

## Invertasa del Género *Aspergillus* y su Impacto Biotecnológico

Fabiola Veana<sup>1\*</sup>, Cristóbal Noé Aguilar<sup>1</sup>, José María Viader-Salvadó<sup>2</sup> y Raúl Rodríguez-Herrera<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. Venustiano Carranza y José Cárdenas s/n. República Oriente. C.P. 25280, Saltillo, Coahuila.*

\*E-mail: [f\\_veana@hotmail.com](mailto:f_veana@hotmail.com)

<sup>2</sup>*Instituto de Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Pedro de Alba s/n y Av. Manuel L. Barragán. C. P. 66450, San Nicolás de los Garza, Nuevo León.*

### RESUMEN

La invertasa es importante en la industria alimentaria para la obtención de confites y edulcorantes artificiales. Los hongos filamentosos pueden ser inducidos para secretar enzimas de interés industrial, dentro de ellas, la invertasa. El género *Aspergillus* ha demostrado ser buen productor de esta enzima mediante fermentación en cultivo sumergido. Antes de que la enzima sea caracterizada, necesita ser sometida a purificación, en esta etapa se han utilizado herramientas cromatográficas. Dentro de dichas herramientas destacan la cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular, además de FPLC. En la caracterización de la enzima se ha estudiado el efecto del pH y temperatura sobre la estabilidad y actividad enzimática, principalmente. Por otro lado, la tecnología del ADN recombinante, es un área prometedora que permitirá mejorar los rendimientos de la enzima mediante un sistema de expresión heteróloga.

**Palabras clave:** *Aspergillus*,  $\beta$ -fructofuranosidasa, cultivo sumergido, cromatografía, invertasa, proteína recombinante.

### ABSTRACT

Invertase is important in food industry for candy production and artificial sweeteners. Filamentous fungi are considered micro-organisms capable of being induced to secrete enzymes of industrial interest, including, invertase. *Aspergillus* species have demonstrated to be good producers of the enzyme by submerged culture. Before characterizing the enzyme, purification is needed. Chromatographic tools have been applied for this purpose. These tools include ion exchange chromatography and molecular exclusion, besides FPLC. In the

characterization of the enzyme, the effect of pH and temperature on the stability and enzymatic activity have been mainly studied. Furthermore, recombinant DNA technology is a promising area that will improve enzyme yields by an heterologous expression system.

**Key words:** *Aspergillus*,  $\beta$ -fructofuranosidase, chromatography, invertase, recombinant protein, submerged culture.

## INTRODUCCIÓN

La invertasa, conocida también como  $\beta$ -fructofuranosidasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de sacarosa en glucosa y fructosa. Se emplea en la industria farmacéutica y alimentaria, especialmente en la obtención de productos de confitería (Ashokkumar *et al.*, 2001), tales como chocolates, bombones, miel sintética, mermelada y confituras en general, así como también en la obtención de edulcorantes artificiales y en la industria cervecera (Cheetham, 1991).

Por otro lado, la enzima además de tener actividad de hidrólisis, en condiciones de altas concentraciones de sustrato (sacarosa) puede tener actividad fructosiltransferasa, para la síntesis de fructooligosacáridos (FOS), tales como cestososa, nistososa y 1-fructofuranosil-nistososa, los cuales son de bajo contenido calórico. Estos compuestos tienen un impacto en la salud, puesto que mejoran la microflora intestinal y previenen enfermedades cardiovasculares, cáncer de colon u osteoporosis (Linde *et al.*, 2009).

La producción de invertasa ha sido reportada en *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Xanthophyllomyces*

(Reddy *et al.*, 2010) y hongos filamentosos del género *Aspergillus*, *Aureobasidium* y *Penicillium* (Mussato *et al.*, 2009). Sin embargo, industrialmente, *S. cerevisiae* es el microorganismo de elección para la obtención de la enzima debido a su alta capacidad de fermentación de sacarosa y por ser una cepa hiper-productora de invertasa (Haq & Ali 2005). No obstante, a nivel industrial, para la producción de FOS las enzimas que se emplean (invertasa y fructosiltransferasa) se obtienen de *Aspergillus niger* y *Aureobasidium pullulans* (Cuervo-Fernández *et al.*, 2007), debido a que la producción de FOS por levaduras no es muy común: los niveles de estos compuestos que se han reportado para *Kluyveromyces* sp. y *Candida* sp. se encuentran entre 12 y 44% (Hernalsteens & Maugeri 2010), mientras que *A. niger* y *A. japonicus* producen entre 50-60% de FOS (Dorta *et al.*, 2006; Hernalsteens & Maugeri 2010).

De acuerdo con los antecedentes anteriores, en el presente trabajo se revisan y discuten algunas de las investigaciones más recientes sobre la producción de invertasa por cepas del género *Aspergillus*, purificación y caracterización de la enzima, así también

se presentan avances en el campo poco estudiado de la obtención de invertasas recombinantes.

## GENERALIDADES DE INVERTASA

La invertasa también llamada  $\beta$ -D-fructofuranosidasa (1,2- $\beta$ -D-fructofuranosidofructohidrolasa Ec. 3.2.1.26) cataliza la hidrólisis de residuos terminales no reductores  $\beta$ -D-fructofuranosido en  $\beta$ -fructofuranosidos

(Romero, 2001; Mejorado, 2006). El resultado de la reacción de hidrólisis (Figura 1) es una mezcla de glucosa y fructosa denominada “azúcar invertido”, debido a la inversión de sus propiedades ópticas de una rotación positiva de la sacarosa [ $+66^\circ$ ] a una rotación negativa que es promedio de la rotación de la glucosa [ $+52^\circ$ ]

