

Production of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* in batch cultures with cheese whey as substrate

Xiomara Montiel¹, Ingrid Carruyo¹, José R. Ferrer², Letty Marciano¹, Zulay Mármol² y Gisela Páez²

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Fax 515390. Telf. 598110-598109.

²Laboratorio de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería. Telf. 598746
Universidad del Zulia, Apartado Postal 526. Maracaibo, Venezuela

Abstract

The capacity of *Kluyveromyces fragilis* (*K. marxianus*) ATCC 8554 to induce the production of β -D-galactosidase during growth in deproteinized cheese whey at temperatures of 25°C and 29°C and at initial pH of 4.5 was studied. Enzyme activity was determined in cell-free extracts evaluating the hydrolysis of o-nitrophenyl- β -D-galactopiranoside (ONPG), as substitute for lactose. Extraction of the enzyme from fresh cells was achieved by autolysis using 2% toluene. The enzyme was released to the medium by permeabilization and partial digestion of the cell wall, without breaking, as revealed through electron microscopy. The highest activity, 0.604 μ mol ortonitrophenol /ml/5min was obtained at 29°C initiating the stationary phase. The results obtained, including the production of biomass, utilization of substrate and cell yield indicated the possibility of developing a bioprocess with cheese whey for the production of β -D galactosidase utilizing this microorganism.

Key words: β -galactosidase, *K. marxianus*, permeabilization, ONPG.

Producción de β -D-galactosidasa por *Kluyveromyces fragilis* en cultivo por carga, con lactosuero como substrato

Resumen

Se estudió la capacidad de *Kluyveromyces fragilis* (*K. marxianus*) ATCC 8554 para inducir la producción de β -D-galactosidasa durante su crecimiento en suero de leche desproteinizado, a las temperaturas de 25°C y 29°C y pH inicial de 4,5. La actividad enzimática se determinó en extractos libres de células, evaluando la hidrólisis del o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), como sustituto de la lactosa. La extracción de la enzima de las células frescas se realizó por autólisis de las mismas con tolueno al 2%, liberándose la enzima al medio por permeabilización y digestión parcial de la pared celular, sin rompimiento de las células, como lo reveló la microscopía electrónica practicada. La mayor actividad, 0,604 μ mol de o-nitrofenol liberado/ml/5min se obtuvo a 29°C al comienzo de la fase estacionaria. Los resultados obtenidos, incluyendo la producción de biomasa, utilización de sustrato y rendimiento celular, indican la posibilidad de desarrollar un bioproceso con el lactosuero para la producción de β -D-galactosidasa utilizando este microorganismo.

Palabras clave: β -galactosidasa, *K. marxianus*, permeabilización, ONPG.

Introducción

La β -galactosidasa (lactasa) hidroliza la lactosa de la leche, productos lácteos y suero a glucosa y galactosa [1, 2]. Dicha hidrólisis produce una reducción del contenido de lactosa y la modificación de sus propiedades funcionales que incluye: prevención de la cristalización, incremento del poder dulcificante, de los carbohidratos solubles fácilmente fermentables [3-5], que permitiría la elaboración de productos alimenticios de interés comercial e industrial tales como: concentrados congelados con mayor estabilidad física durante el almacenamiento y mejor reconstitución, productos deshidratados como leche en polvo con bajo contenido en lactosa adecuados para individuos intolerantes a este azúcar, productos cultivados como queso, yoghurt, los cuales mostrarían desarrollo acelerado de acidez, debido a la rápida utilización de la fuente de carbono, ya que la glucosa se presentaría en forma libre. El suero obtenido cuando se produce este tipo de queso incrementa su solubilidad por su bajo contenido en lactosa, lo que hace posible que al no presentarse su cristalización, sus sólidos puedan concentrarse para ser utilizados en helados y/o como humectantes en la confección de caramelos y confites [6-10].

