

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE α -AMILASA
DE *PENICILLIUM COMMUNE* PRODUCIDA MEDIANTE
FERMENTACIÓN EN FASE SÓLIDA**

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF α -AMYLASE FROM
PENICILLIUM COMMUNE PRODUCED BY SOLID STATE
FERMENTATION**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA α -AMILASA DE *PENICILLIUM
COMMUNE* PRODUZIDA MEDIANTE FERMENTAÇÃO EM FASE SÓLIDA**

Esperanza Espinel^{1,2}, Elizabeth López^{1,3}

Recibido: 17/12/08 – Aceptado: 21/08/09

RESUMEN

Este estudio reporta la purificación y caracterización parcial de una α -amilasa producida por *Penicillium commune* mediante fermentación en fase sólida, empleando yuca blanca colombiana (*Manihot esculenta* Crantz) como soporte. La enzima fue purificada por precipitación fraccionada con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sephadex A-50), cromatografía de filtración por gel (Sephadex G-75) y cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sephadex C-50) obteniendo una actividad específica final de 314,82 U/mg, un grado de purificación del orden de 62 y un rendimiento de 9%. La purificación hasta la homogeneidad fue confirmada por SDS-PAGE. El peso molecular estimado fue 35 kDa. La enzima mostró má-

xima actividad de hidrólisis de almidón soluble con pH 6,0, y estabilidad en un intervalo de pH de 5,0-7,0. La estabilidad térmica de la enzima se presentó en el intervalo de temperatura 0-50 °C y su temperatura óptima fue 70 °C. Los iones Ca^{2+} , Ba^{2+} y Ag^{+} aumentaron significativamente la actividad de la enzima, siendo el ión Ca^{2+} el que tuvo el más alto poder activador. Cu^{2+} no alteró significativamente la actividad de la enzima, mientras que Li^{+} y Fe^{3+} la disminuyeron ligeramente (13%), y Co^{2+} y Hg^{2+} la disminuyeron 25% y 40% respectivamente. Los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ fueron calculados usando la linealización de Lineweaver-Burk, con el resultado $K_m = 0,48$ mg/mL y $V_{m\acute{a}x} = 5,85$ μmol glucosa/min. Entre los principales productos de hidrólisis del almidón de yuca se encuentran la maltosa

1 Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Bogotá, Colombia.

2 Dirección actual Colegio Marruecos y Molinos IED, SED. Bogotá, Colombia. neespinelb@unal.edu.co

3 melopezr@unal.edu.co

y la glucosa, este resultado proporciona evidencia de que la enzima es capaz de romper los enlaces glicosídicos α -1,4 del almidón, comportamiento característico de una α -amilasa.

Palabras clave: α -amilasa, *Penicillium commune*, fermentación en fase sólida, yuca blanca colombiana.

ABSTRACT

This study reports the purification and partial characterization of an α -amylase from *Penicillium commune* produced by solid state fermentation using colombian white tapioca (*Manihot esculenta Crantz*) as support. The enzyme was purified by ammonium sulphate precipitation, anion exchange chromatography (DEAE-Sephadex A-50), gel filtration chromatography (Sephadex G-75) and cation exchange chromatography (CM-Sephadex C-50). A purification factor of 62 with a 9% yield and final specific activity of 314.82 U/mg were recorded. Purification to homogeneity was confirmed by SDS PAGE. The molecular weight was estimated to be 35 kDa. The enzyme shows maximal activity in the soluble starch hydrolysis at pH 6.0, and is stable in a range of pH from 5.0 to 7.0. Thermal stability was in the range of temperature from 0 to 50 °C, and its optimal temperature was 70 °C. Ions Ca^{2+} , Ba^{2+} and Ag^{+} significantly increase the activity of the enzyme, with ion Ca^{2+} as the highest activator. Cu^{2+} does not alter significantly the activity of the enzyme, whereas Li^{+} and Fe^{3+} decrease it slightly (13%) and Co^{2+} and Hg^{2+} decrease it 25% and 40% respectively. $K_m = 0.48$ mg/mL and $V_{max} = 5.85$ μmol glucose/min were calculated using the linearization of Lineweaver-Burk.

Among hydrolysis products of tapioca starch are maltose and glucose, this result provides evidence of the enzyme ability to hydrolyze the starch α -1,4 glucosidic linkages, a characteristic behavior of an α -amylase.

Key words: α -amylase, *Penicillium commune*, solid state fermentation, colombian white tapioca.

RESUMO

Este estudo reporta a purificação e caracterização parcial de uma α -amilasa produzida por *Penicillium commune* mediante fermentação em fase sólida usando mandioca branca colombiana (*Manihot esculenta Crantz*) como suporte. A enzima foi purificada por precipitação fracionada com sulfato de amônio, cromatografia de intercâmbio aniônico (DEAE-Sephadex A-50), cromatografia de filtração por gel (Sephadex G-75) e cromatografia de intercâmbio catiónico (CM-Sephadex C-50) obtendo uma actividade específica final de 314.82 U/mg, um grau de purificação na ordem de 62 e um rendimento de 9%. A purificação até à homogeneidade foi confirmada por SDS-PAGE. O peso molecular estimado foi de 35 kDa. A enzima mostrou máxima actividade de hidrólises de amido solúvel a pH 6.0, e estabilidade num intervalo de pH de 5.0-7.0. A enzima foi estável num intervalo de temperatura de 0-50 °C, e sua temperatura óptima de reacção foi de 70°C. Íons Ca^{2+} , Ba^{2+} e Ag^{+} aumentaram significativamente a actividade da enzima, sendo o íão Ca^{2+} , o que teve o mais alto poder indutor. Cu^{2+} não alterou significativamente a actividade da enzima, enquanto que Li^{+} e Fe^{3+} a diminuíram ligeiramente (13%), e Co^{2+} e Hg^{2+} a

diminuían 25% e 40% respectivamente. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram calculados usando a linearização de Lineweaver-Burk, obtendo $K_m = 0.48$ mg/mL e $V_{m\acute{a}x} = 5.85$ μ mol glucosa/min. Entre os principais produtos de hidrolises do amido de mandioca encontram-se a maltosa e glucosa; este resultado proporciona evidencia de que a enzima e capaz de romper os enlaces glicosidicos α -1,4 do amido, comportamento característico de uma α -amilasa.

Palavras-chave: α -amilasa, *Penicillium commune*, fermentação em fase sólida, mandioca branca colombiana.

INTRODUCCIÓN

Las α -amilasas son enzimas que catalizan al azar la hidrólisis de enlaces glicosidicos α -1,4 de polisacáridos como el almidón y el glicógeno, para producir maltosa, oligosacáridos de diferentes tamaños y cadenas más o menos ramificadas llamadas dextrinas límite (1). Son de gran importancia en la industria alimenticia, textil, papelera y farmacológica, y aunque las fuentes productoras de α -amilasas incluyen plantas, animales y microorganismos, son las enzimas microbianas las que encuentran mayor demanda en aplicaciones industriales (2). Tradicionalmente la producción de α -amilasas se ha llevado a cabo mediante procesos de fermentación líquida sumergida (FLS) debido al mayor control de factores ambientales como temperatura y pH, sin embargo, la fermentación en fase sólida (FFS) constituye una alternativa interesante puesto que los metabolitos se concentran, y los procesos de purificación son menos costosos (3, 4). Los medios empleados en FFS son semejantes en textura al hábitat

natural de hongos filamentosos como *Penicillium commune*, lo que genera mayores rendimientos en la producción de enzimas y la mínima degradación por acción de proteasas (5).

