

Estudios preliminares de la extracción de la enzima β -D-Galactosidasa de células de Kluyveromyces Fragilis

Leonor Muñoz de Correal*
Yolanda Rico Rico**
María Mercedes Medina Escobar*
Omar Enrique Barbosa Trujillo*

RESUMEN

Este trabajo se realizó dentro del proyecto de investigación “Desarrollo tecnológico para la obtención de una enzima que hidrolice la lactosa de leche y suero”. Consiste en el estudio preliminar de los métodos para la obtención de extracto enzimático de la beta - D - Galactosidasa (Lactasa). La enzima fué obtenida por la fermentación sumergida de la levadura *Kluyveromyces fragilis*. Para su extracción se realizaron los siguientes procesos: congelamiento, calentamiento, secado al vacío, abrasión, tratamientos con alcohol isoamílico y buffer de fosfatos de potasio (KH_2PO_4 y K_2HPO_4). Se calculó el porcentaje de extracción de cada proceso y se determinó el rendimiento como actividad total recuperada.

Del estudio comparativo de los diferentes métodos se concluye que las mejores técnicas de extracción son: Congelamiento a -25°C 7 días con recuperación de 4750 U/g, calentamiento en estufa a 40°C por 18 horas con recuperación de 4474 U/g, secado al vacío a 40°C por 4 horas con recuperación de 4054 U/g y abrasión con arena por 3 horas con recuperación de 2918 U/g. Se recomienda efectuar un estudio de costos para seleccionar la técnica más adecuada con el fin de escalar el proceso.

SUMMARY

This work is part of the project “Technological development to obtain a microbial enzyme to hidrolize lactose in milk and

whey”. The present work deals with the preliminary study of the methods for the obtention of the enzymatic extract of beta - D - Galactosidase. The enzyme was gotten by fermentation from *Kluyveromyces fragilis* yeast. To obtain the enzymatic extract the following breakdown processes were carried out: freezing, heating, vacuum drying, freeze drying and treatments with abressive substances and buffer solutions of potassium phosphates (pH: 6.6).

The breakdown process was pursuit by means of the determination of the enzymatic activity in the extract and in the celular residue in terms of percentage against a comparative pattern. The profit was determined as a total recovered activity. From the comparative study of different methods is concluded that the best techniques are: Freezing (-25°C) during 7 days let to get 4.750 U/g; heating (40°C) during 8 hours; 4.474 U/g; vacuum drying (4°C) during 4 hours; 4.054 U/g and using sand as abressive agent 4 hours 2.918; U/g. A cost study to scale up the process is highly recommended.

INTRODUCCION

La enzima beta - D - galactosidasa (Lactasa) se encuentra ampliamente distribuída en la naturaleza en plantas, microorganismos como bacterias, hongos, levaduras y en organismos superiores como el hombre y demás mamíferos (1, 2). En estos últimos se encuentra localizada en las células epiteliales del intestino delgado. La enzima cataliza la hidrólisis de la lactosa de la leche en glucosa y galactosa, fácilmente asimilables por el organismo. Cuando hay carencia o deficiencia de la enzima lactasa, la lactosa no se hidroliza completamente y puesto que no puede absorberse, avanza hasta el intestino grueso produciendo flatulencia, calambres abdominales, dolor, diarrea, síndrome conocido como “Intolerancia a la lactosa” (3, 4).

La hidrólisis enzimática de la lactosa presenta ventajas desde el punto de vista nutricional, por lo anteriormente mencionado y porque dada su baja solubilidad puede cristalizarse en productos lácteos concentrados como helados, confites, cremas, arequipes, etc., produciendo una textura arenosa

* Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Apartado Aéreo 14490. Bogotá. COLOMBIA.

** Departamento de Química, Facultad de Ciencias. Universidad nacional de Colombia. Apartado Aéreo 14490. Bogotá. COLOMBIA.

que baja la calidad de los mismos. En los sueros, principal subproducto de la manufactura del queso, se emplea en la producción de jarabes edulcorantes para la industria alimenticia reduciéndose así la contaminación por eliminación de residuos (5). El proceso de obtención de la enzima beta - D - galactosidasa a partir de *Kluyveromyces fragilis*, comienza con la fermentación seguida de la extracción; puesto que es una enzima intracelular requiere de la ruptura o permeabilización de la pared y membrana celulares (6, 1).

Por cuanto no existe una técnica de extracción enzimática universal es necesario establecer métodos de extracción enzimática apropiados que garanticen inocuidad, alto rendimiento, buena estabilidad y bajo costo. El propósito de este trabajo es realizar in estudio preliminar de la extracción de la enzima, aplicando diferentes métodos y técnicas de posible aplicación industrial.