La β -galactosidasa es una enzima intra- y extracelular, pero exclusivamente intracelular en *K. fragilis* [11]. Su actividad se determina sobre el sustrato inductor o bien con análogos; entre éstos los más comúnmente usados son, el XGAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) para la detección cualitativa *in vivo* y el ONPG para la determinación cuantitativa [12].

Una fuente importante de lactosa lo constituye el suero de leche, cuyo uso como aditivo para alimentos se ve limitado por el alto contenido de ésta. Sin embargo, *K. fragilis* creciendo en un medio a partir de suero de leche, con lactosa como única fuente de carbono, induce la producción de la enzima β -galactosidasa [13]. Los estudios respecto a la producción, tanto en lo que concierne a la influencia de los parámetros físico-químicos, concentración de la fuente de carbono, nitrógeno y disponibilidad de oxígeno son contradictorios. En consecuencia el objetivo de este ensayo fue valorar la producción de la β -galactosidasa en cultivo por carga inducida por *K. fragilis*

ATCC 8554 durante su crecimiento en suero de leche.

Procedimiento Experimental

Microorganismo: *K. fragilis* ATCC 8554, actualmente denominado *K. marxianus*, se obtuvo del centro internacional de cultivo, American Type Culture Collection. Se activó y se mantuvo en tubos de cultivos de 25 x 150 mm con agar papa dextrosa mas 0,5% de extracto de levadura (PDY) en forma de cuña.

Desproteización del suero de leche: El suero de leche fresco de vaca se desproteizó según el método propuesto por Ramana y Dutta [14], por calentamiento a 90°C por 10 min previo ajuste del pH a 4,5 con ácido fosfórico, se enfrió por 24 horas (4°C-8°C), se decantó y el extracto claro obtenido se filtró a través de papel Whatman N° 1.

Medio de cultivo: El suero desproteizado se suplementó con extracto de levadura 0,75%, sulfato de amonio 0,84% y sulfato de magnesio 0,05%, ajustado su pH nuevamente a 4,5 y esterilizado a 121°C por 15 min [15].

Bioproceso: Los biorreactores estuvieron representados por matraces de 125 ml de capacidad nominal, provistos de tapones de algodón y operados con un volumen de trabajo de 10 ml. Los procesos se evaluaron por duplicado a las temperaturas de 25°C y 29°C y pH inicial 4,5. El tiempo de operación fue de 12 horas y la velocidad de agitación de 200 rpm (baño recíprocante Lab Line). Durante el bioproceso se determinó, para cada hora desde la hora 0 (inmediatamente después de inocular) hasta la hora doce: concentración de biomasa, concentración de sustrato, actividad enzimática y pH.

Concentración de Biomasa: Fue seguida espectrofotométricamente (Spectronic 20 Baush and Lomb) a una longitud de onda de 650 nm [16, 17]. La densidad óptica fue relacionada con el peso seco de la biomasa por unidad de volumen, por medio de curvas de calibración adecuadas construidas previamente.

Velocidad específica de crecimiento (μ): Se determinó en la fase exponencial del crecimiento, para cada temperatura evaluada, utilizando la siguiente ecuación:

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1) \quad (1)$$

donde: X_1 y X_2 representan la concentración celular (peso seco) en mg/ml al tiempo t_1 y t_2 respectivamente. La unidad de μ fue expresada como el recíproco de hora (h^{-1}).

Rendimiento de biomasa (Y): Se determinó empleando la siguiente ecuación:

$$Y = \text{Biomasa producida} / \text{Lactosa consumida} \quad (2)$$

La biomasa producida, al igual que la lactosa consumida, resultó de la diferencia de los valores finales e iniciales obtenidos en el proceso.

Concentración de sustrato: La concentración de lactosa se determinó utilizando el método colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico [18]. Este análisis, al igual que la medición del pH, se realizó en el medio libre de células.