Cada una de las aplicaciones industriales de las α -amilasas requiere propiedades únicas respecto a especificidad, estabilidad, temperatura y dependencia del pH (6), y la búsqueda de enzimas que presenten propiedades diferentes a las conocidas se mantiene como un tema de interés en investigación.

Recientemente se ha reportado la producción de α -amilasa por hongos del género *Penicillium* (7, 8), sin embargo, en estos trabajos no se lleva a cabo la purificación y posterior caracterización de la enzima, etapas fundamentales para establecer su potencial en aplicaciones biotecnológicas.

En esta publicación se describe la producción, purificación y caracterización cinética de una α -amilasa obtenida a partir de una cepa nativa de *Penicillium commune* mediante fermentación en fase sólida, empleando yuca blanca colombiana (*Manihot esculenta crantz*) como soporte.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y microorganismo

Una cepa de *Penicillium* sp. fue donada por el laboratorio de microbiología del departamento de farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. El microorganismo se mantuvo a temperatura ambiente en medio Sabraud agar-maltosa 4%. El almidón de yuca empleado fue adquirido en Ciacomeq Ltda., Bogotá, Colombia. La yuca (*Manihot esculenta Crantz*) fue com-

prada en un supermercado en Bogotá y fue rallada manualmente luego de retirar la cáscara empleando un rallador de plástico doméstico convencional.

Identificación del microorganismo

La identificación se realizó mediante técnicas de biología molecular en el laboratorio de micología y fitopatología (LAMFU) de la Universidad de los Andes de Bogotá. El *Penicillium* sp. fue crecido en medio líquido SDY (sucrosa, dextrosa y extracto de levadura) (9). A partir de la biomasa generada se realizó una extracción de ADN total a través del método de extracción por fenol-clorofórmico (10). Posteriormente, se amplificó por PCR la región ITS1- 5,8S-ITS2 de la subunidad ribosomal, con los *cebadores* universales ITS4 e ITS5 (11). La región amplificada fue secuenciada por la compañía Macrogen (Seúl, Corea). La identificación molecular se realizó comparando la secuencia obtenida contra todas las secuencias nucleotídicas de hongos reportadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), los análisis bioinformáticos se hicieron utilizando el algoritmo Blastn. Los alineamientos con mayor puntaje y máxima identidad obtenidos (*E value* = 0; identidad 100%) permiten identificar el microorganismo como perteneciente a la especie *P. commune*.

Obtención del inóculo

El micelio de *P. commune* fue suspendido en agua estéril, con agitación constante durante 10 min. se filtró sobre gasa estéril en condiciones asépticas para retirar el micelio sobrenadante, y se realizó el con-

teo de esporas con un hemacitómetro. Una suspensión de 1×10^7 esporas/mL se utilizó para inocular los medios de fermentación.

Medio de fermentación y producción enzimática

Los medios de fermentación se prepararon tomando como referencia el medio Czapek-Dox (9), y se suplementaron con CaCl_2 . Se formularon dos medios, según la fuente de carbono, almidón de yuca o yuca rallada, y se realizaron dos tipos de fermentaciones, FFS y FLS, en condiciones estáticas.

Para las FFS el medio se preparó con 10 g de almidón ó 10 g de yuca rallada, humedecidos con 10 mL de solución de sales. El medio para la FLS contenía 3,0 g de almidón de yuca ó 3,0 g de yuca rallada, suspendidos en 100 mL de solución de sales diluida 1:10. La solución de sales contenía (g/100 mL de agua destilada): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3,00; MgSO_4 , 0,50; KCl, 0,50; FeSO_4 , 0,01; K_2HPO_4 , 1,00; CaCl_2 , 0,15.

Los medios se esterilizaron a 121 °C y 15 psi por 15 min, se inocularon con 1 mL de suspensión de esporas de *P. commune* y se incubaron a 22 °C. Se hizo seguimiento cada 24 horas de la producción de la enzima. Para la FLS se separó el hongo mediante centrifugación por 30 min a 8 000 rpm, en una centrífuga MLW modelo T52; el sobrenadante constituyó el extracto crudo. En el caso de la FFS se adicionaron 50 mL de buffer fosfato 0,1 M pH 7,0, se agitó mecánicamente durante 30 min en un agitador de placa MLW modelo Thys 2 a 80 oscilaciones completas por minuto, se filtró la solución sobre algodón y se centrifugó

por 30 min a 8 000 rpm, el sobrenadante constituyó el extracto crudo. Se tomaron 10 mL de cada extracto crudo y se dializaron contra agua destilada para realizar medidas de concentración de proteína y actividad enzimática.

El trabajo se continuó empleando la FFS con yuca rallada, por ser el medio en el cual se obtuvo la mayor producción de enzima.

Producción de la enzima por fermentación en fase sólida

Se emplearon bandejas de aluminio (22,50 cm X 16,50 cm X 2,50 cm), en cada una se puso una capa de 1 cm de espesor aproximadamente de la mezcla de 100 g de yuca rallada y 100 mL de solución de sales. Las bandejas con el medio se esterilizaron a 121 °C y 15 psi durante 15 min y se inocularon con 3 mL de la suspensión de esporas. La incubación se realizó a 22 °C durante siete días. Para obtener el extracto crudo se añadieron 150 mL de buffer fosfato 0,1 M pH 7,0, se agitó mecánicamente durante una hora a temperatura ambiente en un agitador de placa MLW modelo Thys 2 a 80 oscilaciones completas por minuto, y se filtró la solución sobre algodón para retirar los sólidos gruesos. Al residuo se le realizó una segunda extracción bajo las mismas condiciones y se juntaron los dos extractos. El filtrado total se centrifugó a 8 000 rpm por 30 min, en una centrifuga MLW modelo T52, el precipitado se descartó y se obtuvo un sobrenadante con un volumen de 2085 mL. De este sobrenadante se tomaron 100 mL para realizar ensayos preliminares de precipitación fraccionada con sulfato de amonio.

Determinación de actividad enzimática y cuantificación de proteínas

Para medir la actividad α -amilasa se utilizó el método de Nelson-Somogyi (12). La mezcla de reacción contiene 1 mL de solución de almidón soluble al 1% (p/v), 200 μ L de una dilución apropiada de la muestra que contiene la enzima, y 800 μ L de CaCl_2 5mM. Luego de 20 min de reacción a 37 °C, se adicionan 500 μ L del reactivo de Somogyi y se lleva la mezcla a un baño María a temperatura de ebullición. Pasados 10 min, se retira la mezcla del baño y se adicionan 500 μ L del reactivo de Nelson, se completa el volumen a 10 mL con agua destilada y se realiza la determinación colorimétrica a 500 nm (espectrofotómetro Genesys 5).

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ g de glucosa por minuto bajo las condiciones del ensayo, 37 °C, pH 6,0. La actividad específica se define como las unidades de actividad por miligramo de proteína.

La concentración de proteínas fue determinada por el método colorimétrico de Bradford (13), empleando albúmina sérica bovina como proteína patrón.