PARTE EXPERIMENTAL

La cepa de *Kluyveromyces fragilis* empleada, procede del cepario del Centro de Investigación Genética y de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (CEINGEBI) en Cuernavaca. La producción de las células de *K. fragilis* se llevó a cabo mediante procesos de fermentación sumergida (8). Para obtener células activadas se sembró en estría una asada de cepa madre en cajas de Petri con medio de mantenimiento constituido por: agar 2%, extracto de malta 0,3%, extracto de levadura 0,3%, peptona 0,5%. Se incubó a 30°C por 24 horas haciendo repiques durante tres días consecutivos.

Para la obtención del preinóculo fueron transferidas 3 asadas de cultivo de células activadas a erlenmeyers con 100 ml del medio de mantenimiento líquido de composición igual a la anterior (excepto el agar), se incubó a 30°C por 12 horas agitando a 100 rpm. De este cultivo se tomó una alícuota de 10 ml y se transfirió a un erlenmeyer con 90 ml del medio de producción con la siguiente composición: lactosa 6%, extracto de levadura 3%, sulfato de amonio 1,7%, fosfato dibásico de potasio 0,45%, mezcla de minerales 0,5% y se ajustó el pH a 5.5; se incubó a 30°C por 12 horas con agitación de 100 rpm.

La fermentación se efectuó en un microfermentador de un litro de capacidad, se inoculó una alícuota de 100 ml del cultivo anterior en un litro de medio de producción de composición igual al anterior, a excepción de la lactosa que se aumentó al 10%. Se incubó a 30°C con agitación de 100 rpm y aireación de 12 vvm por 13 horas.

Debido a la gran cantidad de biomasa requerida en los ensayos, se utilizó cada vez el producto de una fermentación, con el fin de establecer las mejores condiciones de cada uno. El producto de la fermentación se centrifugó a 5000 rpm por

20 minutos, el precipitado se lavó sucesivamente con buffer de fosfato de potasio (KH_2PO_4 y K_2HPO_4) 0.1 M, 0.1 mM en Mn^{++} y 1.0 mM en Mg^{++} ; pH 6.6.

Las células obtenidas se llevaron a un volumen de 100 ml con el buffer anterior. Para obtener las muestras de trabajo se colocaron en frascos viales los volúmenes de suspensión equivalentes a 100 mg de biomasa, se centrifugaron a 5.000 rpm durante 20 minutos desechando el sobrenadante y se conservaron en nevera a 4°C para posteriormente ser sometidos a los diferentes tratamientos de extracción enzimática. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Extracción enzimática por congelamiento. Se colocaron las muestras a -25°C por tiempos de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 15.0, 30.0 días.

Extracción enzimática por calentamiento. Se colocaron las muestras en estufa a las temperaturas dadas en la siguiente tabla y se retiraron a los tiempos preestablecidos.

Temperatura (°C)	Tiempo de calentamiento (horas)				
30	12.0	18.0	24.0	48.0	72.0
40	3.0	6.0	9.0	12.0	18.0
50	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
60	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0

Extracción enzimática por secado al vacío. Se secaron las muestras a 35, 40 y 45°C inicialmente en un evaporador rotatorio R-110 BUCHI por 10 minutos hasta un contenido de humedad del 5%, con un vacío dado por una bomba de 1 HP. Se completó el proceso de estufa al vacío a 25 mm de Hg a las temperaturas anteriormente anotadas. El tiempo para los ensayos fué de 1, 2, 3, 4 y 5 horas.

Extracción enzimática por abrasión. A las muestras se les adicionó 4 veces su peso en arena de río lavada con agua destilada. Se trituró homogéneamente en mortero de porcelana, retirando muestras cada hora durante 4 horas.

Extracción enzimática por tratamiento con alcohol isoamílico. Las muestras se sometieron a agitación en soluciones de alcohol isoamílico al 20, 30 y 40 % en agua a 200 rpm por 1, 2, 3, 4 y 5 horas, a temperatura ambiente (20°C).

