

# Utilización de células permeabilizadas de *K. fragilis* para la obtención de leche con bajo contenido de lactosa

I. GARCÍA, L. ABÍN y R. TEJEDOR

Departamento de Tecnología y Control de los Alimentos, Facultad de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana, Cuba

Recibido en enero de 1990

Aprobado en abril de 1991

## RESUMEN

Células de *Kluyveromyces fragilis* aisladas por el Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) fueron permeabilizadas con una mezcla de tolueno-etanol (1:4) y 0,02 % de Tritón X-100 durante 20 minutos. La lactasa de células permeabilizadas presentó una actividad máxima a la temperatura de 55°C y una buena estabilidad a 50°C por más de 6 horas, mientras que el pH óptimo de 6,5 es similar al de la enzima libre.

La afinidad (Km) de la enzima en las células permeabilizadas, para el sustrato ONPG, fue de 2,63 mM y de 30,52 mM para la lactosa. Los resultados de la hidrólisis de lactosa en leche descremada en polvo se corresponden con los parámetros cinéticos obtenidos, alcanzándose un grado de hidrólisis de 93,17 % a las 5 horas a 50°C y un porcentaje de conversión de monosacáridos de 73,65 %, utilizando 2 g de células enteras permeabilizadas por litro de leche.

## SUMMARY

*Kluyveromyces fragilis* cells L(19-31) were permeabilized using a toluene / ethanol (1:4 v/v) mixture and triton X-100 at 0.02 % for 20 minutes. The greatest lactase activity from permeabilized cells was obtained at 55°C, as well as thermostability up to 50°C for more than 6 hours. The optimum pH is 6,5, similar to free enzyme.

The affinity (Km) of enzyme in permeabilized cells for ONPG and lactose are 2,63 mM and 30,52 mM, respectively.

The results of lactose hydrolysis in skim milk are in agreement with the kinetic parameters found, obtaining a 93,17 % lactose hydrolysis for 5 hours at 50°C and 73,65 % monosaccharides conversion, using 2 g of permeabilized cells/liter of milk.

## INTRODUCCION

El uso de la enzima proveniente de fuentes microbianas, especialmente de levaduras, para la hidrólisis de la lactosa de la leche, ha sido llevada a cabo desde hace algunos años, con algunas limitaciones prácticas a causa, entre otros factores, de la inestabilidad de la enzima para su uso en forma inmovilizada o en tratamientos a temperaturas mayores de 40°C y los costos requeridos para su aislamiento y purificación (Richmond *et al.*, 1981; Mahoney, 1982).

El empleo de células permeabilizadas para el estudio de actividad enzimática en microorganismos ofrece varias ventajas: el tratamiento es simple, rápido y permite ensayos enzimáticos en condiciones

similares a las que prevalecen *in vivo*, con respecto a la concentración e interacción de moléculas. Las células permeabilizadas pueden ser consideradas como fuentes de enzimas insolubles, las cuales pueden tener similares usos que las enzimas inmovilizadas por métodos convencionales (Declaire *et al.*, 1987).

La utilización de la lactasa de células permeabilizadas puede realizarse con una drástica reducción de los costos en comparación con la enzima libre e inmovilizada (Brodsky y Grootwassink, 1986).

El objetivo de este estudio es el desarrollo de un procedimiento basado en la permeabilización de células para obtener lactasa con posibilidad de ser usada a escala industrial, por su bajo costo y pocos problemas operacionales para la hidrólisis de lactosa en leche.

## MATERIALES Y METODOS

La cepa *Kluyveromyces fragilis* L(19-31) fue criada en cuña a 30°C por 72 horas en un medio que contenía 3 g de extracto de malta, 0,5 g de peptona y 1,5 g de agar por cada 100 ml a pH 5,4; posteriormente se inoculó en 300 ml del medio, el cual estaba compuesto por 40 % de suero de leche y el 60 % restante por una solución que contenía: 3 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,034 g de  $\text{MnSO}_4$ ; 0,5 g de extracto de levadura y 14,4 g de lactosa a pH 5. Se agitó a 30°C durante 18 horas, recolectándose en la fase final de la etapa exponencial de crecimiento por centrifugación, lavándose las células con agua destilada tres veces, mediante centrifugación.

La permeabilización fue realizada con tolueno-etanol (T-E) (1:4) y Tritón X-100 al 0,02 % (Serrano *et al.*, 1973), variando el tiempo de agitación en 20 minutos.