Actividad enzimática-Ensayo con tolueno: La actividad enzimática de la β -galactosidasa fue determinada sobre el sustrato cromogénico ONPG en extractos libres de células. Estos extractos fueron obtenidos al someter el microorganismo a la acción del tolueno; para ello la biomasa obtenida en cada tiempo fue resuspendida en buffer fosfato 0,1 M pH 6,6 con 2% de tolueno [19], agitada a 200 rpm a 37°C por 20 horas, después de las cuales se centrifugó a 9.000 g por 10 min, recuperando el sobrenadante para el ensayo. Una unidad de β -galactosidasa activa es definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de o-nitrofenol (ONP) al incubar a 37°C por 5 minutos 0,1 ml de extracto libre de células con 0,1 ml de ONPG 0,015M, diluidos hasta 3 ml con buffer fosfato. La cantidad de ONP liberado fue medida a 420 nm y el valor obtenido (con el uso de una curva patrón) fue expresado como μ mol de ONP/ml/5 min [19, 20].

Con el propósito de evidenciar el efecto del tolueno sobre *K. fragilis* fue realizada una microscopía electrónica de barrido (MEB); para ello las células control y las células tratadas fueron embebidas en glutaraldehído 2,5% p/v en buffer cacodilato 0,1M pH 7 por 3 horas (fijación) y luego lavada 3 veces con este buffer. En un portaobjeto limpio y seco se preparó un frotis fino, mediante lápiz de diamante se cortaron cuadrados de este portaobjeto de aproximadamente 0,5 cm², el pequeño trozo de vidrio se fijó con cinta doble

tape 3M a un portaespecimen de aluminio (STUB) bordeando el trozo de vidrio con plata coloidal diluida en acetato de amilo y secado en estufa a 37°C por una hora. El STUB se colocó en un cobertor iónico marca EIKO IB3 para el metalizado con película de oro de aproximadamente 100 Å a 200 Å. El examen al microscopio fue realizado con un MEB Hitachi-2300 entre 10 kV y 15 kV.

Análisis estadístico: Los datos fueron analizados e interpretados utilizando el coeficiente de correlación de Pearson a fin de determinar la influencia del tiempo sobre los parámetros estudiados (biomasa, consumo de sustrato, actividad enzimática). Para ello se utilizó el paquete estadístico Statgraf versión 7.0.

Resultados y Discusión

El análisis por MEB de *K. fragilis* ATCC 8554 autolizada con tolueno reveló que dicho solvente ocasionó cambios en la morfología.

Como se observa en la Figura 1, las células no tratadas presentan características propias de las levaduras pertenecientes a este género: forma helicoidal y superficie lisa.

Las células de *K. fragilis* después de 20 horas de exposición al tolueno se representan en la Figura 2, donde se aprecian depresiones en su superficie que pueden ser interpretadas como señal de una parcial digestión de la pared. Se observa igualmente un alargamiento de las células hasta adquirir formas cilíndricas, lo que podría explicarse como el producto de una disminución de su volumen interno; pueden aparecer enlazadas, posiblemente por la liberación de alguna sustancia adherente, producto de la digestión, y con pérdida de su rigidez. Los campos observados resultaron homogéneos sin ninguna célula rota, lo que permite inferir que la liberación de los compuestos marcadores del espacio intracelular (β -galactosidasa) ocurre por permeabilización con una digestión parcial de la pared celular pero preservando su continuidad [21, 22].