Extracción enzimática por tratamiento con fosfatos. Se colocaron las muestras en 400 ml de soluciones buffer de fosfato de potasio, (KH_2PO_4 y K_2HPO_4) de concentraciones 0.1, 0.3, 0.5 y 1.0 M, a pH 6.6, a los tiempos de 30, 60, 90, 120 y 150 minutos. Se empleó un microfermentador de un litro de capacidad a 250 rpm y 40°C. Una vez terminado el proceso

cada muestra se sometió a agitación por una hora en el buffer de trabajo a 200 rpm para liberar la enzima de los restos celulares; seguidamente se separó la enzima soluble en el sobrenadante (extracto enzimático) de los restos celulares por centrifugación a 5000 rpm durante 20 minutos y se determinó la actividad enzimática en cada uno de ellos. En todos los casos se empleó como sustrato artificial ortonitrofenil - beta - D - galactopiranosido (ONPG) (9) en el buffer de trabajo. Una unidad de actividad enzimática está definida como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un mmol de sustrato por minuto, medido como los mmoles de ONP liberados a 40°C a pH 6.6.

El 100% de actividad enzimática se determinó permeando las células por el método del alcohol isoamílico en solución acuosa al 20% (9).

Seleccionados los métodos y establecidas las condiciones de rompimiento celular en cada proceso se realizó un estudio comparativo de rendimiento de todos los procesos con células provenientes de la misma fermentación.

Los resultados fueron reportados en términos de unidades de actividad enzimática en cada uno de los procesos, tanto en el extracto enzimático como en los restos celulares, cuya suma

corresponde a la actividad total y en porcentaje de actividad comparada contra un patrón de células permeadas con alcohol isoamílico al 20% en agua (9).

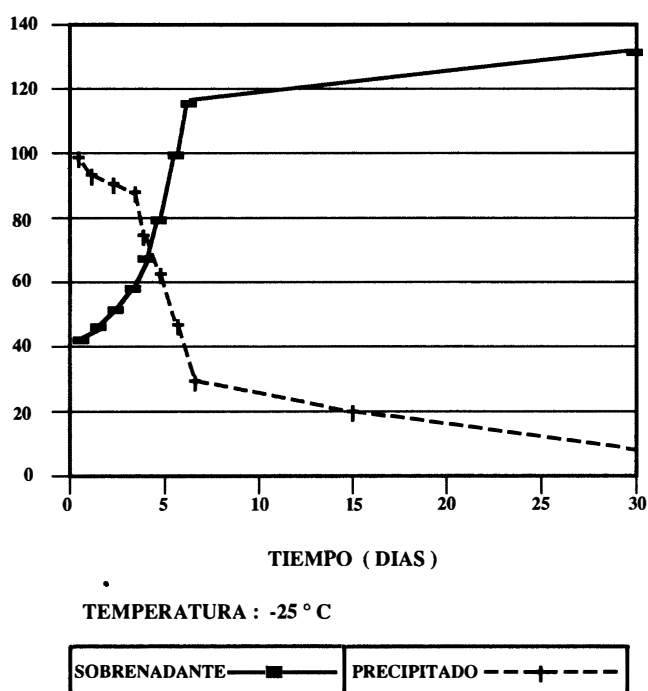
RESULTADOS Y DISCUSION

En la gráfica N° 1 que ilustra la *extracción enzimática por congelamiento* a -25°C se observa una velocidad de extracción enzimática relativamente alta hasta el séptimo día, en el período comprendido entre 7 y 30 días la curva presenta una pendiente mínima. Al final de la primera semana se extraen 4446 U/g, equivalentes al 115% frente al patrón del 100%.

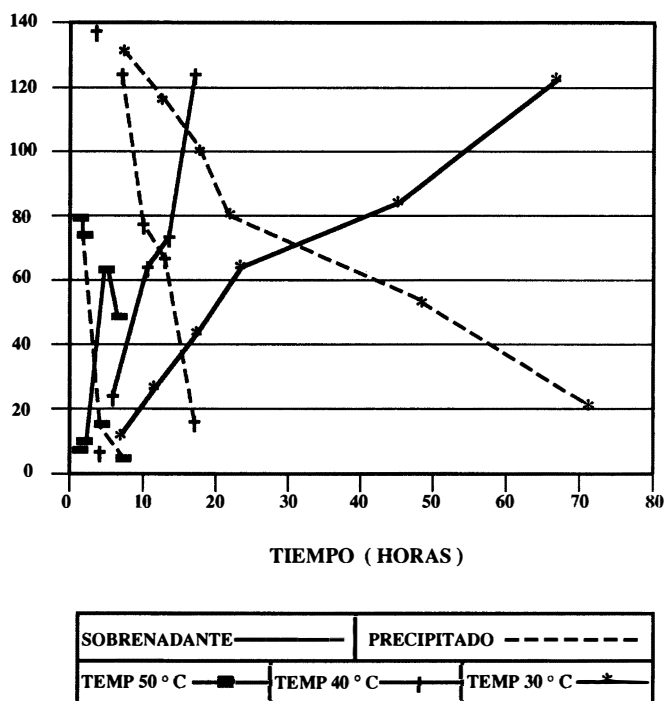
El seguimiento del proceso de *extracción enzimática por calentamiento*, gráfica N° 2, muestra que a 50°C la actividad enzimática extraída decrece y la enzima es inactivada en corto tiempo. Las mejores condiciones de recuperación se obtienen a 40°C por 18 horas con una actividad de 4817 U/g (127%) y a 30°C por 72 horas con recuperación de 4700 U/g (124%).

