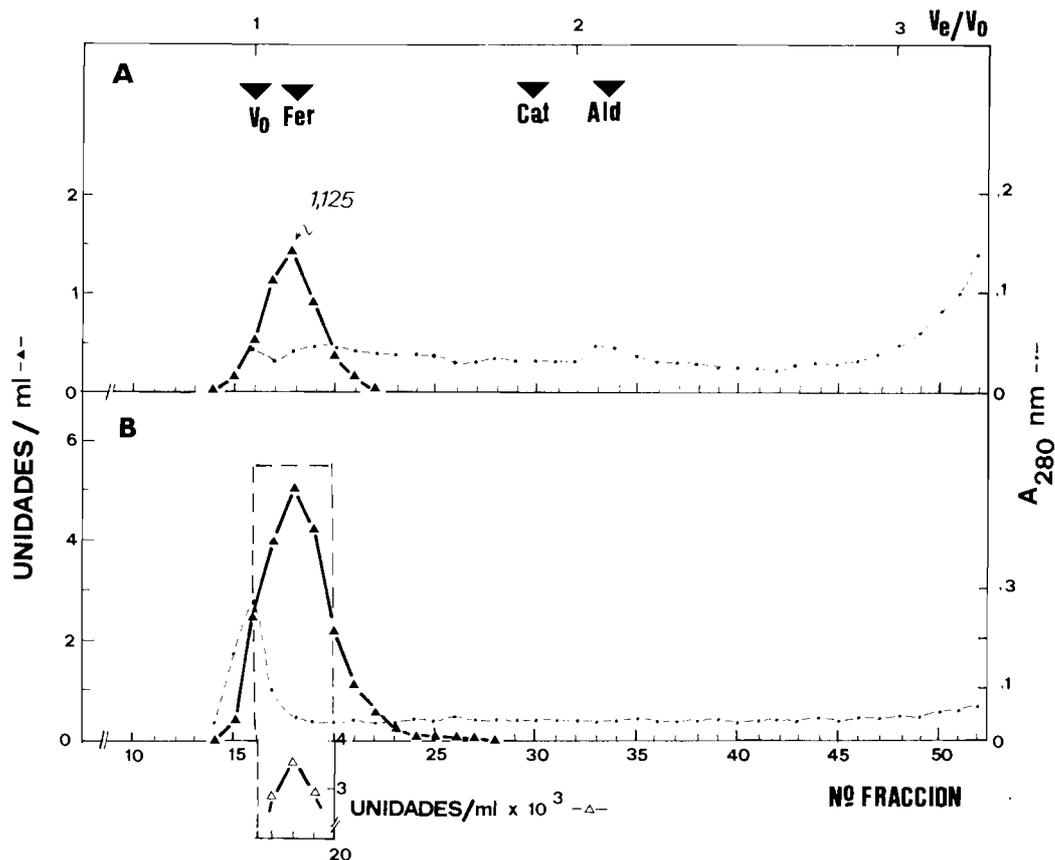


FIGURA 4. A. Calibración de una columna de Sephadex G-200 con invertasa extracelular, ferritina, catalasa y aldolasa. B. Elución de invertasa de sobrenadantes de extractos celulares; el recuadro inferior indica la elución de la inulinasa de la misma muestra.

A. Calibration of a Sephadex G-200 column with extracellular invertase, ferritin, catalase and aldolase. B. Elution pattern of invertase from supernatants of cell extracts; insert at the bottom shows the elution of inulinase from the same sample.

cítrico/fosfato y Tris/ClH/NaOH en sus correspondientes intervalos. La máxima actividad se obtuvo a pH 5.0 tanto sobre sacarosa como sobre inulina. Por otra parte, pretratamientos térmicos de 10 min a diferentes temperaturas afectaron también de modo similar ambas actividades. La desnaturalización térmica fue imperceptible hasta los 50°C y más significativa a temperaturas superiores; pretratamientos a 70°C ocasionaron la pérdida de aproximadamente un 40% de actividad sobre ambos sustratos y la inactivación fue total a 90°C (fig. 5).

La figura 6 representa la determinación de la  $K_m$  para sacarosa por el método de Lineweaver-Burk. Los inversos determinados a partir de valores experimentales obtenidos con tres muestras enzimáticas distintas se ajustaron por

mínimos cuadrados a rectas que indicaron un valor  $K_m$  igual a 14 mM. Determinaciones análogas utilizando distintas concentraciones de inulina como sustrato permitieron determinar el valor  $K_m$  para inulina, que resultó ser 0.62 mM adjudicando al polímero un peso molecular equivalente a 5.000 dalton.