Purificación de la enzima

Precipitación con sulfato de amonio

El extracto crudo fue sometido a precipitación fraccionada con sulfato de amonio. La fracción con la proteína de interés precipitó entre 50 y 80% de saturación. Este precipitado se disolvió en el mínimo volumen de agua destilada, se dializó 24 h contra agua destilada y se liofilizó.

Cromatografía de intercambio aniónico

El liofilizado de la etapa anterior se disolvió en el mínimo volumen de buffer fosfato 50 mM, pH 6,0, y se aplicó a una columna de DEAE Sephadex A-50 (2,5 x 30,0 cm) equilibrada con el mismo buffer. La elusión se realizó por medio de un gradiente discontinuo de fuerza iónica (NaCl 0,1 a 0,5 M). La velocidad de flujo fue de 30 mL/h. A cada fracción (5 ml) se le midió la absorbancia a 280 nm y la actividad enzimática. Las fracciones que contenían la proteína de interés, se mezclaron en un pool (pool DEAE-pico II), que se dializó contra agua destilada y se liofilizó.

Cromatografía de filtración por gel

El pool DEAE-pico II se disolvió en NaCl al 1% y fue sometido a cromatografía de filtración por gel sobre Sephadex G-75 (2,5 X 30,0 cm). La elusión de las proteínas se realizó con NaCl al 1%. La velocidad de flujo fue de 27 mL/h. A cada fracción (4,5 mL) se le midió la absorbancia a 280 nm y la actividad enzimática. Las fracciones que mostraron mayor actividad enzimática, se mezclaron en un pool (pool G-75-pico II) que se dializó contra agua destilada y se concentró por liofilización.

Cromatografía de intercambio catiónico

El pool G-75-pico II se disolvió en buffer fosfato 0,05 M, pH 7,0 y fue sometido a cromatografía de intercambio catiónico sobre CM Sephadex C-50 (2,5 x 30,0 cm). La elusión se realizó por medio de un gradiente discontinuo de fuerza ióni-

ca (NaCl 0,1 a 0,5 M). La velocidad de flujo fue de 27 mL/h. A cada fracción (4,5 mL) se le midió la absorbancia a 280 nm y la actividad enzimática. Las fracciones que contenían la proteína de interés, se mezclaron en un pool (pool CM-pico I) que se dializó contra agua destilada y se liofilizó.

Caracterización de la enzima***Determinación del peso molecular por electroforesis en condiciones desnaturalizantes***

Se corrieron electroforesis SDS-PAGE (14), con geles de poliacrilamida al 12%, los cuales se tiñeron con azul de Coomassie. Los marcadores de peso molecular empleados fueron de la marca Bio-Rad, con las siguientes proteínas como estándares: fosforilasa B (104 kDa), albúmina de suero bovino (83 kDa), ovoalbúmina (49 kDa), anhidrasa carbónica (37 kDa), inhibidor de la tripsina de soya (29 kDa) y lisozima (20 kDa).

Efecto del pH sobre la actividad y la estabilidad de la enzima

El pH óptimo de la enzima fue determinado realizando medidas de actividad en un rango de pH entre 2,0 y 12,0 a 37 °C. Para establecer el efecto del pH sobre la estabilidad, la enzima fue incubada a 37 °C por 1 h en diferentes buffers en un rango de pH entre 2,0 y 12,0 y la actividad residual fue determinada bajo las condiciones normales del ensayo. Se usaron buffers glicina-HCl, acetato-acético, fosfato y glicina-NaOH, todos con concentración 100 mM.

Efecto de la temperatura sobre la actividad y la estabilidad de la enzima

La temperatura óptima de la enzima fue determinada en un rango de temperatura entre 0 y 92 °C en buffer fosfato 100 mM, pH 6,0. El efecto de la temperatura sobre la estabilidad fue establecido incubando por 1 h la enzima en buffer fosfato 100 mM, pH 6,0 en un rango de temperatura entre 40 y 92 °C. La actividad residual fue determinada bajo las condiciones normales del ensayo.

Efecto de la concentración de sustrato

Se utilizaron siete concentraciones diferentes de almidón soluble (0,2-1,4 mg/mL). Las mediciones de actividad se realizaron bajo las condiciones normales del ensayo. La mezcla de reacción contenía 100 μ L de enzima purificada; 100 μ L de CaCl₂ 5 mM; 800 μ L de buffer fosfato 100 mM, pH 6,0, y 1 mL de solución de almidón. La estimación de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ se realizó a partir de la linealización de Lineweaver-Burk.

Efecto de algunos iones metálicos, EDTA y SDS sobre la actividad enzimática

Se utilizaron las siguientes sales: CuSO₄·5H₂O, CaCl₂·2H₂O, LiCl, FeCl₃·6H₂O, AgNO₃, HgCl₂, BaCl₂ y CoCl₂. La concentración final de sal en la mezcla de reacción para todos los casos fue 1,0 mM. La enzima, previamente dializada contra agua destilada, se incubó con la solución de la sal durante 30 min a 37 °C, luego se determinó la actividad residual bajo las condiciones normales del ensayo. La actividad sin adición de los io-

nes metálicos fue definida como de 100%. Para medir los efectos de EDTA y SDS, la enzima fue incubada con el componente respectivo por 30 min a 37 °C, luego se realizó la medición de actividad enzimática residual bajo las condiciones normales del ensayo. La concentración final en la mezcla de reacción para ambos compuestos fue 10 mM. La actividad en ausencia de EDTA y SDS fue considerada como de 100%.

Capacidad para hidrolizar el almidón de yuca y productos de hidrólisis

Los productos finales de hidrólisis luego de 10, 20, 30 y 60 min de incubación fueron evaluados según Hmidet *et al.* (15), mediante comparación con patrones de glucosa y maltosa en una cromatografía de capa delgada (silica gel 60 F₂₅₄ Merck), la fase móvil fue cloroformo/acético/agua (70:60:10, v/v/v) y el revelado se hizo con H₂SO₄/metanol (5:95, v/v). Los productos de hidrólisis fueron observados como manchas oscuras luego de adicionar el revelador y calentar a 120 °C por 3 min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN**Producción de la enzima**

La cinética de producción de α -amilasa en los diferentes medios de cultivo se presenta en la Figura 1.

En los medios con yuca rallada hay un incremento de la actividad α -amilasa a partir de 48 horas, con un máximo a las 168 horas (siete días), en las que la actividad enzimática fue de 8,21 U/mL para la FFS y 6,15 U/mL para la FLS. En cuanto a los medios con almidón de yuca, la acti-