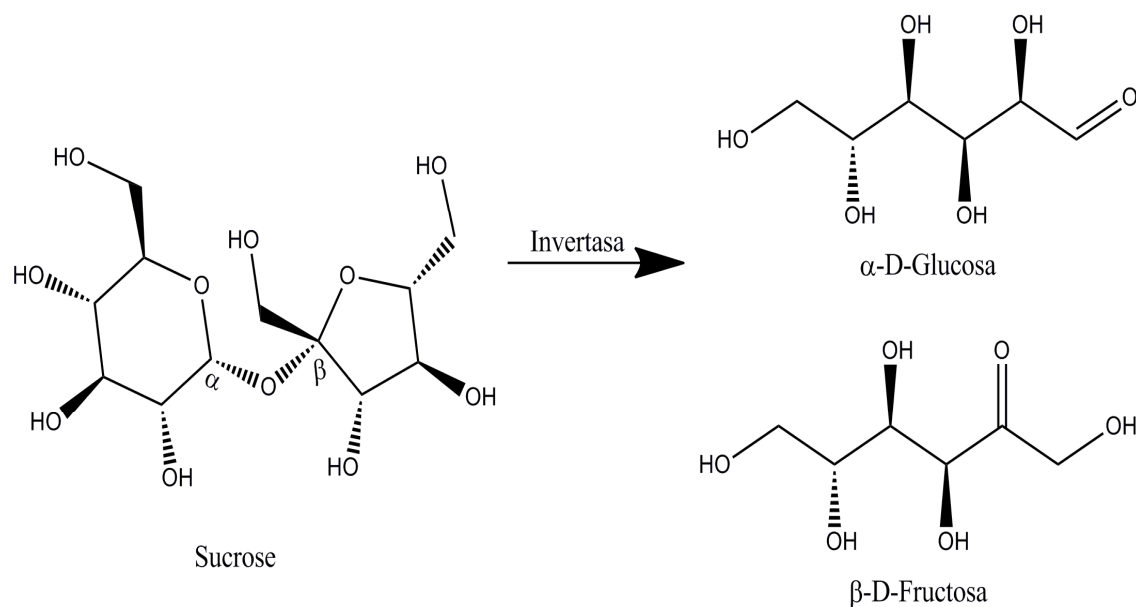


Fig. 1. Reacción de hidrólisis de la invertasa.

y de la fructosa [ $-92^\circ$ ] (Badui, 1993). Además de utilizarse la sacarosa como sustrato específico para la producción de invertasa, también la enzima se puede inducir por otros

compuestos, tales como la inulina y la rafinosa (Rubio *et al.*, 2002).

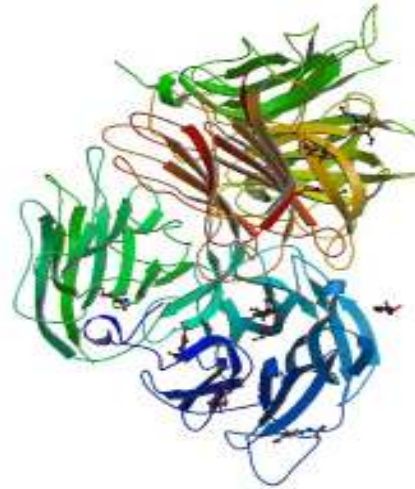
## GÉNERO DE *ASPERGILLUS* COMO PRODUCTOR DE INVERTASA

El hongo filamentoso *A. niger* es generalmente considerado como seguro (GRAS) y es extensamente empleado en biotecnología para la producción de ingredientes alimentarios, farmacéuticos y en la industria enzimática. Este microorganismo secreta grandes cantidades y variedades de enzimas, por lo cual es seleccionado para la producción enzimática en fermentación en estado sólido (SSF) y en cultivo sumergido (SmC) (Berka et al., 1992; Pandey et al., 1999). Sin embargo, de acuerdo a estudios reportados en la literatura y a la información de la base de datos Carbohydrate-Active Enzyme (CAZY), la invertasa es producida también por otras especies de *Aspergillus*, tales como *A. ficcum* (Peberdy 1993; James & Simpson 1996), *A. fumigatus* (Rezende & Felix, 1999; Mátrai et al., 2000), *A. flavus* (Mátrai et al., 2000; Uma et al., 2010), *A. japonicus* (Hayashi et al., 1992; Mussato et al., 2009), *A. nidulans* (Vainstein & Peberdy, 1991) y *A. oryzae* (Mátrai et al., 2000; Kurakake et al., 2008).

## ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA ENZIMA

De acuerdo con la base de datos PDB (Protein Data Bank) de RSCB (Research Collaboratory for Structural

Bioinformatics) no se encuentran estructuras tridimensionales de la invertasa de hongos filamentosos, solamente la correspondiente a *Schwanniomyces occidentalis* (Fig. 2).



**Fig. 2.** Estructura tridimensional de la invertasa de *Schwanniomyces occidentalis*

La cual posee 2 dominios conservados: cadena A y B con los extremos N-terminal y C-terminal, respectivamente, que corresponden a la familia glicosil hidrolasa 32 (GH32). Esta familia incluye invertasa, levanasasa, inulinasa y levansacarasa de origen bacteriano, fúngico y vegetal. La invertasa de *Sw. occidentalis* posee 474 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 119 kDa (Álvaro-Benito et al., 2010). Los dominios funcionales de la familia GH32 también se han identificado en *A. niger*, *A. nidulans* y *A. fumigatus* (Yuan et al. 2006).

## REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE INVERTASA EN *A. NIGER*

Los hongos filamentosos sintetizan y secretan en grandes cantidades sólo las enzimas hidrolasas necesarias para degradar algunos componentes del medio en el cual se desarrollan. De acuerdo con Pel *et al.* (2007), *A. niger* secreta el 77% de enzimas al medio de cultivo, seguido de *A. oryzae*, *A. nidulans* y *A. fumigatus*. El mecanismo de inducción de invertasa de *A. niger* es diferente de aquel en levaduras, en las cuales la síntesis de la enzima es constitutiva (Rubio & Navarro, 2006) y los niveles de secreción de la enzima al medio de cultivo son muy bajos en comparación con los niveles que secreta *A. niger*. Por lo cual, a continuación se presenta el mecanismo de regulación de síntesis de invertasa de este microorganismo.

Rubio & Navarro (2006) describen un mecanismo de regulación de la síntesis de la enzima en *A. niger* (Fig. 3), en el cual existe interacción de moléculas de sacarosa con el receptor en la membrana celular generando señales químicas que podrían ser trasladadas y amplificadas por monofosfato de adenina cíclico (cAMP) en el núcleo celular comenzando la inducción de la síntesis de invertasa a nivel de ADN. El ARNm podría trasladar la información de la síntesis de invertasa a los ribosomas, para después ser sintetizada y secretada al espacio

periplásmico, o bien en la pared celular.

La secreción de proteínas por *A. niger* involucra transporte vía retículo endoplásmico, aparato de Golgi y vesículas de la membrana celular (Pel *et al.*, 2007).

## GENES CODIFICANTES DE INVERTASA

La secuenciación del genoma de *A. niger* ha permitido la identificación de enzimas, desarrollo de nuevos productos, mejoramiento de cepas e incremento de la eficiencia de procesos. Algunos autores han reportado el aislamiento y clonación del gen de invertasa de *A. niger*. Boddy *et al.* (1993) aislaron y clonaron el gen *suc1* de *A. niger* B60, cuyo tamaño es de 1.7 kb. Más tarde, Somiari *et al.* (1997) identificaron el gen *sir1* de *A. niger* IBT10sb, el cual posee 93.5% de similitud con *suc1*. Recientemente se identificó el gen *Ifv* de *A. niger* GH1, una cepa que posee altos rendimientos enzimáticos respecto a otros aislamientos de *A. niger*, compartiendo un 93 % de similitud con *suc1* (Veana, 2010). Por tanto, las características de estos genes llevan a la conclusión de que se trata del mismo gen, cuyo marco de lectura abierto (ORF) no es interrumpido por intrones, siendo que la codificación de la invertasa es realizada por el gen *suc1* (Yuan *et al.*, 2006; Pel *et al.*, 2007).