## DISCUSIÓN

A la vista de los datos presentados en este trabajo parece razonable asumir que en *C. utilis* existe una sola fructofuranosidasa que manifiesta una notable actividad invertasa y una actividad inulinasa lateral. Esta conclusión se alcanza, sin necesidad de recurrir a intentos de

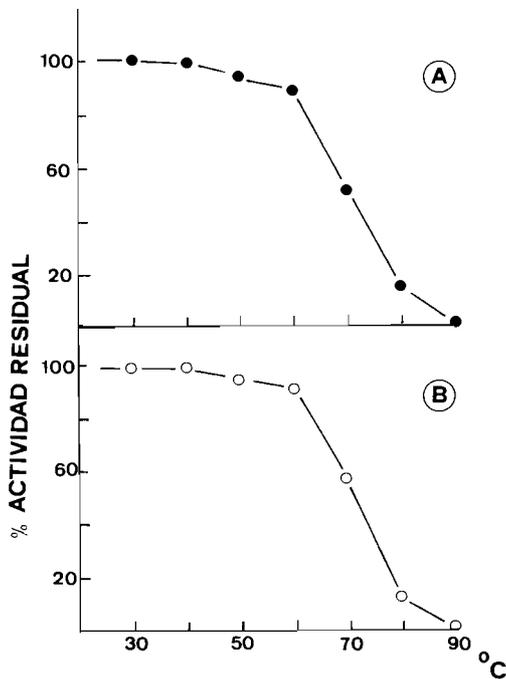


FIGURA 5. Desnaturalización de la fructofuranosidasa tras pretratamientos de 10 min a diferentes temperaturas. A, con sacarosa como sustrato. B, con inulina como sustrato.

Denaturation of fructofuranosidase after 10 min pretreatments at several temperatures. A, sucrose was used as substrate. B, inulin was used as substrate.

purificación de las respectivas actividades, al considerar las similares propiedades que ambas presentan en cuanto a producción, regulación, localización, peso molecular y por la identidad de algunos parámetros cinéticos que han sido determinados. En otros sistemas de levaduras se han descrito, en cambio, diferencias significativas entre inulinasa e invertasa (BARNETT, 1976; BELUCHE *et al.*, 1980). Nuestros resultados se aproximan, en este sentido, a lo que ha sido postulado para la actividad fructofuranosidasa de *Debaryomyces cantarellii* y *Pichia polymorpha* (GUIRAUD *et al.*, 1982; CHAUTARD *et al.*, 1981).

Como muchas enzimas catabólicas con actividad hidrolítica en microorganismos, la fructofuranosidasa estudiada está sujeta a represión catabólica. Tanto inulinasa como invertasa se expresaron temporalmente antes en los cultivos con inulina como fuente de carbono que en cultivos con glucosa o sacarosa (figs. 1 y 2). Ade-

más, los niveles de actividad alcanzados para una misma densidad celular fueron mayores en los primeros que en los segundos. Con inulina, la limitación de fuente carbonada utilizable, a consecuencia de la utilización celular de la fructosa procedente de la lenta hidrólisis del polímero, parece ser la causa de la más temprana aparición de condiciones de desrepresión que permiten la síntesis de enzima. Los mecanismos de represión son inicialmente mayores en medios con glucosa, y los niveles basales de actividad no aumentaron hasta que la concentración de dicha hexosa descendió (fig. 1A). Estas mismas condiciones parecen operar en medios con sacarosa, que es hidrolizada a glucosa y fructosa por la actividad de las células estacionarias, inicialmente desreprimidas, empleadas como inóculo (fig. 1B). En *Kluyvero-*