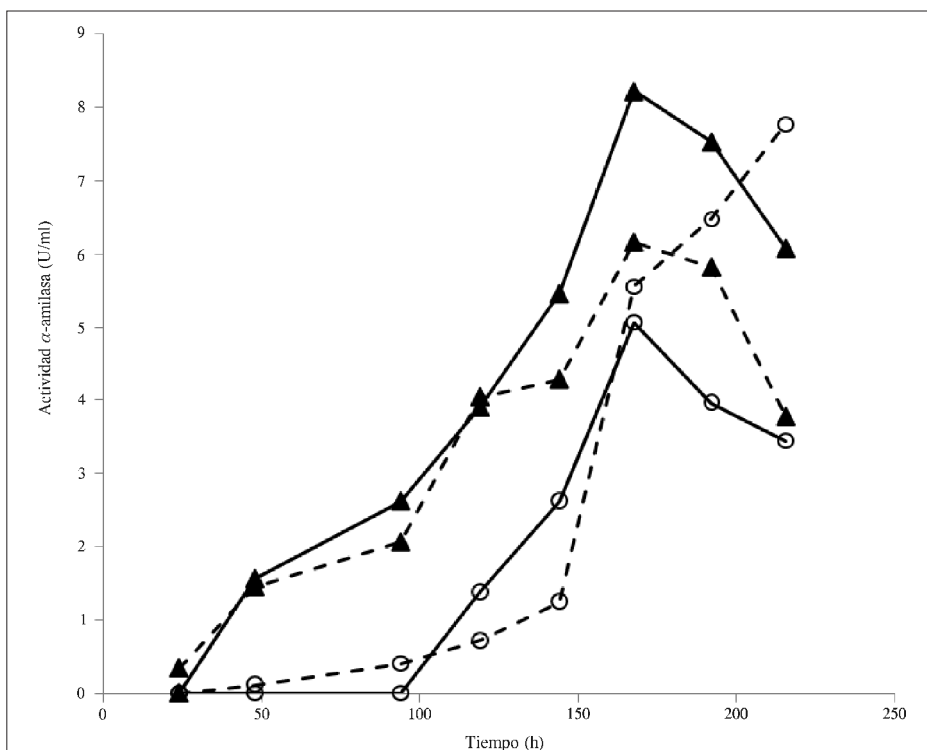


Figura 1. Actividad α -amilasa durante cultivos en FFS (-) y FLS (-) usando almidón de yuca (O) y yuca rallada (▲) como sustrato. Cada punto experimental corresponde al promedio de dos determinaciones.

vidad enzimática comienza a aumentar a partir de las 120 horas (5 días) sin alcanzar los valores observados con yuca rallada, no obstante, a partir de las 168 horas (7 días) se aprecia un incremento en la actividad enzimática en la fermentación líquida sumergida que presenta un valor máximo de 7,76 U/mL a los 10 días de observación.

El crecimiento de *P. commune*, un hongo filamentoso, se favoreció en el medio sólido empleando yuca rallada; este medio ofrecía una mayor área superficial y presentaba una textura más rugosa, semejante a las condiciones de los hábitats usuales de este microorganismo.

Los resultados obtenidos sugieren que la yuca rallada constituye un mejor soporte para la producción de α -amilasa por *P. commune* y que en caso de usar almidón de yuca en fermentación en fase sólida, la producción de la misma cantidad de α -amilasa tomaría más tiempo.

Purificación de la enzima

La purificación de α -amilasa de *P. commune* se resume en la Tabla 1. El extracto crudo fue precipitado por adición de sulfato de amonio, la mayor actividad α -amilasa se encontró en la fracción 50-80%, esta fracción fue aplicada a una columna de DEAE Sephadex A-50, cuyo perfil de elusión (Figura 2) mostró un úni-

Tabla 1. Resumen de la purificación de α -amilasa de *Penicillium commune*.

Etapas de purificación	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Grado de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	1985	873,40	4446,40	5,09	1,00	100
Precipitado sulfato de amonio fracción 50 – 80%	10	220,08	3414,14	15,51	3,05	76
DEAE-Sephadex A-50	5	49,65	2660,55	53,59	10,53	59
Sephadex G-75	2	3,66	535,61	146,34	28,75	12
CM Sephadex C-50	0.7	1,28	402,97	314,82	61,85	9

co pico con actividad α -amilasa luego de la adición de buffer fosfato 50 mM, pH 6,0 NaCl 0,2 M. Las fracciones del pico con actividad fueron reunidas en el pool DEAE-pico II, el cual fue dializado contra agua destilada y liofilizado, alcanzando un grado de purificación de 10,53.

Este pool fue aplicado a una columna de Sephadex G-75, la elusión se realizó

con NaCl al 1%. El perfil cromatográfico (Figura 3) mostró un único pico de actividad α -amilasa, las fracciones del pico activo fueron reunidas en el pool G-75 pico II, el cual fue dializado contra agua destilada y liofilizado, con este paso se alcanzó un grado de purificación de 28,75.

El pool G-75 pico II se disolvió en buffer fosfato 50 mM, pH 7,0, y fue apli-

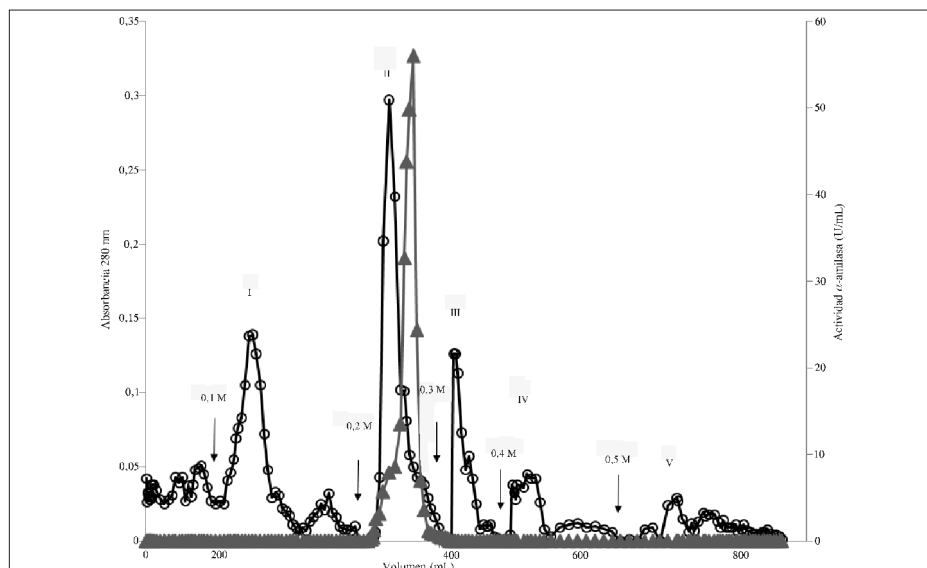


Figura 2. Perfil de elución sobre DEAE-Sephadex A-50. (O) Absorbancia 280 nm; (▲) actividad enzimática. Cada punto experimental corresponde al promedio de dos determinaciones.

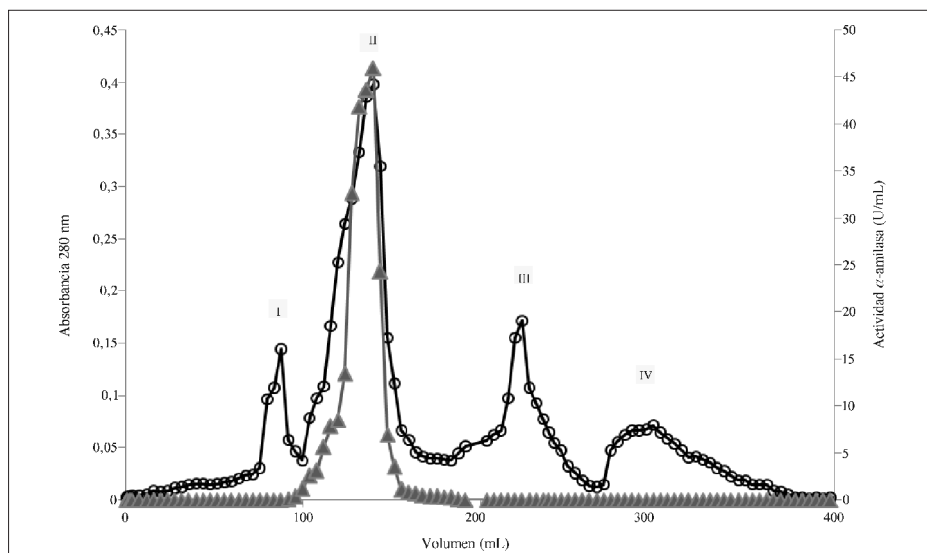


Figura 3. Perfil de elución sobre Sephadex G-75. (O) Absorbancia 280nm; (▲) actividad enzimática. Cada punto experimental corresponde al promedio de dos determinaciones.