Al inocular células tratadas en un medio a partir de suero de leche, no se evidenció ningún crecimiento después de 48 horas de incubación a 25°C, 29°C, indicando que después de 20 horas de exposición al solvente, las células posiblemente pierden la capacidad de asimilar esta fuente de

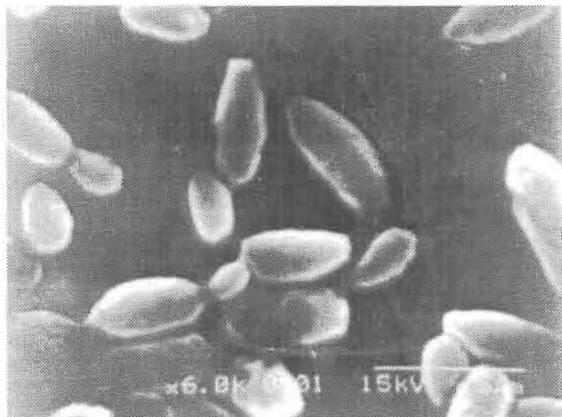


Figura 1. Células de *Kluyveromyces fragilis* cultivadas en suero de leche (control).

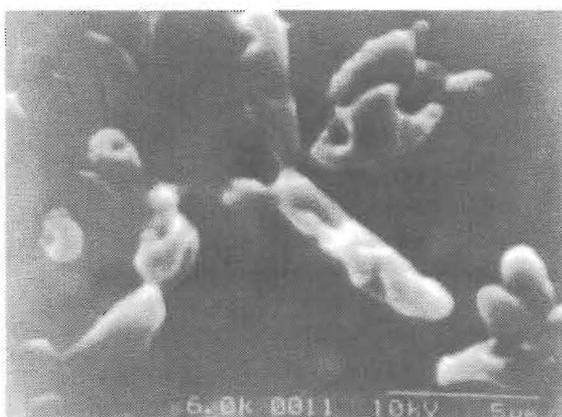
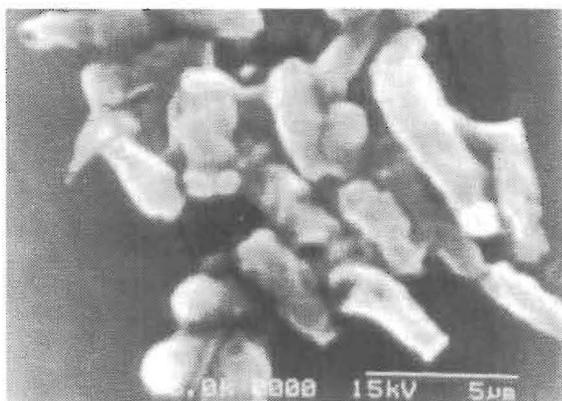


Figura 2. Células de *Kluyveromyces fragilis* tratadas con 2% de tolueno durante 20 horas.

carbono por la destrucción de la proteína que facilita el transporte de lactosa al interior de la célula [23-25].

Las Figuras 3 y 4 muestran el comportamiento del proceso a las temperaturas evaluadas, señalando: la cinética de crecimiento celu-

lar, de la utilización de lactosa y de la actividad enzimática, partiendo de un medio de concentración de lactosa de 4,78 g / 100 ml y pH de 4,5.

El crecimiento de *K. fragilis* a ambas temperaturas siguió la forma típica de la curva de crecimiento microbiano de un cultivo en el que no se renuevan los nutrientes o se ve autolimitado por la acumulación de productos metabólicos que inhiben el crecimiento. Como se puede observar en ambas curvas, la fase de adaptación no estuvo presente, lo que indica que no hubo limitación en el transporte de lactosa al interior de la levadura, ya que se partió de células inducidas con lactosa al utilizarse para la propagación del inóculo el mismo medio de trabajo. El crecimiento exponencial se mantuvo durante 10 horas de cultivo a 25°C y durante 8 horas a 29°C, obteniéndose una correlación positiva y altamente significativa entre la biomasa y el tiempo tanto para 25°C ($r = 0,9886$, $p < 0,01$) como para 29°C ($r = 0,9911$, $p < 0,01$) indicando que a medida que transcurre el tiempo hay un aumento en la biomasa que responde a las ecuaciones:

$$y = 0,8452 + 0,55X \text{ para } 25^{\circ}\text{C}$$

$$y = 0,9933 + 1,085X \text{ para } 29^{\circ}\text{C}$$

alcanzando el pH valores de 4,5 y 3,8 respectivamente.