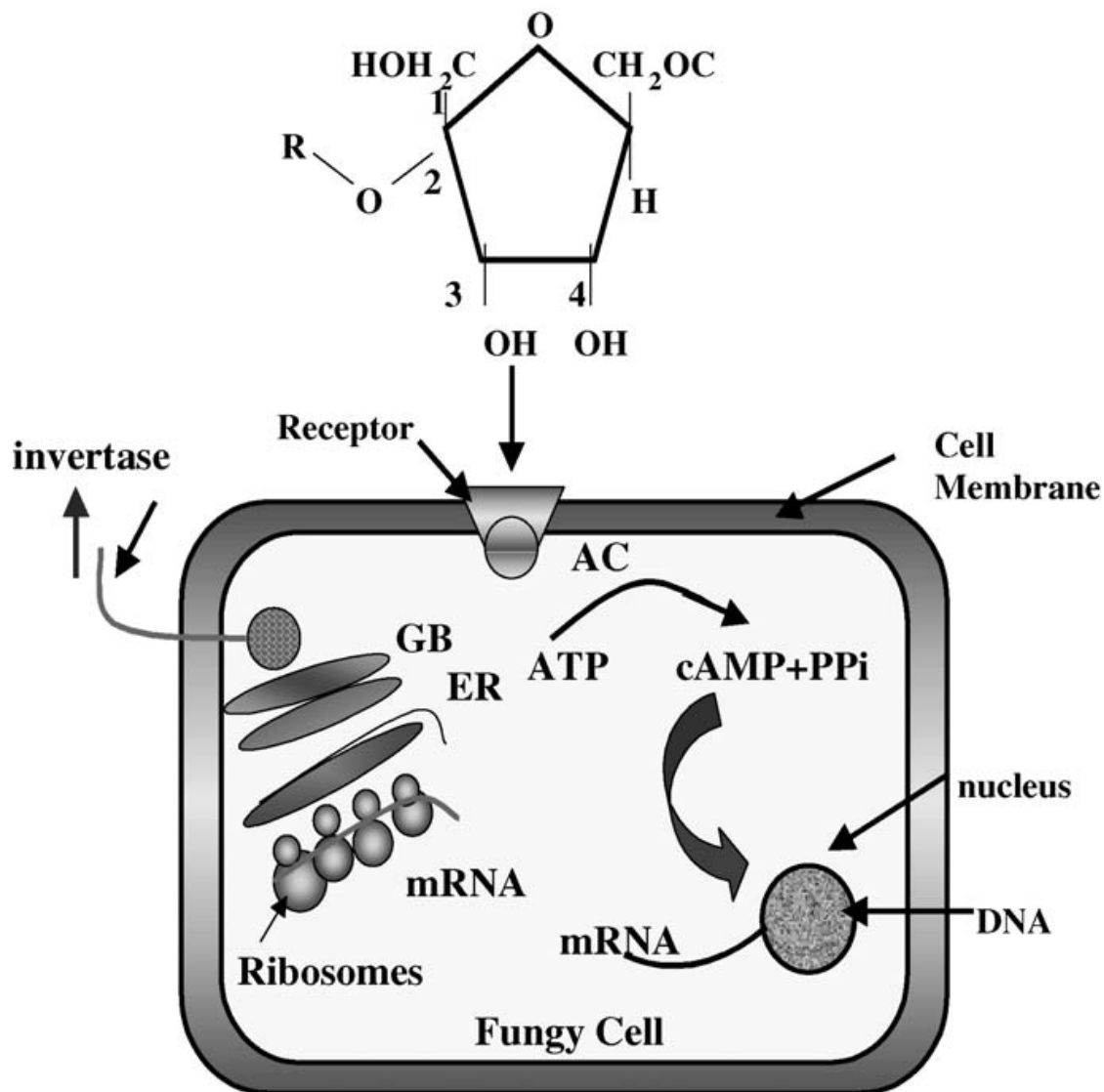


Fig. 3. Mecanismo de acción sugerido de la síntesis de invertasa de *A. niger*. Imagen tomada de Rubio & Navarro, 2006.

## EXPRESIÓN DE INVERTASA EN SmC

A nivel industrial, la producción de la enzima es en SmC, obteniéndose títulos enzimáticos que se encuentran en el rango de gramos por litro (Harvey & McNeil, 1993). A continuación se enuncian algunas investigaciones al

respecto.

Sirisansaneeyaku *et al.* (2000), evaluaron la producción intra y extracelular de invertasa de *A. niger* ATCC 20611 en fermentadores, cuya productividad (enzima producida por unidad de tiempo) obtenida fue de  $18900 \text{ U g células}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , 500 veces superior comparada con la productividad obtenida

empleando matraces como fermentadores. Lo anterior es debido al control de pH y temperatura que se puede lograr. Romero-Gómez *et al.* (2000) demostraron la capacidad de *A. niger* Aa20, N402 y C28B25 para la producción de  $\beta$ -fructofuranosidasa obteniendo un promedio de productividad de  $20 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Por otro lado, *A. oryzae* KB produce  $\beta$ -fructofuranosidasa, la enzima además de tener actividad de hidrólisis F2 ( $U_h$ ), puede tener actividad fructosiltransferasa F1 ( $U_f$ ). Kurakake *et al.* (2008) investigaron dos tipos de  $\beta$ -fructofuranosidasas, observando que F1 y F2 se obtienen en presencia de alta y baja concentración de sacarosa, respectivamente. Los niveles enzimáticos encontrados fueron de  $9.37$  y  $7.58 \text{ U ml}^{-1}$  para F1 y F2, respectivamente. El valor óptimo de pH de F1 y F2 es de  $5.0$  y  $6.0$ , respectivamente; F1 demostró ser más estable en un rango de  $5.0$ - $7.0$ , mientras que F2 en un rango de pH alcalino ( $4.0$ - $9.0$ ). La temperatura óptima a la que se registran los títulos más altos de F1 y F2 es alrededor de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  y estables a una temperatura de  $40$  y  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente. Mientras tanto, Mussato *et al.* (2009) obtuvieron una alta actividad  $\beta$ -fructofuranosidasa de  $40.6 \text{ U ml}^{-1}$ , manteniéndose constante durante la fermentación en cultivo batch repetido empleando la cepa de *A. japonicus* ATCC 20236 inmovilizada con fibras vegetales.