cado a una columna de CM Sephadex C-50. El perfil de elución (Figura 4) mostró un único pico con actividad α -amilasa luego de la adición de buffer fosfato 50 mM, pH 7,0 NaCl 0,1 M. Las fracciones con actividad fueron reunidas en el pool CM- pico I, el cual fue dializado contra agua destilada, liofilizado y disuelto en buffer fosfato 50 mM, pH 7,0, alcanzando un grado de purificación final de 61,85. Este pool mostró una sola banda en la electroforesis SDS-PAGE (Figura 5), indicando la purificación hasta la homogeneidad de la enzima.

Peso molecular

La comparación de la movilidad electroforética de la α -amilasa de *P. commune* con la de los marcadores de peso molecular en una electroforesis SDS-PAGE (Figura 6) permite establecer un peso molecular de 35 kDa. El rango de peso molecular para las α -amilasas oscila entre

10 y 210 kDa (2), sin embargo, la mayoría de las α -amilasas microbianas tienen su peso molecular entre 30 – 70 kDa, rango en el que se encuentra la α -amilasa de *P. commune*.

Efecto del pH sobre la actividad y la estabilidad de la enzima

Cuando la actividad de la enzima fue ensayada con diferentes valores de pH, la máxima actividad se obtuvo con pH 6,0.

En otros estudios, el pH óptimo de la α -amilasa de *Penicillium chrysogenum* fue de 5,0 (7) y el de la α -amilasa de *Penicillium griseofulvum* de 5,5 (8). Aunque el pH óptimo para las α -amilasas varía entre 2,0 y 12,0 (2), la mayoría de las α -amilasas microbianas tienen su pH óptimo en el rango ligeramente ácido a neutro, rango en el que se encuentra el pH óptimo de la α -amilasa de *Penicillium commune*.

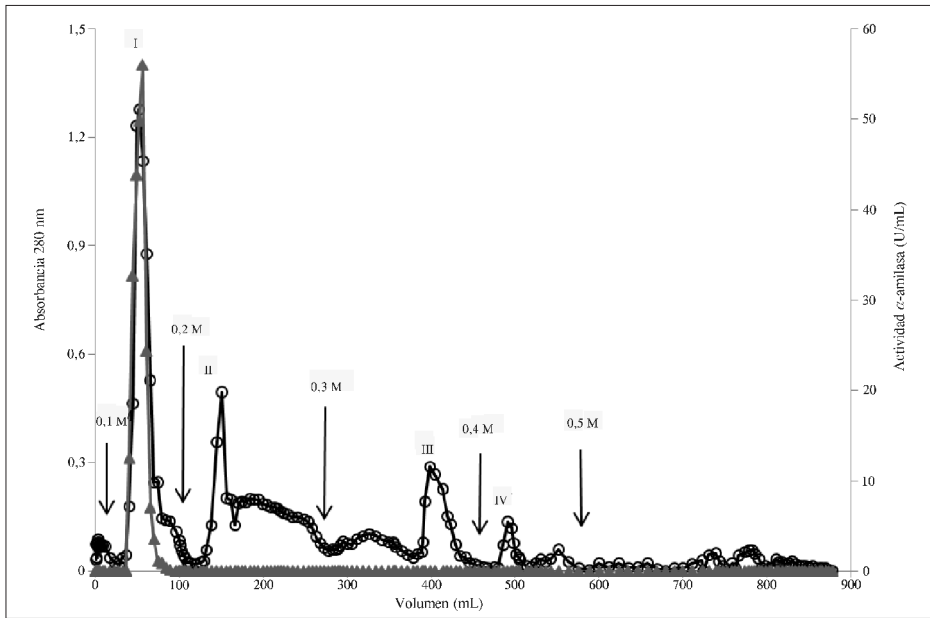


Figura 4. Perfil de elución sobre CM Sephadex C-50. (O) Absorbancia 280nm; (▲) actividad enzimática. Cada punto experimental corresponde al promedio de dos determinaciones.

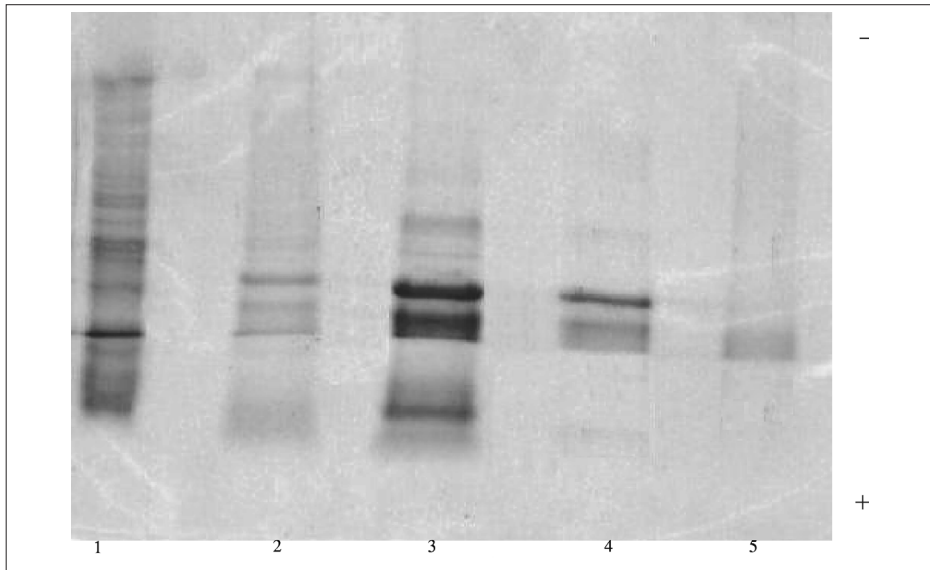


Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones de purificación de α -amilasa de *Penicillium commune* 1) Extracto crudo 2) Sulfato de amonio fracción 50-80% 3) DEAE-pico II 4) G-75 pico II 5) CM-pico I.