Las características de la lactasa de células permeabilizadas fueron estudiadas determinando: afinidad de la enzima por el sustrato ONPG y lactosa ( $K_m$ ), velocidad máxima de la enzima en condiciones óptimas ( $V_{max}$ ), pH y temperatura óptimos para la actividad, así como su comportamiento en la hidrólisis de la leche, estabilidad y conservación de las células.

La influencia del pH sobre la actividad lactasa fue estudiada en un rango entre 3 y 10, en una solución

de lactosa a 4,5 %, en un sistema tampón similar al de la leche (tampón M) recomendado por la Novo (1977), constituido por L: ácido cítrico  $\text{H}_2\text{O}$  1,66g; Na citrato 2  $\text{H}_2\text{O}$  0,795 g;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,18 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,52 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,47 g KOH 1,09 g;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,83 g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,75 g y  $\text{NaHCO}_3$  0,28 g, además de adicionar 2,5 ml de NaOH 4 N, ajustando el pH a 6,9 con HCL puro. El efecto de la temperatura se midió entre 30°C y 70°C al pH óptimo. El  $K_m$  y la  $V_{max}$  de las células permeabilizadas fueron determinados en el sustrato artificial O-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) y en lactosa, por el método de Lineweaver Burk (Lehninger, 1986).

## Determinación de la actividad enzimática

### Sustrato: ONPG

De una suspensión de células permeabilizadas, 15 mg (peso húmedo) por ml de tampón M (pH 6,5) se adicionaron 20  $\mu\text{l}$  en 1 ml de ONPG 10 mM a 55°C en baño termostático; la reacción fue detenida con 1 ml de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  1 M después de 1 minuto. La intensidad de color fue medida a 420 nm en un espekol Carl Zeiss. En el blanco se adicionó primero el  $\text{K}_2\text{CO}_3$  y posteriormente la suspensión celular. Se realizó una curva patrón de O-nitrofenol, la actividad se expresó como los micromoles de O-nitrofenol liberados por minuto, por miligramo de células (peso húmedo).

### Sustrato: Lactosa

En lactosa 4,5 % en tampón M (pH 6,5) fue adicionada igual cantidad de células que las descritas para el sustrato ONPG, llevándose a cabo la reacción durante 20 min a 55°C; la reacción se detuvo por calor en agua hirviendo durante 2 minutos. La glucosa formada por la acción catalítica fue determinada por GOD-perid Boheringer Mannheim test, utilizando un patrón de glucosa (2,750 mM) y un blanco de solución de lactosa. La actividad se expresó como los micromoles de glucosa liberados por minuto, por miligramo de células (peso húmedo).

## Obtención del extracto enzimático crudo (EEC)

150 mg de células (peso húmedo) en 1 ml de tampón M (pH 6,5) se adicionó a 1 g de perlas de vidrio de 60 mesh, se agitó vigorosamente durante 1 min, 4 veces, descansando alternadamente 1 min en hielo. El contenido fue centrifugado durante 5 min y se tomó el sobrenadante (Gancedo y Delgado,

1984). La actividad se realizó como se describió anteriormente, pero a temperatura de 40°C.

### Estabilidad de la $\beta$ -galactosidasa de las células permeabilizadas

El estudio de estabilidad se realizó durante 6 horas a 50°C y a 55°C, adicionando caseína a la suspensión de células a 3,5 %, como protector. La actividad se midió cada 30 min y cada 1 hora después de las dos primeras horas de incubación en baño termostático.

### Estabilidad de las células permeabilizadas durante el almacenamiento

Las células permeabilizadas fueron depositadas en viales pequeños, los cuales se almacenaron a 0°C y a -20°C, las tomas de muestras se realizaron mensualmente durante un año.

### Hidrólisis de lactosa en leche

Diferentes cantidades (25-200 mg) de células permeabilizadas fueron añadidas a 100 ml de leche descremada en polvo (LDP), reconstituida al 10 % y hervida. La hidrólisis transcurrió a 50°C en baño termostático durante 5 horas, en ligera agitación. Se tomaron muestras cada 1 hora, las que fueron centrifugadas inmediatamente por 5 min y fueron procesadas según Nickerson *et al.* (1976) para determinar lactosa y glucosa más galactosa, colorimétricamente.

## RESULTADOS Y DISCUSION

La estandarización de la técnica de permeabilización quedó establecida de la siguiente forma: 50  $\mu$ l de la mezcla tolueno etanol (1:4) y 10  $\mu$ l de Tritón X-100 al 2 % se añadieron por cada 10 mg/ml de suspensión de células según lo reportado en la literatura por Serrano *et al.* (1973).