## APROVECHAMIENTO BIOTECNOLÓGICO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

Actualmente se han empleado residuos agroindustriales como substratos en SSF y SmC para la obtención de enzimas de interés biotecnológico, entre otros usos. Ashokkumar *et al.* (2001) emplearon el bagazo de caña de azúcar como soporte para la fermentación en estado sólido para la optimización de la producción de invertasa por *Aspergillus niger* NRRL 330. Los autores obtuvieron una actividad enzimática de  $10735 \text{ U l}^{-1}$ .

Posteriormente, Vargas *et al.* (2004) evaluaron el efecto del ultrasonido sobre la producción de invertasa de *A. niger* CCT 7415, con el aprovechamiento de melaza de caña de azúcar como substrato. El objetivo de emplear el ultrasonido fue la extracción y liberación de la enzima intracelular. La máxima actividad enzimática obtenida por la cepa fue de  $179.17 \text{ U l}^{-1}$  a  $8$  min de sonicación con una energía estimada de  $297.6 \text{ J ml}^{-1}$ .

Más tarde, Rajoka & Yasmeen (2005), emplearon una cepa mutante de *A. niger* NIAB 280 para la obtención de la enzima, empleando mazorcas de maíz, arroz pulido, cáscara del mismo y salvado de trigo. Se obtuvo que el mejor residuo lignocelulósico es el salvado de trigo, alcanzando una productividad de  $516 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , cifra que supera 2 veces la



productividad que se obtiene con la cepa nativa.

Recientemente, Reddy *et al.* (2010) emplearon residuos agroindustriales para la expresión de invertasa de *A. niger* PSSF21 en SmC. Dentro de estos residuos se encuentran el salvado de trigo y arroz, hojas y cáscara de plátano, achicoria, aserrín y melaza de caña de azúcar. La máxima producción de la enzima ( $30.84 \text{ U ml}^{-1}$ ) se observa a las 96 h de cultivo con la utilización de harina de soya y melaza al 2% como fuente de nitrógeno orgánico y carbono, respectivamente. El pH y la temperatura óptima fueron de 3.5 y  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente; dicha temperatura muestra la alta termo-tolerancia de la enzima.

Por otra parte, Uma *et al.* (2010) utilizaron cáscaras de naranja, piña y granada como sustratos para la producción de invertasa de *A. flavus*. Se encontró que la mejor actividad enzimática obtenida por la cepa es de  $25.8 \text{ U ml}^{-1}$  empleando un 3% de inóculo en las 96 horas de cultivo.

## **PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA**

La purificación de proteínas es en sí la separación de las proteínas de interés de una mezcla compleja para su posterior caracterización. Esta metodología es necesaria antes de intentar comprender las interacciones de las proteínas con otras moléculas (Mathews *et al.*, 2002). Es sumamente importante mencionar que

no existe la técnica ni el esquema de purificación que permita purificar todo tipo de proteína, por lo que se debe desarrollar una estrategia para la purificación de cada proteína. Los requisitos para ello, son los siguientes: a) determinar la cantidad y pureza de la proteína necesaria para su uso posterior, b) conocer la mayor información relacionada con las fuentes y naturaleza de la proteína de interés y contaminantes en la preparación biológica y c) buscar la mejor fuente de la proteína de interés.

El primer paso en el estudio, purificación y caracterización de una proteína, es generalmente el lavado del tejido y la aplicación de una técnica que rompa las células del tejido: lisis. La separación del extracto proteico de los restos celulares se realiza generalmente por centrifugación, aunque una técnica de filtración puede ser útil.

La precipitación selectiva es un procedimiento que induce un cambio en la solución para que la proteína de interés o los contaminantes alcancen su punto isoeléctrico (el valor de pH en el que la sustancia tiene una carga de cero) y precipiten. Las técnicas de precipitación selectiva consisten en el empleo de sales, solventes orgánicos y polímeros; considerándose la más empleada la precipitación salina con sulfato de amonio. La alta solubilidad de la sal causa una competencia por el agua de la solución, causando que las proteínas menos hidrófilas pierdan agua en su



entorno y precipiten en orden de solubilidad (Prado-Barragán *et al.*, 1999).

El empleo de técnicas cromatográficas ha beneficiado la purificación de proteínas. Dentro de las técnicas empleadas se encuentra la filtración en gel, también conocida como cromatografía en gel y cromatografía de exclusión molecular (Molecular Exclusion Chromatography MEC). Este tipo de cromatografía realiza separaciones más discriminatorias basadas en el tamaño. Las columnas empleadas están rellenas de esferas porosas compuestas de un polímero insoluble pero altamente hidratado (dextrano, agarosa o poliacrilamida). Las marcas comerciales que se utilizan son Sephadex, Sepharose y Biogel, cuyo tamaño de poro es de 0.1 mm de diámetro. Las moléculas pequeñas se encapsulan y se distribuyen entre las esferas, permitiendo la fluidez de las moléculas grandes a través de la columna, las cuales son las de interés.

Por otro lado, se encuentra la cromatografía de intercambio iónico (Exchange Ion Chromatography, EIC), técnica más usada en la separación de proteínas en base a su carga neta. Si una proteína tiene una carga neta positiva a pH 7, ésta se unirá normalmente a una columna de esferas que contengan grupos carboxilos, mientras que una proteína con carga neta negativa, no lo hará. Las proteínas cargadas positivamente (proteínas catiónicas) se pueden separar en columnas de

carboximetil-celulosa (CM-celulosa) cargadas negativamente. Mientras que las proteínas cargadas negativamente (proteínas aniónicas) se pueden separar en columnas de dietilaminoetil-celulosa (DEAE-celulosa) cargadas positivamente (Berg *et al.*, 2008).

Un tipo de cromatografía líquida es FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), parecida a HPLC (High Performance Liquid Chromatography). La fase móvil consiste en un líquido que arrastra a la muestra a través de una fase estacionaria que suele ser una resina compuesta de perlas de agarosa reticulada con diferentes ligandos de superficie en función de la meta de purificación (Prado-Barragán *et al.*, 1999). Las columnas que se utilizan en FPLC pueden separar macromoléculas en función del tamaño, distribución de la carga, hidrofobicidad o en fase inversa (como la cromatografía de afinidad) (Verbeke & Verbruggen, 1996).