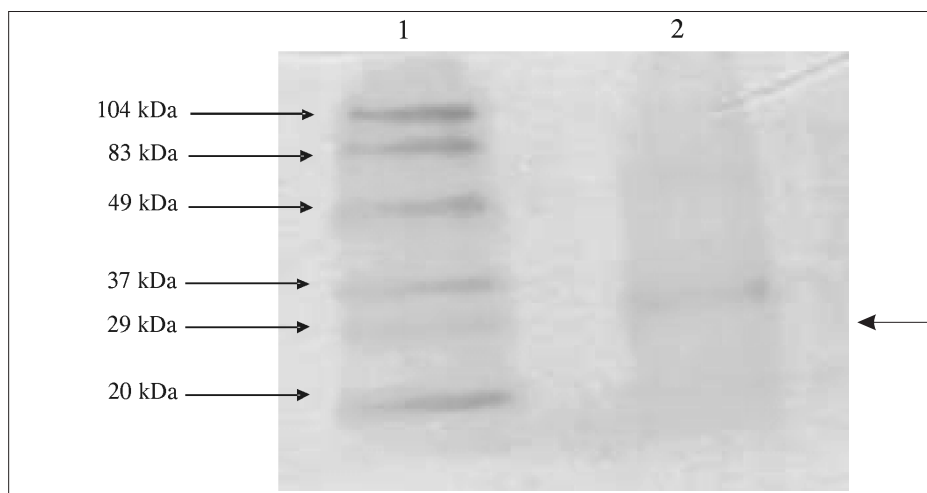


Figura 6. Determinación del peso molecular de α -amilasa de *Penicillium commune* por electroforesis SDS-PAGE. 1) Marcadores de peso molecular. 2) α -amilasa purificada de *Penicillium commune*.

Luego de la incubación de la enzima por 1 h en buffer de diferente pH, se observa que la enzima fue estable en el rango de pH 5,0-7,0. La enzima retuvo 95% de su actividad con un pH 5,0 y 98,8% con un pH 7,0. Rangos de estabilidad en el pH similares han sido reportados para las α -amilasas de *Aspergillus awamori* (16) y *Thricoderma viride* (17).

Efecto de la temperatura sobre la actividad y la estabilidad de la enzima

La temperatura a la cual se alcanza la máxima actividad y, por tanto, corresponde a la temperatura óptima de reacción, es 70 °C. Cuando se sobrepasa este valor, la actividad disminuye rápidamente porque la enzima se va desnaturalizando.

Como se puede observar en la Figura 7, cuando la enzima fue incubada durante una hora en buffer fosfato 100 mM, pH 6,0 en un rango de temperatura entre 40 y 92 °C, la actividad decreció rápidamente a partir de 50 °C, indicando que el rango

de estabilidad térmica de la enzima es 0-50 °C. Vale la pena destacar que la enzima conserva 35% de su actividad después de ser calentada una hora a 92 °C. Una consecuencia de orden práctico derivada de este hallazgo, es la necesidad de revisar cuál es el tiempo requerido para la inactivación total de la enzima en las medidas de actividad por el método de Nelson-Somogyi.

Con los datos obtenidos en la determinación de la temperatura óptima se construyó una gráfica de Arrhenius (Figura 8) para así poder analizar la inactivación térmica de la enzima. El cambio de pendiente cerca a los 50 °C que se observa en la gráfica, sugiere que la incubación por periodos prolongados de tiempo a esta temperatura induce un cambio conformacional de la enzima. Un caso de comportamiento similar fue reportado por Uchino, para una α -amilasa de *Bacillus* sp. (18).

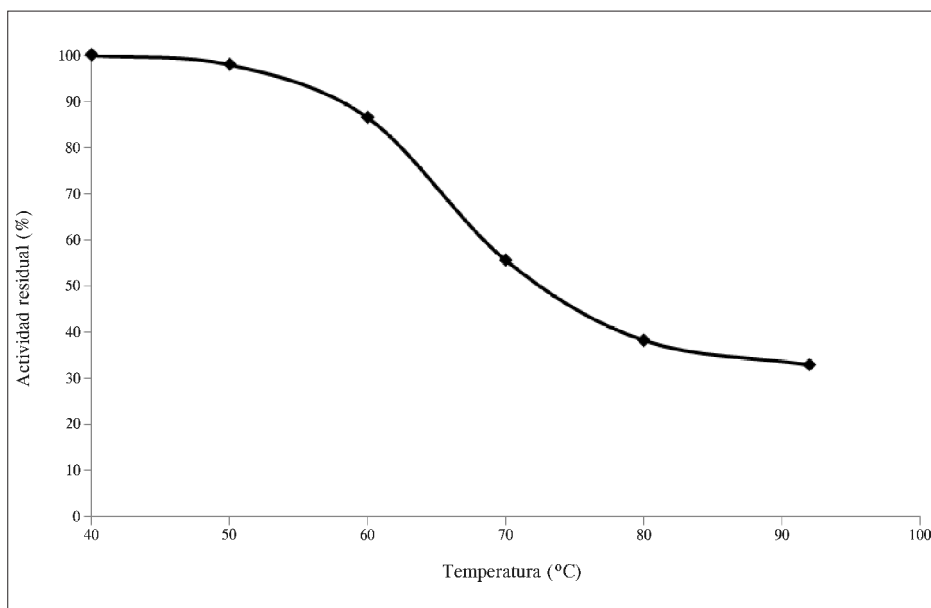


Figura 7. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de α -amilasa de *Penicillium commune*. Cada punto experimental corresponde al promedio de dos determinaciones.

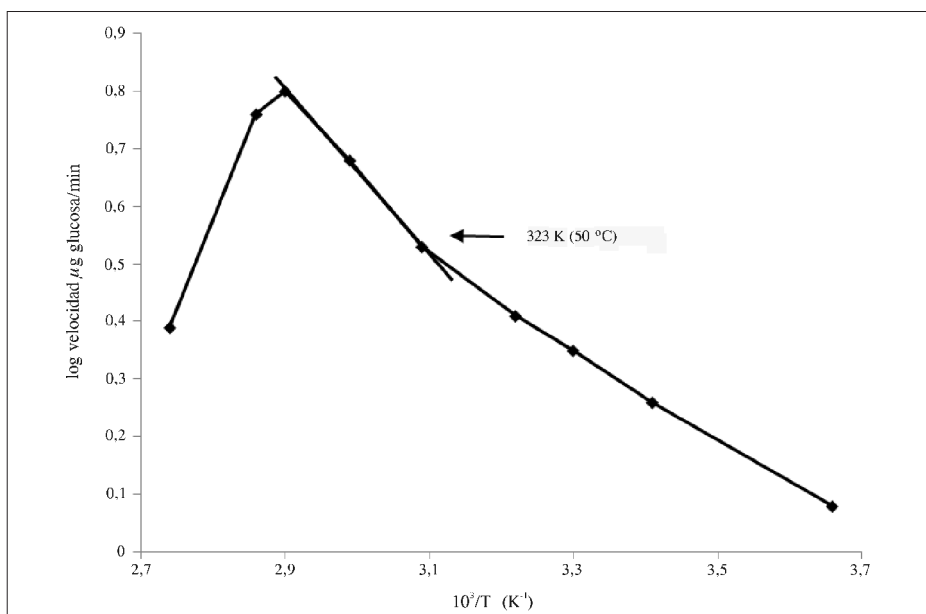


Figura 8. Gráfica de Arrhenius. Se observan dos líneas rectas con cambio de pendiente cerca de los 50 °C. Cada punto experimental corresponde al promedio de dos determinaciones.