La Tabla 1 reporta los valores obtenidos para la producción de biomasa, la velocidad específica de crecimiento y el rendimiento en biomasa bajo las condiciones del ensayo. En ella se observa que estos parámetros resultaron mayores a 29°C; se incrementó 1,4 veces la biomasa y se mantuvo prácticamente constante el rendimiento de *K. fragilis* producto del aumento de la velocidad específica de crecimiento, al elevarse en 4°C la temperatura, lo que indica que el rango de la temperatura evaluado no involucró la temperatura óptima de crecimiento para este microorganismo [26]. Por el contrario, se obtuvo una correlación altamente significativa al estudiar el consumo de sustrato con respecto al tiempo en ambas temperaturas ($r = -0,9761$ para 25°C y $r = -0,9979$ para 29°C), representando el 50% y el 66% respectivamente. Los resultados obtenidos están en el rango de los reportados en la literatura y obedecen o son particulares de la especie y/o condiciones de cultivo [12, 15, 17, 19, 20, 27].

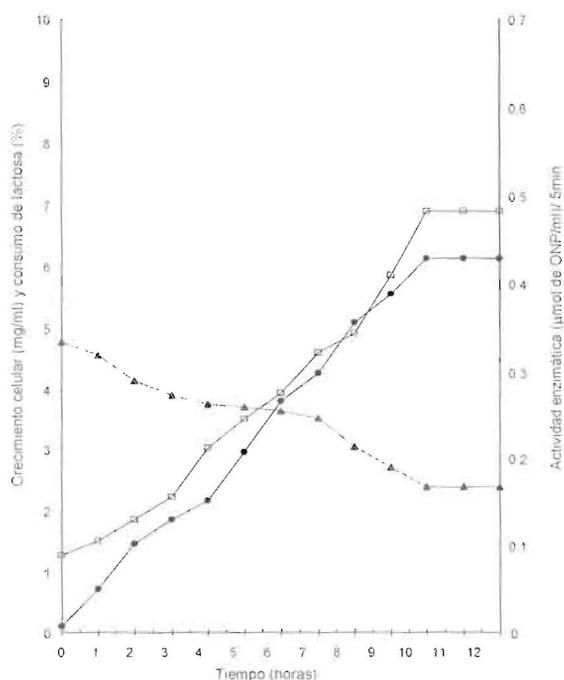


Figura 3. Actividad de la β -galactosidasa (●), consumo de lactosa (▲) y crecimiento celular (□) durante el cultivo de *K. fragilis* ATCC 8554 (*K. marxianus*) en suero de leche (pH inicial 4,5 y temperatura de 25°C).

Las Figuras 3 y 4 señalan que el comportamiento de la actividad enzimática en relación a la curva de crecimiento del microorganismo, alcanzó su máximo valor al inicio de la fase estacionaria en ambas temperaturas, siendo superior a 29°C. Se obtuvo correlación positiva altamente significativa de la actividad enzimática con respecto al tiempo, lo cual se evidenció tanto a 25°C ($r = 0,9975$, $p < 0,01$) como a 29°C ($r = 0,9882$, $p < 0,01$). Los valores máximos fueron, para 25°C 0,429 μmol de ONP/ml/5min y a 29°C 0,604 μmol ONP/ml/5min. Si se considera que de la solución de ONPG 0,015 M se utilizó para el ensayo 0,1 ml,