Hasta la fecha se han realizado estudios sobre producción y purificación de invertasa por hongos filamentosos, específicamente del género *Aspergillus* (tabla 1). De lo revisado en el presente trabajo, se observa que la combinación de las técnicas IEC, MEC y FPLC para la purificación de invertasa de *A. niger* IMI303386 (Nguyen *et al.*, 2005) es favorable, ya que la recuperación enzimática es del 41.8% con un factor de purificación de 49.8. Sin embargo, Dhananjay & Mulimani (2008)

# Artículos

recuperaron el 54% de invertasa mediante partición en tres fases (TTP), usando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y t-butanol para la precipitación de la enzima obtenida de *A. oryzae*. De acuerdo con la literatura, lo

anterior resalta el trabajo de Nguyen *et al.* (2005), debido a que la producción de invertasa de *A. niger* supera los niveles obtenidos por *A. oryzae*. (96.5 U vs 5.9 U, respectivamente).

**Tabla 1.** Purificación de invertasa producida por el género de *Aspergillus*.

| Autor                         | Microorganismo              | Pasos de purificación  | Factor de purificación | Recuperación de la enzima (%) |
|-------------------------------|-----------------------------|--|------------------------|-------------------------------|
| Ettalibi & Baratti, 1987      | <i>A. ficcum</i>            | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 38 y 92%, MEC, IEC, y FPLC                                  | 3.5                    | 0.9                           |
| Hiramaya <i>et al.</i> , 1989 | <i>A. niger</i> ATCC 20611  | $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ 6% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 75%, IEC y MEC                 | 51.6                   | 10.0                          |
| Duan <i>et al.</i> , 1993     | <i>A. japonicus</i> TIT-KJ1 | Acetona 1:1, MEC y PIEF  | 8.8                    | 46.0                          |
| Boddy <i>et al.</i> , 1993    | <i>A. niger</i> B60         | Ultrafiltración, centrifugación EC y MEC   | 23.0                   | 9.9                           |
| Rubio & Maldonado 1995        | <i>A. niger</i>             | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45, 80%, MEC e IEC  | 8.6                    | 0.8                           |
| Nguyen <i>et al.</i> , 2005   | <i>A. niger</i> IMI303386   | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80%, FPLC-IEC, MEC  | 49.8                   | 41.8                          |
| Dhananjay & Mulimani, 2008    | <i>A. oryzae</i>            | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20-50%, TTP usando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y t-butanol | 12.0                   | 54.0                          |
| Uma <i>et al.</i> , 2010      | <i>A. flavus</i>            | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 70%, diálisis, EIC  | 5.8                    | 3.2                           |

Nota: PIEF (Electroforesis preparativa de isoelectroenfoco); Factor de purificación: relación de la actividad específica ( $\text{U mg}^{-1}$ ) antes y después de la purificación.

## CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA ENZIMA

Dentro de las principales características de invertasas purificadas mencionadas en la sección anterior se encuentran las reportadas por Ettalibi & Baratti, (1987), quienes se encargaron de

purificar la invertasa de *A. ficcum*. El peso molecular de la enzima es de 84 kDa, el contenido de carbohidratos presentes (31%) revela que se trata de una glicoproteína cuya actividad enzimática es superior cuando se utiliza sacarosa como inductor en el SmC.

Posteriormente, Hiramaya *et al.* (1989) purificaron la invertasa de *A. niger* ATCC 20611, se estimó que el peso molecular de la enzima fue de 340 kDa. El pH óptimo de la enzima fue de 5.0-6.0 y la temperatura óptima de 50-60°C. El valor de la constante cinética de Michaelis  $K_m$  para la sacarosa fue de 0.29 M. Años más tarde, Boddy *et al.* (1993) caracterizaron la invertasa purificada de *A. niger* B60, cuya actividad se obtiene a un pH óptimo de 5.5 a 50 °C. El peso molecular de la enzima reducida se estimó por electroforesis en gel-SDS, el cual es de 115 kDa. Mientras que el peso molecular de la enzima nativa fue de 225-250 kDa, estimado por electroforesis sobre condiciones no desnaturizantes, lo cual sugiere que la proteína es un dímero de subunidades idénticas.

Rubio & Maldonado (1995) demostraron que la máxima actividad de invertasa de *A. niger* se observó a 60 °C y pH de 5.0. La afinidad de la enzima por el sustrato se expresó con las constantes cinéticas  $K_m$  (0.0625 mM), con sacarosa como sustrato y velocidad máxima  $V_{max}$  de 0.013 mol $min^{-1}$ . Estudios recientes (Nguyen *et al.*, 2005) de la purificación de la  $\beta$ -fructofuranosidasa de *A. niger* IMI303386 revelan que el peso molecular de la enzima es entre 120 y 130 kDa. Mediante el isoelectroenfoco se observaron dos isoformas con un pI de

5.4 y 4.4, lo que demuestra que la invertasa tiene al menos dos subunidades de igual peso molecular.

Por otro lado, la enzima actúa en un rango de pH de 5.0-6.5 con el óptimo a 5.5; la máxima actividad se registra a 50°C. La  $\beta$ -fructofuranosidasa es estable en un rango de 4.0-8.0 y entre 50 y 55 °C. Además, los iones metálicos  $Ba^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  presentan la mayor influencia sobre el incremento de la actividad enzimática. Finalmente, de acuerdo al análisis de carbohidratos, la  $\beta$ -fructofuranosidasa contiene un 17% de estos compuestos, considerándose que la enzima es una glicoproteína. Recientemente, Uma *et al.* (2010) caracterizaron la invertasa de *A. flavus*, la cual tiene un peso molecular de 67 kDa. El rango de pH en el cual actúa la enzima es de 5.0-7.0 con el óptimo de 6.0, la actividad de la enzima es estable a 50°C.

Finalmente, los parámetros cinéticos de la enzima purificada fueron calculados usando sacarosa, obteniéndose los siguientes valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  de 0.23 mg  $ml^{-1}$  y 15.8 U  $mg^{-1}$ , respectivamente. Dentro de los iones metálicos, el  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  favorecen la mayor actividad enzimática además actúan como protectores contra la desnaturización térmica.

## INVERTASA RECOMBINANTE

Actualmente, existe gran interés por las proteínas recombinantes cuyo espectro de aplicaciones es muy amplio, en el cual se incluye la industria alimentaria (Walsh & Headon 1994; Murray *et al.*, 2006). Se considera una proteína recombinante o heteróloga aquella proteína cuya síntesis se realiza en un organismo “huésped” distinto al organismo nativo (Walsh & Headon

1994), con el objetivo de lograr incrementar los niveles enzimáticos, a este procedimiento se le conoce también como clonación. A nivel industrial se emplean cepas de *S. cerevisiae*, *Pichia angusta* y *P. pastoris* para alcanzar este fin (Buckholz & Gleeson 1991; Cregg *et al.*, 2000).