En la *extracción enzimática por secado con calor al vacío*, gráfica N° 3, se observa a todas las temperaturas ensayadas una mayor extracción que en el proceso de calentamiento, gráfica N° 2. Las mejores condiciones obtenidas son 40°C por 4 horas con una actividad de 3952 U/g (117.8%).

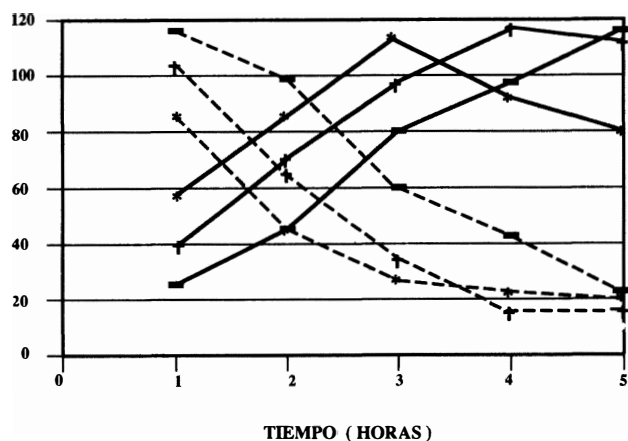
GRAFICA 1
ACTIVIDAD ENZIMATICA DE B-D-GALACTOSIDASA
EXTRAIDA POR CONGELAMIENTO



GRAFICA 2
ACTIVIDAD ENZIMATICA DE B-D-GALACTOSIDASA
EXTRAIDA POR CALENTAMIENTO

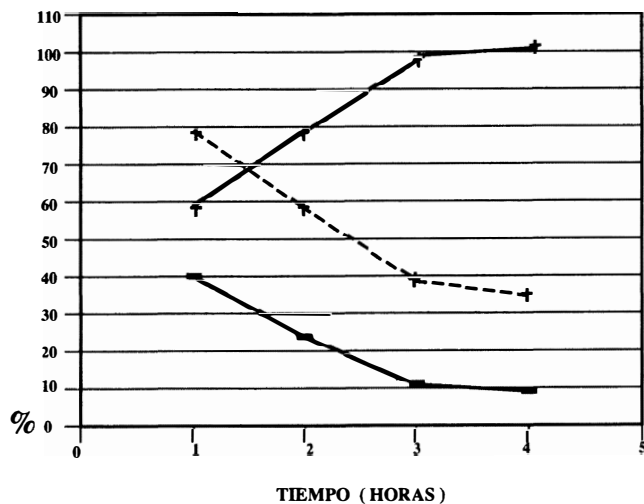


GRAFICA 3
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE B-D-GALACTOSIDASA
EXTRAIDA POR SECADO A VACIO



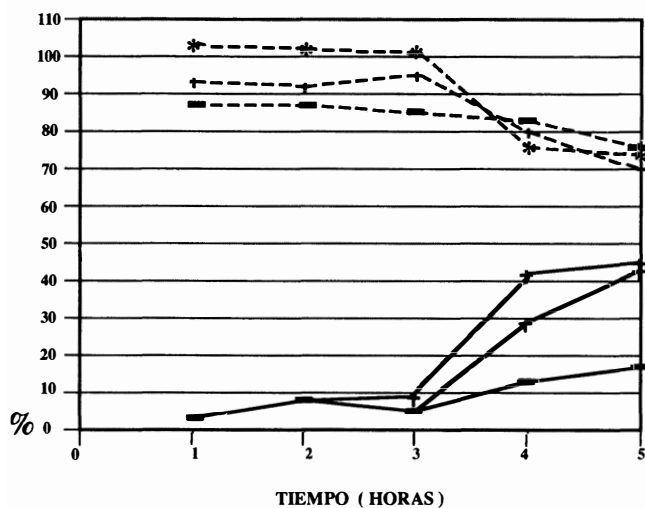
SOBRENADANTE	PRECIPITADO
TEMP 35 °C	TEMP 40 °C
TEMP 45 °C	

GRAFICA 4
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE B-D-GALACTOSIDASA
EXTRAIDA POR MORTERO



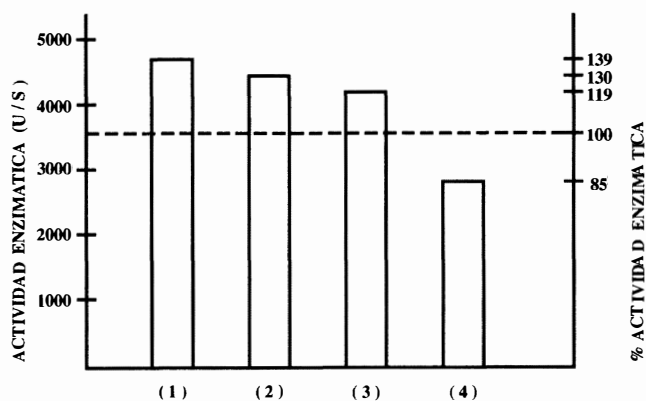
SOBRENADANTE	PRECIPITADO
DIATOM.	ARENA

GRAFICA 5
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE B-D-GALACTOSIDASA
EXTRAIDA POR ALCOHOL ISOAMILICO



SOBRENADANTE	PRECIPITADO
CONC. 20%	CONC. 30%
CONC. 40%	

GRAFICA 6
METODOS DE EXTRACCION ENZIMATICA



* 100 % A. E.

(1) CONGELAMIENTO -25% (3) SECADO AL VACIO, 40, 25 mmHg
(2) CALENTAMIENTO A 40°C, 18 HORAS (4) ABRASION CON ARENA

En la extracción enzimática por abrasión, gráfica N° 4, se logró una buena extracción a las 3 horas alcanzando una actividad de 3333 U/g (99%).

Utilizando los métodos de extracción enzimática por tratamiento con alcohol isoamílico y con buffer de fosfatos de

potasio, gráfica N° 5, se observa que aunque no inactivan la enzima a las concentraciones de prueba, los valores de actividad enzimática en el extracto son tan bajos que no muestran utilidad al compararlos con los demás métodos de extracción, por lo que no fueron considerados en el estudio comparativo.

