

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LACTASICA DE *Kluyveromyces fragilis*

Claudia Marcela Duarte P., Genoveva González G. y Yolanda Rico R.*
*Departamento de Química Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Keywords: Lactasic Activity, *Kluyveromyces-fragilis*, immobilization.

RESUMEN

Se produjeron las células de *Kluyveromyces-fragilis* por fermentación en cocheda a 29°C, en un medio de cultivo previamente estandarizado por Manosalva, H., Nieto, G. (2) y se retiraron del medio de fermentación al inicio de la fase estacionaria (14 h) para posteriormente permeabilizarlas. Se compararon dos agentes de permeabilización, alcohol isoamílico y bromuro de cetiltrimetilaminio (CTAB) y se determinó la actividad lactásica empleando dos sustratos, ortonitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) y lactosa. La permeabilización de las células empleando uno u otro agente aumentó la actividad 200 veces respecto a las células intactas. Se hicieron ensayos de inmovilización de *Kluyveromyces-fragilis*, por el método de absorción sobre tres carbones activados y se determinó la actividad lactásica de los complejos carbón-célula, usando lactosa como sustrato. Se encontró que a mayor área superficial mayor actividad del complejo carbón-célula.

ABSTRACT

ABSTRACT

Cells of *Kluyveromyces-fragilis* were produced by fermentation at 29°C cultivated in batch on a medium standardized by Manosalva, H., Nieto, G. (2). Cells were harvested at the beginning of the stationary phase (14 hours), and they were permeated with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), and isoamilic alcohol. Permeated cells activity was determined using o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) and lactose as substrate. Activity was two hundred fold greater than that of the intact cells, when either CTAB or isoamilic alcohol were used. Cells were immobilized on three activated charcoal types and the lactase activity was determined using lactose substrate. Results showed that the activity of the complex was higher when the charcoal had greater surface.

INTRODUCCION

La inmovilización de células de *Kluyveromyces-fragilis* se ha estudiado para realizar la hidrólisis de lactosa de leche y suero, puesto que presenta diversas ventajas frente a la utilización de la enzima libre, tales como la de permitir realizar procesos continuos y evitar la extracción y purificación de la enzima. La obtención de un sistema de células inmovilizadas permite el aprovechamiento del suero, que es un subproducto de la industria quesera para la obtención de jarabes proteicos y así aliviar el problema de contaminación. La selección del soporte para la inmovilización de células o enzimas es un factor importante y debe cumplir con ciertos requerimientos, como poseer resistencia mecánica, química, térmica, tener buena porosidad, etc. (1), el carbón activado posee todas estas características y además es posible llevar a cabo el proceso de inmovilización por métodos físicos o métodos químicos. De esta forma el carbón activado es una alternativa para utilizarlo como soporte de células o enzimas.

La levadura *Kluyveromyces-fragilis* produce la enzima intracelular β -D-galactosidasa que hidroliza los β -D-galactósidos, estos sustratos deben entrar a través de la membrana celular y para ello se necesita un tratamiento de permeabilización, por cuanto las células de levaduras intactas tienen baja actividad β -D-galactosídica. De lo mencionado anteriormente se desprende la importancia de estandarizar los métodos de determinación de la actividad lactásica de células de *Kluyveromyces-fragilis* libres e inmovilizadas.

MATERIALES Y METODOS

Organismo: Se emplea una cepa de *Kluyveromyces-fragilis* procedente del cepario del Centro de Investigación de Genética y Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (CEINGEBI).

Medios de cultivo: Se utiliza un medio de cultivo para mantener las células activas que tiene la siguiente composición: 2% de Agar, 0,3% de extracto de malta, 0,3% de extracto de levadura, 0,5% de peptona y 2% de lactosa. Se emplea un segundo medio de cultivo de producción de células con la siguiente composición 5% de lactosa, 0,75% de extracto de levadura, 0,84% de sulfato de amonio, 0,05% de sulfato de magnesio y 0,45% de fosfato dibásico de potasio, el pH del medio se ajusta a 5,5 con ácido sulfúrico.