El tiempo de agitación fue aumentado en 20 min pues en ese tiempo obtuvimos la mayor actividad, conservando la integridad de las células.

La actividad de la lactasa a diferentes temperaturas puede observarse en la figura 1. La máxima actividad fue alcanzada a 55°C, a diferencia de la actividad óptima del EEC, la cual se logra a 40°C, de acuerdo con trabajos anteriores realizados por Legón y Tejedor (1982). Esta alta temperatura permite realizar la hidrólisis en condiciones que mejoran la prevención de la contaminación microbiana, uno de los grandes problemas de la hidrólisis de la lactosa en la leche.

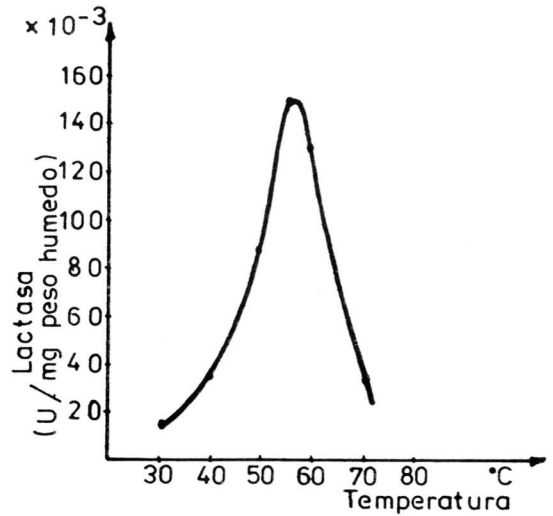


FIG. 1. Efecto de la temperatura sobre la actividad lactasa de células permeabilizadas (T-E,1:4 y Triton X-100 2 %), resuspendidas a razón de 15 mg/ml en tampón M, pH 6,5, las cuales fueron incubadas durante 5 minutos (tiempo de reacción) a las diferentes temperaturas. La actividad lactasa se desarrolló en sustrato ONPG.

Este aumento de la temperatura para la hidrólisis se debe a las posibilidades que brindan las células permeabilizadas a la protección de la actividad de la enzima, donde desempeña un papel fundamental la elevada concentración de proteínas que se mantiene dentro de la célula con la consecuente interacción proteína-proteína, además de otras condiciones del entorno

celular que favorecen mayor estabilidad y la protección de la actividad catalítica. Incluso existe un aumento de la actividad a temperaturas mayores de 40°C, pues los procesos de desnaturalización en estas condiciones no comienzan a afectar la actividad hasta temperaturas superiores a 55°C.

El pH óptimo de la enzima en las células permeabilizadas (figura 2) es muy similar a la forma libre de la misma en el EEC (Legón y Tejedor, 1982).

Con estos parámetros ya estandarizados, se obtuvo 1,66 veces más actividad

lactásica con las células permeabilizadas que con el EEC en sus condiciones óptimas. Este resultado se debe, fundamentalmente, al hecho de trabajar a mayores temperaturas.

Para las células enteras se trabajó en iguales condiciones que para las células permeabilizadas, obteniéndose sólo 0,04 veces la actividad del EEC (figura 3). Este resultado era esperado, puesto que es una enzima intracelular.

Los valores de Km y Vmax se resumen en la tabla 1, donde puede observarse que la afinidad de la enzima por su sustrato

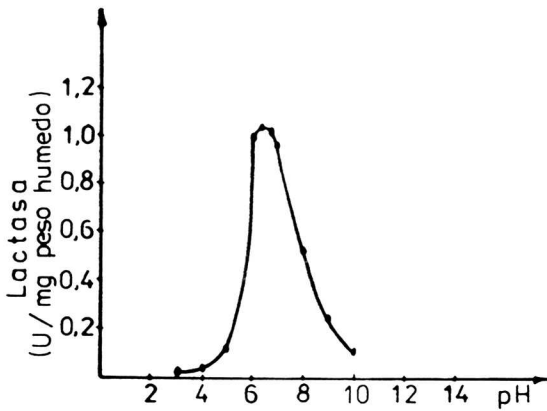


FIG. 2. Efecto del pH sobre la actividad lactasa de células permeabilizadas resuspendidas a razón de 15 mg/ml en tampón M, pH 6,5. La actividad fue realizada sobre lactosa en buffer M en un rango de pH 3-10 a 55°C.