Parámetros cinéticos K_m y $V_{máx}$

Los valores de K_m y $V_{máx}$ determinados usando la linealización de Lineweaver-Burk (Figura 9) fueron 0,48 mg/mL y 5,85 μ mol glucosa/min, respectivamente. La α -amilasa de *Penicillium commune* presenta una cinética típica de Michaelis-Menten y posee una alta afinidad por el almidón soluble respecto a otras α -amilasas microbianas como *Thermofibida fusca* (0,88 mg/mL), *Aureobasidium pullulans* (5,75 mg/mL) y *Bacillus* sp. (1,64 mg/mL) (18, 19, 20), sin embargo, es muy similar a la del hongo filamentoso *Aspergillus fumigatus* (0,42 mg/mL) (21).

Efecto de algunos iones metálicos, del EDTA y del SDS sobre la actividad enzimática

El efecto de algunos iones metálicos, del EDTA y del SDS sobre la actividad enzimática de la α -amilasa de *Penicillium commune* se muestra en la Figura 10. Las

α -amilasas son proteínas pequeñas que contienen por lo menos un ión Ca^{2+} por molécula. La cantidad de iones Ca^{2+} puede variar de uno a diez dependiendo del origen de la enzima. De acuerdo con Gupta, *et al.* (2), para lograr una completa remoción de los iones Ca^{2+} no basta con dializar contra agua destilada, se hace necesario tratar la enzima con EDTA o EGTA. Además, según Nielsen, *et al.* (22), de los tres iones calcio (CaI, CaII, CaIII) que la α -amilasa de *Bacillus halmapalus* contiene, es posible remover CaIII sin observar cambios estructurales significativos, pero no CaI o CaII. Lo anterior justifica que luego de la diálisis contra agua destilada no se genere pérdida total de la actividad enzimática y, por lo tanto, se pueda evaluar el efecto de los iones escogidos, del EDTA y del SDS.

Como se puede notar, Ca^{2+} , Ba^{2+} y Ag^+ aumentan significativamente la actividad de la enzima, siendo el ión Ca^{2+} el que tiene el más alto poder activador. El efecto activador del calcio puede estar re-

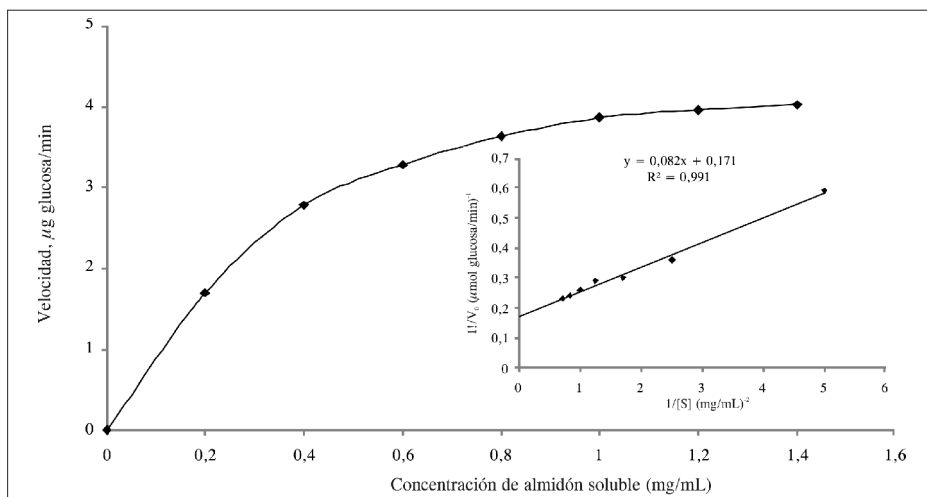


Figura 9. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de α -amilasa de *Penicillium commune*. $K_m=0,48$ mg/ml, $V_{máx}=5,85$ μ mol glucosa/min.

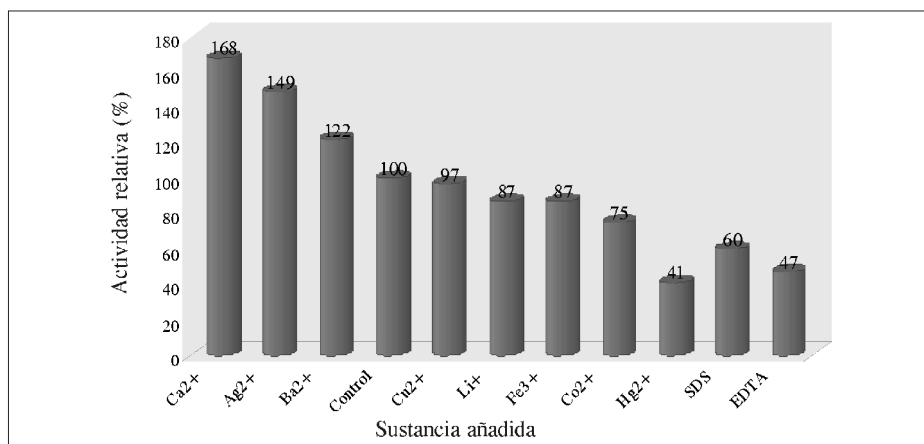


Figura 10. Efecto de algunos iones metálicos, del EDTA y del SDS sobre la actividad enzimática. La actividad fue determinada luego de la incubación de la enzima por 30 min a 37 °C con diferentes sales, EDTA y SDS. La concentración final de los iones metálicos fue 1 mM, la de EDTA y SDS 10 mM. Al control no se le adicionaron sales, EDTA o SDS.

lacionado con interacciones adicionales favorables que contribuyen a la neutralización de las cargas negativas en la de los dominios estructurales A y B de la enzima (22). Cu²⁺ no altera significativamente la actividad de la enzima, mientras que Li⁺ y Fe³⁺ la disminuyen ligeramente y Co²⁺ y Hg²⁺ la disminuyen considerablemente.

La inhibición por iones mercurio sugiere, tal como lo indican Li, *et al.* (20), que residuos aminoácidos con grupos sulfhidrilo o imidazol son importantes en la función de la enzima. Esta afirmación concuerda con el hecho de que varios residuos de histidina (His210, His122, numeración para *Taka amilasa*) están implicados en el mecanismo catalítico de las α -amilasas. El agente quelante EDTA y el surfactante SDS también mostraron acción inhibitoria sobre la actividad de la enzima. La inhibición que ocasiona el EDTA apoya la sugerencia de que la α -amilasa de *P. commune* contiene calcio, y que su actividad es dependiente de este ión. En cuanto al SDS, se corrobora

su efecto sobre la estructura terciaria de la enzima, sin que se presente completa desnaturalización con la concentración ensayada.

Capacidad para hidrolizar el almidón de yuca y productos de hidrólisis

El análisis cromatográfico de los productos de hidrólisis del almidón de yuca por α -amilasa de *Penicillium commune* se muestra en la Figura 11. Entre los principales productos de hidrólisis se encuentran maltosa y glucosa. La producción de trazas de glucosa fue determinada desde los 10 min de reacción, así como la formación de pequeñas cantidades de maltosa y dextrinas, cuya cantidad fue aumentando a medida que aumentaba el tiempo de reacción. Este resultado proporciona evidencia de que la enzima presenta el comportamiento característico de una α -amilasa, ya que es capaz de romper los enlaces glicosídicos α -1,4 del almidón de yuca, lo cual es de interés por su potencial en la producción de biocombustibles.