Hasta la fecha, se ha investigado poco sobre la obtención de invertasa recombinante. En la tabla 2

**Tabla 2.** Estudios de sistema de expresión heteróloga de invertasa y otras enzimas

| Autor                           | Enzima                | Productor                      | Huésped                                |
|---------------------------------|-----------------------|--------------------------------|--|
| Bergès <i>et al.</i> , 1993.    | Invertasa             | <i>A. niger</i> B60            | <i>T. reesei</i>                       |
| Narciandi <i>et al.</i> , 1995. | invertasa             | <i>S. cerevisiae</i>           | <i>P. angusta</i>                      |
| Kim <i>et al.</i> , 1999.       | Endo-inulinasa        | <i>A. ficcum</i> ATCC<br>16882 | <i>S. cerevisiae</i>                   |
| Berrin <i>et al.</i> , 2000.    | Endo-β-1,4-xilanasa   | <i>A. niger</i>                | <i>P. pastoris</i>                     |
| Heyer & Wendenburg,<br>2001.    | Fructosil-transferasa | <i>A. sydowi</i> IAM<br>2544   | <i>E. coli</i><br><i>S. cerevisiae</i> |
| Pérez <i>et al.</i> 2001.       | invertasa             | <i>P. anomala</i> CBS<br>5759  | <i>S. cerevisiae</i>                   |
| Yanai <i>et al.</i> 2001.       | invertasa             | <i>A. niger</i> ATCC<br>20611  | <i>S. cerevisiae</i>                   |
| Moriyama <i>et al.</i> , 2003.  | Exo-inulinasa         | <i>A. niger</i> cepa 12        | <i>P. pastoris</i>                     |
| Raba'atun <i>et al.</i> , 2011. | Inulinasa             | <i>Aspergillus</i> sp.         | <i>E. coli</i>                         |

se enuncian algunas datos encontrados en la literatura acerca de invertasa y otras enzimas recombinantes pertenecientes a la familia de las glicosil-hidrolasas, utilizando *Trichoderma reesei*, *E. coli*, *S. cerevisiae*, *P. angusta* y *P. pastoris* como huéspedes. Sin embargo,

la mayoría de estas investigaciones hacen referencia a la clonación del gen codificante para la enzima en estudio, sin especificar si se ha logrado el mejoramiento de los rendimientos enzimáticos de producción.

Bergès *et al.* (1993) clonaron y expresaron el gen de invertasa (*suc1*) de *A. niger* B60 en *T. reesei*, dicho gen puede actuar como un marcador dominante selectivo para la transformación de *T. reesei*. Las clonas transformadas se evaluaron bajo condiciones de glucosa y sacarosa, obteniendo aproximadamente a las 3 h de cultivo  $1.5 \text{ U g de micelio}^{-1} \text{ ml}^{-1}$  de cultivo adicionado con glucosa, hecho que era de esperarse, puesto que *T. reesei* es incapaz de utilizar la sacarosa como fuente de carbono. Por otro lado, la cepa *A. niger* B60 secretó a las 6 h al medio de cultivo adicionado con sacarosa como inductor, casi el doble de la actividad enzimática que presentaron los transformantes. Debido a esto último, es importante reconsiderar el huésped a utilizar en este tipo de sistemas de expresión, puesto que solamente se logró la clonación del gen *suc1*.

Heyer & Wendenburg (2001) expresaron la fructosiltransferasa de *A. sydowi* en *E. coli* y *S. cerevisiae*, ambos huéspedes carentes de actividad hidrolítica, por lo que fungen de modelos ideales de expresión. Como resultado de la investigación se encontró un nivel bajo de actividad fructosiltransferasa, usando como huésped a *S. cerevisiae*. Caso contrario el sucedido con *E. coli*, donde se detectó la expresión de la enzima en los cromatogramas (CEM), sin indicar los niveles alcanzados.

Por otra parte, Pérez *et al.* (2001) expresaron el gen de invertasa (INV1) de *P. anomala* en *S. cerevisiae*, donde se obtuvo un nivel eficiente de secreción de la enzima por los transformantes ( $6400 \text{ U l}^{-1}$ ); pero no se menciona cuáles son los niveles de producción de enzima de *P. anomala*. Sin embargo, Yanai *et al.* (2001) demostraron que la expresión de  $\beta$ -fructofuranosidasa de *A. niger* ATCC 20611 en *S. cerevisiae* se ve mejorada ya que la relación  $U_i/U_h$  obtenida fue de 22.3 veces más alta que la reportada por *A. niger* ATCC 20611. Además la invertasa recombinante obtenida posee las mismas propiedades catalíticas que la enzima obtenida por *A. niger* ATCC 20611.

No obstante, el empleo de *S. cerevisiae* en los modelos de expresión heteróloga posee las desventajas de baja secreción de la proteína de interés al medio de cultivo y las posibles hiperglicosilaciones que se pudieran presentar. Mientras tanto, si bien es cierto que *E. coli* es bien conocida fisiológica y genéticamente, es de fácil manipulación y brinda altas densidades celulares, su aplicación posee los inconvenientes de formar cuerpos de inclusión insolubles en el citoplasma celular, además de poderse presentar la proteólisis celular y generar endotoxinas dañinas a la salud humana y animal (Cregg *et al.*, 2007).

Narciandi *et al.* (1995) expresaron el gen de invertasa *SUC2* de *S. cerevisiae* en *P. angusta*, evaluando la producción de invertasa recombinante en 2 medios

de cultivo adicionados con sacarosa y melaza de caña de azúcar por separado. Los autores afirman que se logra un incremento de la producción de la enzima en el medio rico en melaza de caña de azúcar (15000 vs 10000 U l<sup>-1</sup>) sin el establecimiento de una comparación con los niveles propios de *S. cerevisiae*.

Años más tarde, Moriyama *et al.* (2003) expresaron el gen de exoinulinasa de *A. niger* 12 en *P. pastoris*, observando un aumento de la actividad inulinasa e invertasa (16 y 101 U ml<sup>-1</sup>, respectivamente) y en la actividad específica de la proteína recombinante (55.5 y 293 U/mg de exoinulinasa e invertasa, respectivamente), esta última es superior a la actividad específica de la proteína nativa de *A. niger* (52.8 y 227 U mg<sup>-1</sup>, exoinulinasa e invertasa, respectivamente), ambas purificadas mediante MEC e IEC. Con lo anterior se puede afirmar que el uso de *P. pastoris* para la obtención de proteínas recombinantes es muy eficiente.

Dentro de las principales ventajas de *P. pastoris*, se encuentran la sencilla manipulación a nivel de laboratorio e industrial, se adapta a los cambios de escala en biorreactores y existe posibilidad de alcanzar altas concentraciones celulares, redituando en altas productividades enzimáticas. Además, de que la levadura no produce endotoxinas, la secreción de la proteína recombinante es eficiente y se logra

fácilmente su purificación (Gamboa & Trujillo-Roldán, 2009).