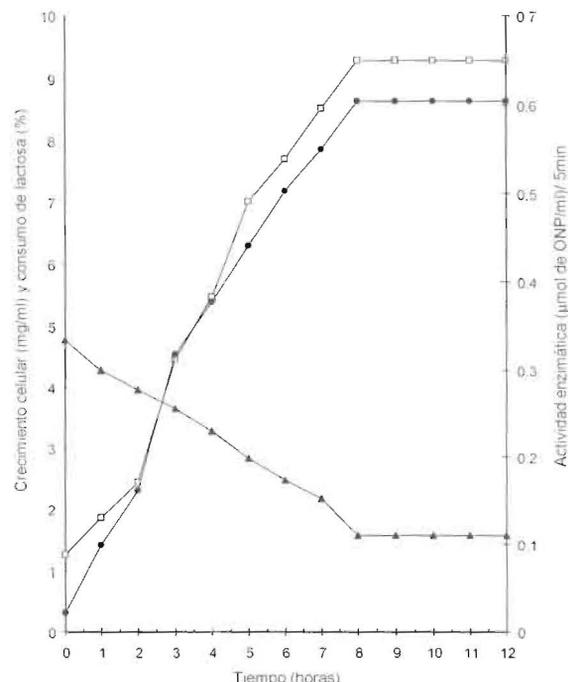


Figura 4. Actividad de la β -galactosidasa (●), consumo de lactosa (▲) y crecimiento celular (□) durante el cultivo de *K. fragilis* ATCC 8554 (*K. marxianus*) en suero de leche (pH inicial 4,5 y temperatura de 29°C).

se puede establecer que la cantidad de ONPG disponible en la reacción fue 1,5 μmoles , de allí que la hidrólisis del ONPG en los extractos crudos obtenidos de las células cultivadas a 25°C representó el 28,6% y en las cultivadas a 29°C el 40%.

Ya que las temperaturas de trabajo elegidas para el crecimiento y determinación de la actividad enzimática de *K. fragilis* probablemente no sean las óptimas para obtener la mayor cantidad de biomasa ni la actividad de la enzima [26], se afinarán los valores de esas variables en una banda de temperaturas más amplia, con miras a una posible aplicación industrial del proceso.

Tabla 1
Biomasa producida, velocidad de crecimiento (μ), y rendimiento (Y) para *K. fragilis* ATCC 8554 a las temperaturas del ensayo

Temperatura (°C)	Biomasa producida (mg/ml)	μ (h^{-1})	Y Biomasa producida / Lactosa consumida
25	5,63	0,186	0,23
29	7,93	0,285	0,25

Conclusiones

La producción de la enzima β -galactosidasa a partir de suero de leche involucra un proceso biotecnológico de tiempo corto de operación que puede resultar de fácil adaptación para una producción industrial de la misma.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican la posibilidad de desarrollar un bioproceso con el suero de leche para la producción de β -galactosidasa utilizando *K. fragilis* ATCC 8554. Este microorganismo creció a 29°C con una mayor velocidad específica de crecimiento, μ , condición a la que también se obtuvo una mayor actividad enzimática.

Agradecimiento

Expresamos nuestro más sincero agradecimiento a la Prof. Luz M. Soto de la Facultad Experimental de Ciencias por la colaboración prestada en el análisis estadístico realizado.