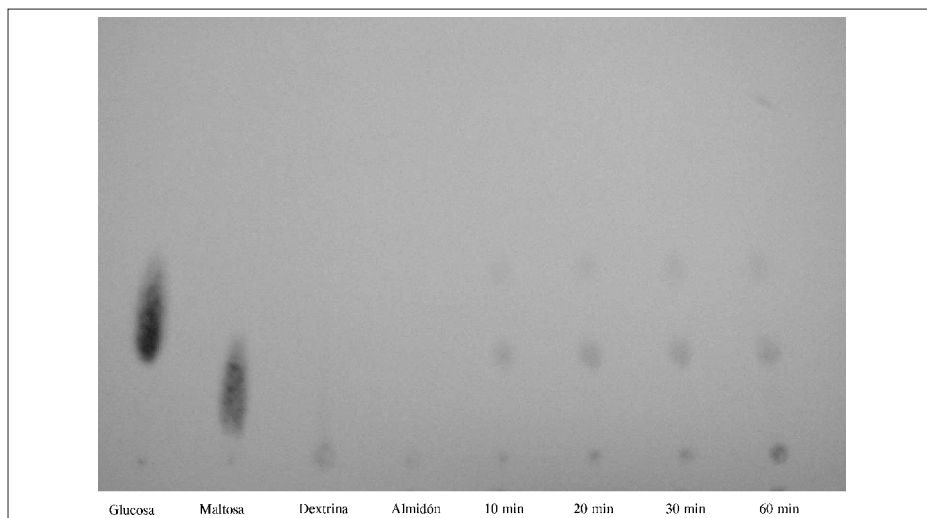


Figura 11. Cromatografía de capa delgada de los productos de hidrólisis de almidón de yuca por α -amilasa de *Penicillium commune*. Las muestras fueron removidas con intervalos determinados de tiempo.

Resultados similares en la hidrólisis de almidón han sido reportados para las α -amilasas de *Penicillium griseofulvum* y *Penicillium chrysogenum* (7, 8).

CONCLUSIONES

Tanto el almidón de yuca como la yuca blanca colombiana (*Manihot esculenta crantz*) empleados como soporte, permiten el crecimiento de *Penicillium commune*. En las condiciones usadas en esta investigación, el microorganismo sólo produce una α -amilasa. La comparación de las cinéticas de producción de la enzima en cultivos en FFS y FLS estático, permite establecer que la fermentación en fase sólida con yuca blanca rallada arroja los mejores resultados en cuanto a actividad α -amilasa.

La enzima presenta un pH óptimo de 6,0 y fue estable en un rango de pH entre 5,0 y 7,0 a 37 °C, además tiene una temperatura óptima de 70 °C y presenta má-

xima estabilidad en el rango 0-50 °C. Con temperaturas superiores probablemente la enzima adquiere un estado conformacional que le permite conservar 35% de su actividad después de ser calentada a 92 °C durante una hora.

La gráfica de Arrhenius presenta un cambio de pendiente cerca a los 50 °C, sugiriendo que la incubación por periodos prolongados de tiempo a esta temperatura induce un cambio conformacional de la enzima.

Dado que Ca^{2+} tiene el más alto poder activador y el EDTA causa una fuerte inhibición, se confirma que la α -amilasa de *Penicillium commune* contiene calcio, y que su actividad es dependiente de este ión.

La α -amilasa de *Penicillium commune* es activa sobre almidón de yuca usado como sustrato, lo cual se evidencia en la producción de maltosa y glucosa en la

cromatografía de capa delgada sobre sílica gel.

AGRADECIMIENTOS

A la profesora Pilar Meléndez del departamento de farmacia de la Universidad Nacional de Colombia por el suministro de la cepa de *Penicillium* sp. y al Sr. Gregorio Medina del laboratorio de microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Nacional de Colombia por el servicio de liofilización.

A las profesoras Luisa Castiblanco y Silvia Restrepo, del laboratorio de micología y fitopatología (LAMFU) de la Universidad de los Andes de Bogotá, por su valiosa colaboración en la identificación del *Penicillium commune*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Maheshwari, R.; Bharadwaj, G.; Bhat, M. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000. **64**: 461-488.
2. Gupta, R.; Gigras, H.; Mohapatra, H.; Goswami, V.; Chauhan, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*. 2003. **38**: 1599-1616.
3. Pandey, A.; Soccol, C.R. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*. 2000. **35**: 1153-1169.
4. Soni, S. K.; Arshdeep, K.; Gupta, J. K. A solid state fermentation based bacterial α -amylase and fungal glucoamylase system and its suitability for the hydrolysis of wheat starch. *Process Biochemistry*. 2003. **39**: 185-192.
5. Hölker, U.; Lenz, J. Solid- state fermentation – Are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*. 2005. **8**: 301-306.
6. McTigue, M. A.; Kelly, C. T.; Doyle, E. M.; Fogarty, W. M. The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus* sp. IMD 370. *Enzyme and Microbial Technology*. 1995. **17**: 570-573.
7. Balkan, B. y Ertan, F. Production and properties of α -amylase from *Penicillium chrysogenum* and its application in starch hydrolysis. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2005. **35**: 169-178.
8. Ertan, F.; Yagar, H.; Balkan, B. Some properties of free and immobilized α -amylase from *Penicillium griseofulvum* by solid state fermentation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2006. **36**: 81-91.
9. Merck. Manual de medios de cultivo. 1990. p. 77.
10. Sambrook, J.; E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., vol. I. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
11. White, T. J.; T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315-322. In N. Innis, D. Gelfand, J.

- Sninsky, and T. White (ed.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., New York.
12. Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 1944. **153**: 375-380.
 13. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantization of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 1976. **72**: 248-254.
 14. Laemmli, U. K. Cleavage of the structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature.* 1970. **227**: 680-685.
 15. Hmidet, N.; Bayoudh, A.; Berrin, J. G.; Kanoun, S.; Juge, N.; Nasri, M. Purification and biochemical characterization of a novel α -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1 cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli*. *Process Biochemistry.* 2008. **43** (5): 499-510.
 16. Bhella, R.S.; Altosaar, I. Purification and some properties of the extracellular α -amylase from *Aspergillus awamori*. *Can J Microbiol.* 1985. **31**: 149-153.
 17. Schellart, J. A.; Visser, M. W.; Zandstva, T.; Middlehover, W. J. Starch degradation by the mold *Trichoderma viride* I. The mechanism of degradation. *Antonie Van Leeuwenhoek J Microbiol Serol.* 1976. **42**: 229-238.
 18. Uchino, F. A thermophilic and unusually acidophilic amylase produced by a thermophilic acidophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.* 1982. **46** (1): 7-13.
 19. Yang, C. H.; Liu, W. H. Purification and properties of a maltotriose-producing α -amylase from *Thermobifida fusca*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 2004. **35** (2-3): 254-260.
 20. Li, H.; Chi, Z.; Wang, X. D.; Ma, L.; Gao, L. Purification and characterization of extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion. *Enzyme and Microbial Technology.* 2007. **40**: 1006-1012.
 21. Planchot, V.; Colonna, P. Purification and characterization of extracellular alpha-amylase from *Aspergillus fumigatus*. *Carbohydrate Research.* 1995. **272** (1): 97-109.
 22. Nielsen, A. D.; Pusey, M. L.; Fuglsang, C. C.; Westha, P. A proposed mechanism for the thermal denaturation of a recombinant *Bacillus halmapalus* α -amylase-the effect of calcium ions. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2003. **1652**: 52-63.