## CONCLUSIONES

El impacto biotecnológico de la invertasa producida por el género *Aspergillus* es bien conocido, así como también las características fisicoquímicas y métodos de purificación a los que se ha sometido la enzima. Sin embargo, es importante considerar que mediante la tecnología del ADN recombinante se puede incrementar los rendimientos de invertasa, comparados con los que los microorganismos producen naturalmente. Los sistemas de expresión heteróloga que han demostrado cumplir este objetivo son las levaduras, cuyo genoma y comportamiento metabólico ha sido estudiado. Esta perspectiva mejorará la industria alimentaria, específicamente la confitería, la cual emplea la invertasa en la elaboración de productos con alta demanda de consumo.

## REFERENCIAS

- Ashokkumar B, Nagarajan K & Paramasamy G (2001) Optimization of media for  $\beta$ -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Proc. Biochem.*37: 331-338.
- Álvaro-Benito M, Polo A, González B, Fernández-Lobato M & Sanz-Aparicio J (2010) Structural and kinetic analysis of *Schwanniomyces*

# Artículos

- occidentalis* invertase reveals a new oligomerization pattern and the role of its supplementary domain in substrate binding. *J. Biol. Chem.* 285: 13930-13941.
- Badui D (1993) Química de los alimentos. Addison Wesley Longman. México.
- Berg JM, Stryer L & Tymoczko J (2008) Bioquímica. Editorial Reverté. Barcelona, España. pp 69-70.
- Bergès T, Barreu C, Peberdy JF & Boddy LM (1993) Cloning of an *Aspergillus niger* invertase gene by expression in *Trichoderma reesei*. *Curr. Genet.* 24:53-59.
- Berka RM, Dunn-Coleman N & Ward M (1992) Industrial enzymes from *Aspergillus* species. In: *Aspergillus* Biology and Industrial Applications, Bennett JW & Klich MA (eds). Butterworth-Heinemann, Stoneham, MA. pp.155-202.
- Berrin JC, Williamson G, Puigserver A, Chaix JC, Russell MW & Juge N (2000) High-level production of recombinant fungal endo- $\beta$ -1,4-xylanase in the methylotrophic yeast *Pichiapastoris*. *Protein Exp. Purif.* 19: 179-187.
- Boddy LM, Bergès T, Barreau C, Vainstein MH, Dobson MJ, Ballance DJ & Peberdy JF (1993) Purification and characterization of an *Aspergillus niger* invertase and its DNA sequence. *Curr. Genet.* 24: 60-66.
- Buckholz RG & Gleeson MA (1991) Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnol.* 9: 1067-1072.
- Cheetham P (1991) Aplicación de los enzimas en la industria. En: Manual de Biotecnología de los Enzimas. Wiseman A (ed). Editorial Acribia, Zaragoza. pp. 267-374.
- Cregg JM, Cereghino JL, Jianying S & Higgins DR (2000) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* 16(1): 23-52.
- Cregg JM (2007) *Pichia* Protocols. Human Press. United States of America.
- Cuervo-Fernández R, Ottoni CA, da Silva ES, Saito MRM, Carter JM, Magossi LR, Alves WMA, de Andrade RMF, Guilarte MB & Maiorano AE (2007) Screening of  $\beta$ -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 87-93.
- Dhananjay SK & Mulimani VH (2008) Purification of  $\alpha$ -galactosidase and invertase by three-phasepartitioning from crude extract of *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Lett.* 30: 1565-1569.
- Dorta C, Cruz R, de Oliva-Neto P & Moura DJC (2006) Sugarcane molasses and yeast powder used in the fructooligosaccharides production by *Aspergillus japonicus*-FCL 119T and *Aspergillus niger* ATCC 20611.J. *Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33: 1003-1009.



# Artículos

- Duan KJ, Sheu DC & Chen JS (1993) Purification and characterization of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus* TIT-KJ1. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(11): 1811-1815.
- Ettalibi M & Baratti JC (1987) Purification, properties and comparison of invertase, exo-inulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26: 13-20.
- Gamboa R & Trujillo-Roldán MA (2009) Un acercamiento a la producción de proteínas recombinantes terapéuticas de uso humano, El Residente, IC Pfizer, 4(3): 87-91.
- Haq I & Ali S (2005) Invertase production from a hyperproducing *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from dates. *Pak. J. Bot.* 37(3): 749-759.
- Harvey M & McNeil B (1993) Liquid fermentation system and product recovery of *Aspergillus*. In: *Biotechnology Handbooks 7*. Smith JE (ed). Plenum Press, New York. pp. 141-176
- Hayashi S, Matsuzaki K, Takasaki Y, Ueno H & Imada K (1992) Production of  $\beta$ -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8: 155-159.
- Hernalsteens S & Maugeri F (2010) Partial purification and characterization of extracellular fructofuranosidase with transfructosylating activity from *Candida* sp. *Food Bioprocess Technol.* 3: 568-576.
- Hirayama M, Sumi N & Hidaka H (1989) Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agric. Biol. Chem.* 53: 667-673.
- Heyer AG & Wendenburg (2001) Gene cloning and functional characterization by heterologous expression of the fructosyltransferase of *Aspergillus sydowii* AM 2544. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(1): 363-370.
- James J & Simpson BK (1996) Application of enzymes in food processing. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36: 437-463.
- Kim HS, Lee DW, Ryu EJ, Uhm TB, Yang MS, Kim JB & Chae KS (1999) Expression of the *INU2* gene for an endoinulinase of *Aspergillus ficuum* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 21: 621-623.
- Kurakake M, Ogawa K, Sugie M, Takemura A, Sugiura K & Komaki T (2008) Two types of  $\beta$ -fructofuranosidases from *Aspergillus oryzae* KB. *J. Agric. Food Chem.* 56: 591-596.
- Linde D, Macias I, Fernández-Arrojo L, Plou FJ, Jiménez A & Fernández-Lobato M (2009) Molecular and biochemical characterization of a  $\beta$ -fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