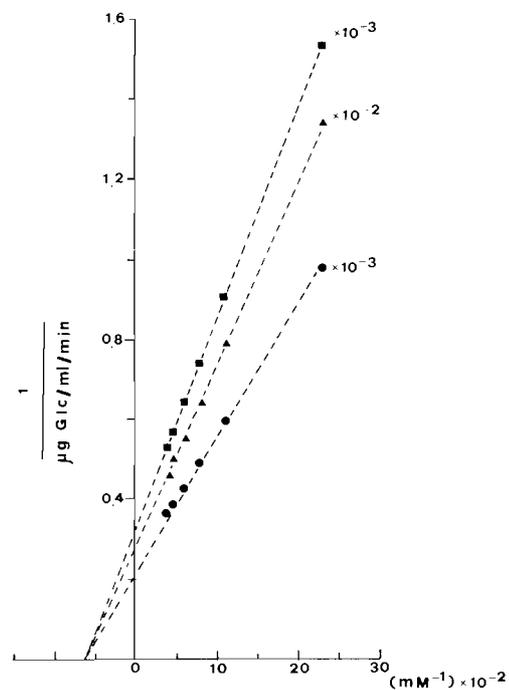


FIGURA 6. Determinación gráfica de la  $K_m$  para sacarosa por el método de los dobles inversos. Se utilizaron muestras de enzima extracelular procedentes de cada uno de los tres medios empleados para crecimiento, que diferían entre sí en niveles de actividad invertasa.

Graphic determination of the  $K_m$  value for sucrose by the double reciprocal plot method. Samples of extracellular culture fluids from each of the three media employed for growth, and showing different levels of invertase activity, were used.

*myces fragilis*, la síntesis de inulinasa y de invertasa parecen estar también bajo control de represión por catabolito carbonado (GROOTWASSINK, 1983).

La enzima parece reconocer la existencia de un enlace *beta*(2-1) en que participa al menos una molécula de fructosa, carácter que es común a sacarosa e inulina. Otros caracteres, tales como la naturaleza del otro monosacárido presente en el enlace o el tamaño global del sustrato, podrían determinar la eficiencia de la acción hidrolítica.

Gran parte de la enzima secretada aparece retenida entre la membrana y la pared celular. Tal localización implica una limitada accesibilidad de la inulina a la enzima en células enteras que, sin embargo, no parece afectar a la sacarosa por su menor peso molecular; esta situación se refleja, de hecho, en el menor cociente I/S de la actividad periplásmica en células enteras respecto a la actividad extracelular o a la detectada en extractos celulares (tabla 1). La relativa inespecificidad de sustrato de la fructofuranosidasa y su presencia en forma extracelular asegura el crecimiento de la levadura en medios con fructósidos más complejos que la sacarosa, permitiendo así la hidrólisis de la inulina *in vivo*. La liberación de la enzima en forma soluble, desde el espacio periplásmico al medio extracelular, está probablemente facilitada por procesos de relajación o remodelación de la pared celular que acompañan la morfogénesis de esta estructura, como ha sido propuesto para otras enzimas (ARNOLD, 1972; VILLANUEVA & GACTO, 1973).

## BIBLIOGRAFÍA

- ANDREWS, P. 1964. Estimation of molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochem. J.*, 91: 222-232.
- ARNOLD, W. N. 1972. The structure of yeast cell wall: solubilization of a marker enzyme by the autolytic enzyme system. *J. Biol. Chem.*, 247: 1.161-1.169.
- BARNETT, J. A. 1976. The utilization of sugars by yeasts. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 32: 125-234.
- BELUCHE, I., GUIRAUD, J. P. & GALZY, P. 1980. Inulinase activity of *Debaryomyces cantarellii*. *Folia Microbiol.*, 25: 32-38.
- CHAUTARD, P., GUIRAUD, J. P. & GALZY, P. 1981. Inulinase activity of *Pichia polymorpha*. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 28: 245-255.
- GUIRAUD, J. P., DEMEULLE, S. & GALZY, P. 1981. Inulin hydrolysis by inulinase immobilized on DEAE cellulose. *Biotechnol. Letters*, 12: 683-688.
- GUIRAUD, J. P., BERNIT, C. & GALZY, P. 1982. Inulinase of *Debaryomyces cantarellii*. *Folia Microbiol.*, 27: 19-24.
- GROOTWASSINK, J. W. D. 1983. Inducible and constitutive formation of inulinase in batch and continuous cultures of the yeast *Kluyveromyces fragilis*. *J. Gen. Microbiol.*, 129: 31-34.
- KOVALEVA, N. S. & YURKEVICH, V. V. 1978. On the existence of fructosidase of inulinase type in yeast. *6th. Internat. Special. Symp. Yeasts*. Montpellier, Abstr. SSy.
- SOMOGYI, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 195: 19-23.
- VILLANUEVA, J. R. & GACTO, M. 1973. Characterization of glucanases of yeasts. In: *Metabolism and regulation of cellular processes*: 261-283. SOUMALAINEN, H. (Ed.). Otaniemi. Helsinki.
- ZITTAN, L. 1981. Enzymatic hydrolysis of inulin: an alternative way to fructose production. *Starch*, 11: 373-377.