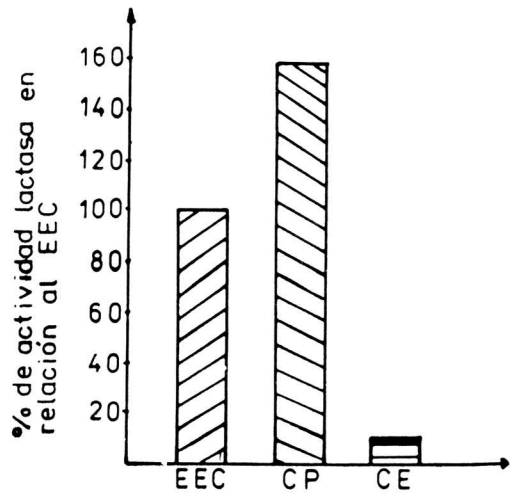


FIG. 3. Relación en por ciento (%) de las actividades de las células permeabilizadas (c.p.) y células enteras (c.e.) con relación al extracto enzimático crudo (e.e.c.). Actividad inicial: 0,123 U/mg p. húmedo de células.

Tabla 1  
RELACION DE Km y Vmax DE LA LACTASA DE CELULAS PERMEABILIZADAS

	Sustrato	
	ONPG	Lactosa
Km	2,63 mM	30,52 mM
Vmax	0,2 U/mg p. hum. células	0,8 U/mg p. hum. células

natural es menor, característica muy común en lactasa, de diferentes fuentes (Itoh *et al.*, 1982), sin embargo la  $V_{max}$  de la enzima es más elevada.

La lactasa de células permeabilizadas, como se mencionó anteriormente, presenta su máxima actividad a 55°C; sin embargo, la estabilidad de la enzima a esta temperatura es baja (30 min) (figura 4). La adición de caseína a concentraciones similares a la presente en la leche no ejerció efecto protector a 55°C; sin embargo, a 50°C la enzima permanece estable durante las 6 horas estudiadas observándose una protección ligera por la caseína.

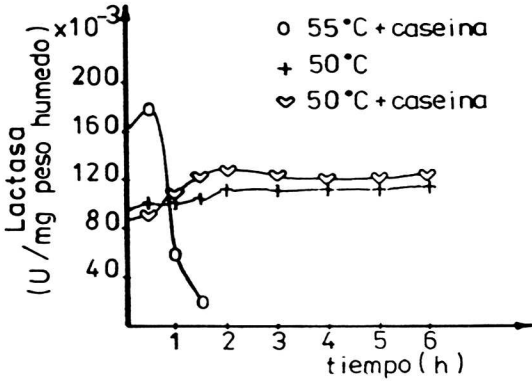


FIG. 4. Estabilidad de la lactasa de células permeabilizadas. Las células permeabilizadas se suspendieron a razón de 15 mg/ml en tampón M, pH 6,5, incubándose a 50 y 55°C con y sin caseína como protector. La actividad lactasa se realizó en sustrato ONPG en tampón pH 6,5 a T=55°C.

Las células permeabilizadas presentaron solamente el 10 % de pérdida de su actividad lactásica durante 1 año de almacenamiento a 0°C y -20°C, demostrando

la factibilidad de su conservación en esta forma sencilla.\*

En la figura 5 se observa la hidrólisis de la lactosa de la leche (LDP) en el tiempo. El comportamiento de la velocidad de hidrólisis responde a los datos cinéticos, ya que el  $K_m$  de la beta-galactosidasa para la lactosa es de 1,10 % de lactosa (30,52 mM), lo que indica que cuando la concentración de lactosa se encuentra a niveles menores de 2,2 % lo cual corresponde con el 48% de la lactosa inicial, la actividad de la enzima no es máxima.

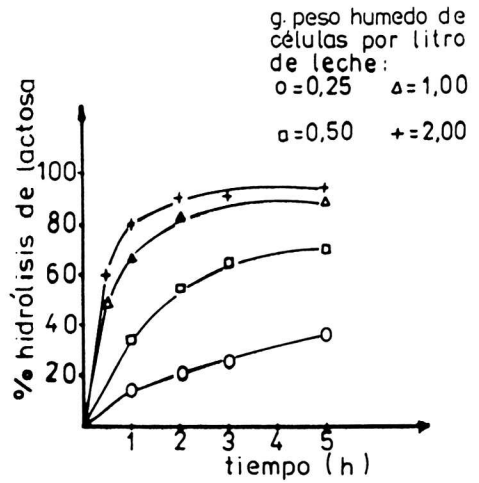


FIG. 5. Hidrólisis de lactosa en LDP por lactasa de células permeabilizadas a 50°C en función del tiempo y de la concentración de células.