Referencias Bibliográficas

1. Murray, R.; Granner, D.; Mayes, P.; Rodwel P. (1992). Bioquímica de Harper. 12a. Ed. México: El Manual Moderno, S.A. pp. 414 - 415, 595 - 597.
2. Joshi, M.; Gowda, L.; Bhat, S. (1987) Permeabilization of Yeast Cells *Kluyveromyces fragilis* to Lactose By Cetyltrimethylammonium Bromide. *Biotechnol. Letters* 9:549-554.
3. Holsinger, V. (1978). Lactose-Modified Milk and Whey. *Food Technol.* 3: 35-40.
4. Broome, M.; Roginski, H.; Hickey, M. (1983). The Enzymic Hydrolysis of Lactose in Skim Milk Yoghurt. *J. Dairy Technol.* 3:35-37.
5. Rahim, K.; Byong, L. (1991). Separation of Proteinase from β -galactosidase of Psychrotrophic *Bacillus subtilis* KLBB. *J. Dairy Sci.* 74:46-49.
6. Mathur, B.; Shahani, K. (1979). Use of Total whey Constituents for Human Food. *J. Dairy Sci.* 62: 99-104.
7. Kosikowski, F. (1979). Whey Utilization and Whey Products. *J. Dairy Sci.* 62:1149-1158.
8. Warren, C. (1979). Whey Processing and Utilization. *J. Dairy Sci.* 62:96-98.
9. Willelt, A.; Ugalder, U. (1987). The Production of Single-Cell Protein from Whey. *Biotechnol. Letters* 9:795-800.
10. Yang, S.; Silva, M. (1994). Novel Products and New Technologies for Use of a Familiar Carbohydrate, Milk Lactose. *J. Dairy Sci.* 77:35.
11. Bacci, M.; Siqueira, C.; Antoniazzi, S.; Veta, J. (1996). Location of the β -galactosidase of the Yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 10022. *Antoine Van Leeuwenhoek* 69: 375-361.
12. Keppert, F. 1995. A Rapid Permeabilization Procedure for Accurate Quantitative Determination of β -galactosidase Activity in Yeast Cell. *FEMS Microbiol. Letters* 128: 201 - 206.
13. Dickson, R.; Dickson, L.; Markin, J. (1979). Purification and Properties of an Inducible β -galactosidase Isolated from the Yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* 137:51-61.
14. Ramana, R.; Dutta, M. (1977). Production of Betagalactosidase from *Streptococcus thermophilus* Grown in whey. *Appl. Environ. Microbiol.* 34:185-188.
15. Figueroa, M. (1992). Relación entre la velocidad de consumo de azúcar y la actividad específica de β -galactosidasa de *K. fragilis*. Resumen del Curso Avanzado sobre Procesos Biotecnológicos. Instituto de Biotecnología. UNAM. México, pp 60-74.
16. García, M.; Torres, J.; López, A. (1987). Influence of Oxygen Transfer Rate on β -galactosidase Production from *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Letters* 9:417-420.
17. Ozilgen, M.; Ollis, D.; Ogridziak, D. (1988). Kinetics of Batch Fermentations with *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 10:165-172.
18. Dubois, M.; Gilles, J.; Hamilton, J.; Rebers, A.; Smith Fred. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28:350-36.
19. Mahoney, R.; Wickerson, T. (1975). Selection of Strain, Growth Conditions, and Extraction Procedures for Optimum Productions of Lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Dairy Sci.* 58:1620-1629.

20. Wendorf, W.; Amundson, C; (1971). Characterization of Betagalactosidase from *Saccharomyces fragilis* J. Milk Food Technol. 34:300-306.
21. Babayan, T.; Bezrukov, M. (1985). Autolysis in Yeast. Acta Biotechnol. 5: 163-168.
22. Amrane, A.; Prigent, Y. (1996) Behaviour of the Yeast *Kluyveromyces marxianus* Var. *marxianus* during its autolysis. Antoine Van Leeuwenhoek 69: 267-272.
23. Hansruedi, F. (1982). Review Permeabilized Cells. Anal. Biochem. 120: 211-234.
24. Dickson, R.; Barr, K. (1983) Characterization of Lactose transport in *Kluyveromyces lactis*. J. Bacteriol. 154: 1245-1251.
25. Carvalho, S.; Spencer, Y. (1990). Modes of Lactose Uptake in the Yeast Species *Kluyveromyces marxianus*. Antoine Van Leeuwenhoek 57: 77-81.
26. Stainer, R.; Doudoroff, M.; Adelberg, E. (1981). Microbiología. Ediciones Aguilar, S.A. Madrid, España. pp. 318-346.
27. Tekatoshi, I.; Suzoki, M.; Adachi, S. (1982). Production and Characterization of β -galactosidase from Lactose Fermenting Yeasts. Agric. Biol. Chem. 46: 899-904.

Recibido el 13 de Abril de 1998

En forma revisada el 6 de Noviembre de 1998