Carbón activado: Se utilizan tres carbones: Norit[®], Área superficial 1300 m²/g., granulometría 2,5 nm, pH 6,7. Carbón activado de huesos, utilizado en la ingeniería azucarera Manuelita, Área superficial 100 m²/g, granulometría 2,5 nm - 0,63 nm, pH 6,6. Carbonizado de hueso, Área superficial 18 m²/g, granulometría 2,5 nm - 0,63 nm, pH 6,7.

Actividad enzimática de las células libres: Permeabilización: Para la determinación de la actividad lactásica de las células se requiere la permeabilización de la membrana celular. Una vez cosechadas las células se retiran del medio de fermentación por centrifugación a 3000 r.p.m., 15 minutos a 5°C, se lavan dos veces

con buffer de fosfatos de pH 6,6 0,1 M (KH_2PO_4 y K_2HPO_4) suplementado con 1 mM MgSO_4 y 0,1 mM $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Para permeabilizar las células con alcohol isoamílico se toma un paquete celular de 12,5 mg, se adicionan 5 mL de alcohol isoamílico, se lleva a un volumen final de 25 mL con buffer de fosfatos, se deja reaccionar por 15 min. y posteriormente se centrifuga, se elimina el sobrenadante y se lavan las células dos veces con buffer de fosfatos, para finalmente resuspenderlas en un volumen de 25 mL con buffer de fosfatos. Cuando se permeabiliza con CTAB se toma un paquete celular de 94 mg y se adiciona 10 mL de una solución al 0,1% de CTAB en buffer de fosfatos, se permite que reaccionen de 5 a 10 min. en baño de hielo para posteriormente centrifugar y eliminar el sobrenadante, se lavan las células con buffer de fosfatos y se resuspenden en un volumen final de 100 mL (3). Para la determinación de la actividad de las células se emplearon dos sustratos ONPG y lactosa.

Determinación de la actividad enzimática: Sustrato ONPG. Se toman 42 mL de solución de ONPG 2 mM previamente termostatada a 37°C preparada en buffer de fosfatos de pH 6,6, se adicionan 1 mg de células permeabilizadas (con CTAB o con alc. isoamílico) y se toman muestras de 10 mL cada minuto. La reacción se detiene introduciendo las muestras en baño de ebullición por 5 minutos. Finalmente se determina la absorbancia del o-nitrofenol (ONP) generado a 410 nm. **Sustrato Lactosa:** Se toman 20 mL de lactosa 3 mM termostatada previamente a 37°C preparada en buffer de fosfatos de pH 6,6, se adiciona el paquete celular 4,46 mg o 2,5 mg permeabilizado con CTAB o con alc. isoamílico respectivamente y se toman muestras de 3 mL cada tres minutos. La reacción se detiene introduciendo las muestras en baño a ebullición por 5 minutos. La glucosa generada se mide empleando glucosadeshidrogenasa Merck R.

Determinación de la actividad enzimática de las células inmovilizadas: Las células se inmovilizan sobre los tres carbones por el método de adsorción adicionando 5 g de carbón activado a 400 mL de medio de producción y se somete a esterilización en autoclave (15 lb de presión por 20 minutos). Este medio de cultivo se inocula al 1% con un preinóculo cuya dilución 1:10 tiene un porcentaje de transmitancia de 50 a 70% (método OD. a 540 nm para conteo de célula letales) y se dejan crecer las células hasta alcanzar la fase estacionaria. Posteriormente se elimina el medio de producción y se lava el complejo carbón-célula con el buffer de fosfatos 0,1 M (K_2HPO_4 y KH_2PO_4) suplementado con 1 mM en MgSO_4 y 0,1 mM en $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (pH 6,6), se permeabiliza con CTAB y se deja secar a temperatura ambiente. Finalmente se determina la actividad del complejo carbón-célula. Se termostatan 20 mL de solución de lactosa al 5% preparada en buffer de fosfato de pH 6,6 a 37°C, se adiciona un gramo del complejo carbón-célula, posteriormente se muestra y se detiene la reacción por introducción en baño a ebullición por 5 min. La alícuota se filtra y se mide la glucosa generada por glucosaoxidasa.