Al hacer la comparación de los métodos de extracción enzimática, empleando células provenientes de la misma fermentación y teniendo en cuenta tanto el rendimiento del proceso como la recuperación de la enzima, se obtuvieron los siguientes resultados: Congelamiento a -25°C por 7 días con una actividad en el extracto enzimático de 4750 U/g (139%), calentamiento en estufa a 40°C por 18 horas, 4474 U/g (130%), secado al vacío a 40°C por 4 horas, 4054 U/g (119%) y rompimiento celular con abrasivo arena por 3 horas, 2918 U/g (85%) frente a un patrón de 3419 U/g (100%). Gráfica N° 6.

Los resultados obtenidos permitieron hacer una selección primaria de los métodos de rompimiento celular. Se recomendó efectuar un estudio de factibilidad técnico-económico de los procesos de extracción empleando técnicas de congelamiento, tratamiento térmico con y sin vacío, abrasión con arena así como los estudios de pureza y estabilidad de cada una de las preparaciones obtenidas. Por otra parte ofrece la posibilidad de estudiar la combinación de los métodos anteriormente anotados y optimizar el proceso de extracción enzimática.

BIBLIOGRAFIA

1. T. George, M. Kalra, *Indian Journal of Experimental Biology*, 18, 1020-1023 (1980).
2. R. Mahoney, A., Nickerson, R. Whitaker. *Journal of Dairy Science*, 58 (11), 1620-1629 (1974).
3. Harrison. *Medicina interna*. Tomo I y II. Editorial la Prensa Médica Mexicana, México, (1977).
4. H. Howard, Weetall. *Biotechnology and Bioengineering*, 16, 295-313 (1974).
5. Baret, J.L. "Production and application of immobilized lactase". Enzyme engineering (Enzyme Technology.) Academic Press Inc., 136, 411-423 (1967).
6. M. Declaire, M., Cat, W. and Van Huynh. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 9, 300-301 (1987).
7. Nieto G., Manosalva H. "Estandarización de técnicas para la producción de la beta - D - galactosidasa por fermentación". Tesis Farmacia. Universidad Nacional de Colombia (1989).
8. Duarte C., 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 (Oct. 1987).
9. UNAM - Centro de Investigaciones sobre Ingeniería Genética y Biotecnología. "Desarrollo tecnológico para la obtención de una enzima microbiana que hidrolize la lactosa en leche y suero". Programa Nacional de Biotecnología para América Latina y el Caribe. PNUD / ONUDI, (Sept. 1988).