# Artículos

- Appl. Environ. Microbiol.* 75(4): 1065-1073.
- Mathews CK, van Holde KE & Ahern KG (2002) *Bioquímica 3ª ed.* Ed. Addison Wesley. Madrid. pp. 168-170.
- Mátrai T, Mayera S, Kókai S & Salamon I (2000) Invertase production of common storage moulds in food and feed grains as a possibility for rapid detection of *Aspergillus flavus* group and *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Food Microbiol.* 61: 187-191.
- Mejorado MN (2006) *Confitería. Industria Alimentaria.* Alfa Editores Técnicos, México. pp. 10-17.
- Moriyama S, Tanaka H, Uwataky M, Muguruma M & Ohta K (2003) Molecular cloning and characterization of an exoinulinase gene from *Aspergillus niger* strain 12 and its expression in *Pichia pastoris*. *J. Biosci. Bioeng.* 96 (4): 324-331.
- Murray PR, Rosenhtal KS & Pfaller MA (2006) *Microbiología Médica.* 5ª ed. Elsevier Mosbi, España. pp 45-46.
- Mussatto SI, Rodrigues LR & Teixeira JA (2009)  $\beta$ -Fructofuranosidase production by repeated batch fermentation with immobilized *Aspergillus japonicus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 923-928.
- Nguyen QD, Rezessy-Szabo JM, Bhat MK & Hoschke A (2005) Purification and some properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI303386. *Process Biochem.* 40: 2461-2466.
- Narciandi RE., Rodriguez L, Rodriguez E, Díaz R. Delgado J &, Herrera L (1995) High level production of recombinant invertase in *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. Lett.* 17(9): 949-952.
- Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR & Nigam P (1999) Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.* 77: 149-162.
- Prado-Barragán LA, Huerta OS, Rodríguez SG & Saucedo CG (1999) *Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología.* Editorial Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México.
- Peberdy JF (1993) Protein secretion in *Aspergillus*: invertase as a model system. *J. Chem. Technol. Biotechnol. B-Biotechnol.* 56: 216-217.
- Pel HJ, de Winde J H, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ, Turner G, Vries RP, Albang R, Albermann K, Andersen MR Bendtsen JD, Benen JAE, van den Berg M, Breestraat S, Caddick MX, Contreras R, Cornell M, Coutinho PM, Danchin EGJ, Debets AJM, Dekker P, van Dijk PWM, van Dijk A, Dijkhuizen L, Driessen AJM, d'Enfert C, Geysens S, Goosen C, Groot GSP, de Groot PWJ, Guillemette T, Henrissat B, Herweijer M, van den Hombergh JPTW, van den Hondel CAMJJ, van der Heijden R TJM, van der Kaaij RM, Klis FM, Kools HJ, Kubicek CP, van Kuyk PA,

- Lauber J, Lu X, van der Maarel MJEC, Meulenberg R, Menke H, Mortimer MA, Nielsen J, Oliver SG, Olsthoorn M, Pal K, van Peij NNME, Ram AFJ, Rinas U, Roubos JA, Sagt CMJ, Schmoll M, Sun J, Ussery D, Varga J, Vervecken W, van de Vondervoort PJJ, Wedler H, Wösten HAB, Zeng A, van Ooyen AJJ, Visser J & Stam H (2007) Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat. Biotechnol.* 25: 221-231.
- Pérez JA, Rodríguez J, Ruiz T & Rodríguez L (2001) Expression of *Pichia anomala* INV1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in two different active forms of hypoglycosylated invertase. *Arch. Microbiol.* 175:189–197.
- Raba'atun AS, Shuhaimi M, MohdYazid AM, Manaf AA, Rosli N & Sreeramanan S (2011) Molecular cloning and sequence analysis of an inulinase gene from an *Aspergillus* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* Online First™, 18 February 2011.
- Rajoka MI & Yasmeen A (2005) Improved productivity of  $\beta$ -fructofuranosidase by a derepressed mutant of *Aspergillus niger* from conventional and non-conventional substrates. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 471-478.
- Reddy PP, Reddy GSN & Sulochana MB (2010) Highly thermostable  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* PSSF21 and its application in the synthesis of fructo-oligosacharides from agro industrial residue. *Asian J. Biotechnol.* 2(2): 86-98.
- Rezende ST & Felix CR (1999) Production and characterization of raffinose-hydrolysing and invertase activities of *Aspergillus fumigatus*. *Folia Microbiol.* 44: 191-195.
- Romero-Gómez S, Augur C & Viniegra-González G (2000) Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged solid-state fermentation. *Biotechnol. Lett.* 22: 1255–8.
- Romero G (2001) Producción de invertasa por *Aspergillus niger* en fermentación líquida y fermentación sólida. Tesis de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa. México D.F. pp. 1-123.
- Rubio MC & Maldonado MC (1995) Purification and characterization of invertase from *Aspergillus niger*. *Curr. Microbiol.* 31: 80-83.
- Rubio MC, Runco R & Navarro A (2002) Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. *Phytochem.* 61: 605-609.
- Rubio MC & Navarro AR (2006) Regulation of invertase synthesis in *Aspergillus niger*. *Enzym. Microb. Technol.* 39: 601–606.
- Sirisansaneeyakul S, Jitbanjongkit S, Prasomsart N & Luangpituksa P (2000) Production of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Kasetsart J. Nat. Sc.* 34: 378-386.

# Artículos

- Somiari RI, Brzeski H, Tate R, Bieleck S & Polak J (1997) Cloning and sequencing of an *Aspergillus niger* gene coding for  $\beta$ -fructofuranosidase. *Biotechnol. Lett.* 19(12): 1243-1247.
- Uma C, Gomathi D, Muthulakshmi C & Gopalakrishnan VK (2010) Production, purification and characterization of invertase by *Aspergillus flavus* in fruit peel waste as substrate. *Adv. Biol. Res.* 4 (1): 31-36.
- Vainstein M & Peberdy J (1991) Regulation of invertase in *Aspergillus nidulans*: effect of different carbon sources. *J. Gen. Microbiol.* 137 (3): 15-321.
- Vargas L. HM, Pião ACS, Domingos RN & Carmona EC (2004) Ultrasound effect on invertase from *Aspergillus niger*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 137-142.
- Veana HF (2010) Expresión, aislamiento y clonación del gen de invertasa de *Aspergillus niger* GH1. Tesis de Maestra en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coah. pp 1-57.
- Verbeke K & Verbruggen A Usefulness of fast protein liquid chromatography as an alternative to high performance liquid chromatography of 99m Tc-labelled human serum albumin preparations. *Pharm. J. Biomed.* 14 (8-10): 1209-13.
- Walsh H & Headon DR (1994) Protein Biotechnology. John Wiley and Sons (Editors). New York. pp. 13-15.
- Yanai K, Nakane A, Kawate A & Hirayama M (2001) Molecular cloning and characterization of the fructooligosaccharide producing  $\beta$ -fructofuranosidase Gene from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 (4): 766-773.
- Yuan X, Goosen C, Kools H, van der Maarel MJEC, van den Hondel CAMJJ, Dijkhuizen L & Ram AFJ (2006) Database mining and transcriptional analysis of genes encoding inulin-modifying enzymes of *Aspergillus niger*. *Microbiology.* 152: 3061-3073.