Una unidad de actividad se define como la cantidad de células que liberan 1 μmol de ONP o glucosa/min. Bajo las condiciones de ensayo.

RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Células de *Kluyveromyces-fragilis* libres. Se hace una curva de calibración de mg de células/mL v.s. D.O. a 540 nm y se sigue la cinética de crecimiento de la levadura (Figura 1). Para los ensayos de determinación de la actividad se cosecharon en todos los casos las células al inicio de la fase estacionaria (14 h). La actividad enzimática de las células intactas determinada empleando ONPG como sustrato alcanza una actividad promedio de solo 7 unidades/g. Comparando la actividad láctásica de las células tratadas con CTAB y alcohol isoamílico por el método de la distribución de "t" de Student para un nivel de confianza de 0,05%, se observa que no hay diferencia significativa entre las medias de las dos poblaciones, es decir, que la actividad de las células permeabilizadas con uno u otro agente es la misma y es aproximadamente 200 veces mayor que la actividad de las células intactas, lo que hace factible estudiar (Tabla 1) la utilización de las células permeabilizadas en procesos industriales.

CINETICA DE CRECIMIENTO DE KLUYVEROMYCES FRAGILIS

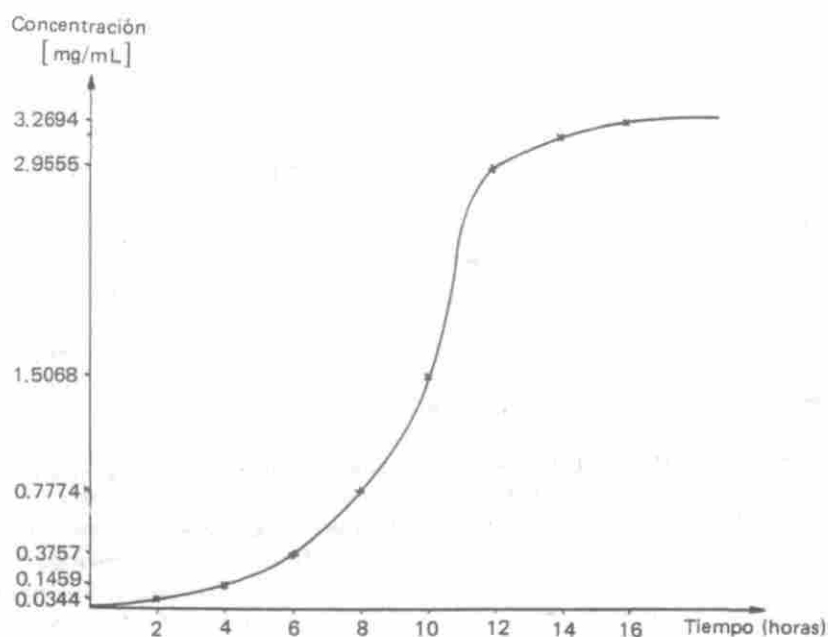


FIGURA 1.