Después de transcurrido este tiempo, el sustrato comienza a ser limitante, por lo que el comportamiento de la hidrólisis es similar a una reacción de primer orden. Estos resultados también indican que la hidrólisis no se incrementa proporcionalmente con la concentración de las células permeabilizadas.

\* Datos no publicados

**Tabla 2**  
**HIDROLISIS DE LA LACTOSA DE LDP, ADICIONANDO 2 g**  
**DE CELULAS PERMEABILIZADAS/LITRO**

Tiempo (h)	Gramos de lactosa/ 100 ml de leche	Porcentaje de hidrólisis	Porcentaje de conversión
0	4,81	-	-
0,5	1,95	60,00	18,82
1	0,99	80,00	25,35
2	0,46	90,87	36,80
3	0,46	90,87	45,30
4	0,39	92,33	59,45
5	0,35	93,17	73,65

El 93,17 % de hidrólisis de lactosa fue obtenido a las 5 horas de iniciado el proceso de hidrólisis en las condiciones estudiadas, cuando se utilizan 2 g de células permeabilizadas por litro de leche (tabla 2), mientras el por ciento de conversión correspondió al 73,65 %, calculado a partir de los monosacáridos libres formados durante la hidrólisis y la concentración inicial de lactosa (Mahoney, 1982).

La diferencia de estos resultados radica en el contenido de oligosacáridos que normalmente se forma en estos procesos a causa de la actividad transferasa de la enzima.

## CONCLUSIONES

La lactasa de células permeabilizadas con T-E (1:4) y Tritón X-100 al 0,02 % presenta las siguientes características:

- La actividad máxima de la enzima se logra a una T=55°C en una solución de lactosa 4,5 %, a pH 6,5.
- La actividad es 1,66 veces más alta que la encontrada por la enzima en el EEC, en sus condiciones óptimas.
- La enzima es estable a 50°C durante 6 horas.

- Al adicionar 2 g de células permeabilizadas (peso húmedo) por litro de leche, se logra una hidrólisis de 93,1 %, cuando el proceso es realizado a 50°C durante 5 horas.

## REFERENCIAS

- BRODSKY, J.A. y J.W.D. GROOTWASSINK (1986). Development and evaluation of whole-cell yeast lactase for use in dairy process. *Journal of Food Science*. **51**: 897-903.
- DECLÉIRE, M.; W. DE CAT y N. VAN HUYNH (1987). Comparison of various permeabilization treatments on *Kluyveromyces* by determining *in situ*  $\beta$ -galactosidase activity. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 300-302.
- GANCEDO, C. y M.A. DELGADO (1984). Isolation and characterization of a mutant from *S.cerevisiae* lacking fructose 1,6 biphosphatase. *Eur. J. Biochem.* **139**: 651-655.
- ITOH, T.; M. SUSUKY y S'ADACHI (1982). Production and characterization of  $\beta$ -galactosidase from lactose-fermenting yeast. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 899-904.
- LEGON, N.I. y R. TEJEDOR (1982). *Trabajo de Diploma*. Facultad de Biología, Universidad de La Habana.
- LEHNINGER, A.L. (1986). "Enzimas: cinéticas e inhibición". En *Bioquímica: las bases moleculares de la estructura y función celular*. Segunda edición, pág. 201. Edición Revolucionaria. I.C.L., 1986.

- MAHONEY, R.R. (1982). *Developments in dairy Chemistry 3. Lactose and minor constituents*. Chapter 3. Edited by P.F. Fox Elsevier Applied Sci. Publishers/London and New York.
- NICKERSON, T.A.; I.F. VUJICIC y A.Y. LIN (1976). Colorimetric estimation of lactose and its hydrolytic products. *J. of Dairy Sci.* 59: 340-346.
- NOVO INDUSTRIAS (1977). *Analytical Method*. No. A.F. 171: 1-6 B.
- RICHMOND, M.L.; J.I. GRAY y C.M. STINE (1981).  $\beta$ -galactosidase: Review of recent research related to technological application, nutritional concern and immobilization. *J. Dairy Sci.* 67: 2210.
- SERRANO, R.; Y.C. GANCEDO y J.M. GANCEDO (1973). Assay of yeast enzyme *in situ*. Potential tool in regulation studies. *Eur. J. Biochem.* 34: 479-482.