Tabla 1
ACTIVIDAD LACTASICA DE *Kluyveromyces-fragilis*

TRATAMIENTOS	SUSTRATOS	
	ONPG* $\mu\text{mol ONP}/\text{min}/\text{g}$	LACTOSA** $\mu\text{mol glucosa}/\text{min}/\text{g}$
Células intactas	7,00	353,50
Células Permeabilizadas con CTAB	1.521,00	794,23
Células Permeabilizadas con alcohol isoamílico	1.443,80	713,98

* ONPG 2 mM

** Lactosa 3 mM

La actividad lactásica de las células intactas determinada empleando lactosa como sustrato (Tabla 1), es mayor que la obtenida por el método de ONPG como sustrato, este resultado puede ser debido a que la lactosa por ser el sustrato que metaboliza la célula es más fácilmente reconocida por la β -D-galactosidasa permeasa presente en la pared de la célula intacta (4).

Se observa, que la actividad enzimática de las células permeabilizadas por ambos agentes determinada empleando el método de ONPG es mayor que la actividad de las células determinada empleando el método de lactosa como sustrato (Tabla 1), posiblemente debido a que la enzima en la célula permeabilizada, a semejanza de la enzima libre, posee una mayor afinidad por el sustrato ONPG que por la lactosa. La enzima libre extraída de *Kluyveromyces-fragilis* tiene un valor de K_m de $1,37 \times 10^{-3}$ M para el sustrato ONPG y $13,3 \times 10^{-3}$ M para lactosa como sustrato (5).

Células de *Kluyveromyces fragilis* inmovilizadas. La actividad enzimática de células de *K. fragilis* inmovilizadas por el método de adsorción sobre carbón activado es baja comparada con la actividad enzimática de células de *K. fragilis* inmovilizadas por el método de atrapamiento en geles de acetato de celulosa ($3 \mu\text{mol ONP}/\text{min.}/\text{g}$) (6), esto se puede explicar porque por el método de atrapamiento se logra una mayor concentración de biomasa dentro del soporte; sin embargo, se encontró un resultado bien interesante en la inmovilización de la levadura sobre carbón activado: A mayor área superficial del carbón mayor actividad enzimática del complejo carbón-célula (Tabla 2). Para futuros estudios de inmovilización de células o enzimas sobre carbón activado se debe tener en cuenta que el área superficial del soporte es uno de los factores que influyen en la capacidad de inmovilización del biocatalizador (7).

Tabla 2
**ACTIVIDAD LACTASICA DE CELULAS INMOVILIZADAS
 SOBRE CARBÓN ACTIVADO**

TIPO DE CARBÓN	LACTOSA* μmol glucosa/min/g
Carbón 18 m ² /g	0,10
Carbón 100 m ² /g	0,14
Carbón 1.300 m ² /g	0,71

* Lactosa 5%

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia, al Instituto de Biotecnología, a la Facultad de Ciencias y a los profesores Anundo Polanía y Elizabeth de Leal por su colaboración en el suministro de materiales y equipos.

BIBLIOGRAFIA

1. Lasking, R. I., "Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology", Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. USA, 1985, p. 2-4.
2. Manosalva, H.; Nieto, G.; "Estandarización de Técnicas para la Producción de β-D-galactosidasa por fermentación". Tesis Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, 1988, p. 60-67.
3. Joshi, M. S.; Gowde, G. R., "Permeabilization of Yeast Cells *Kluyveromyces-fragilis* by Cetyltrimethylammonium bromide. Biotechnology letters 1987, 9, 8, 549-554.
4. Lehninger, A., "Biochemistry". Worth Publishers, Inc. N.Y. 1970, p. 621-734.
5. George, T.; Kalra, M., "Immobilization and characterization of *Kluyveromyces-fragilis* beta-galactosidase", Indian Journal of Experimental Biology, 1980, 18, 1020-23.
6. Weckstrom, L., "Entrapment of whole cell yeast betagalactosidase in precipitated cellulose derivatives", Food Processing Engineering, 1980, 2, 148-151 (1980)*
7. Duarte, C. M.; González, G., "Determinación de la actividad enzimática de la beta-D-galactosidasa comercial y de células de *Kluyveromyces fragilis* libres e inmovilizadas sobre carbón activado", Tesis Química, Universidad Nacional de Colombia, 1989.