



Nº 61  
DES

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

OPTIMIZACION DEL PROCESO PARA LA PRODUCCION  
DE  $\beta$ -GALACTOSIDASA POR *Kluyveromyces fragilis*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

**JAVIER ALEJANDRO TORRES LOPEZ**

México, D.F.

**FALLA DE ORIGEN**

1992.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN	1
---------	---

CAPITULO I	
INTRODUCCION	2

CAPITULO II	
GENERALIDADES	6

2.1 Intolerancia a la lactosa	7
2.2 Enzimas	8
2.3 Cinética enzimática	9
2.4 Inducción de enzimas	11
2.5 Regulación de la producción enzimática	12
2.6 Crecimiento microbiano	14
2.7 Fermentaciones	15
2.8 Productos de la fermentación	18
2.9 Producción de lactasa	19
2.10 Propiedades de la enzima lactasa	23
2.11 Lactasa de <i>Kluyveromyces fragilis</i>	23
2.12 <i>Kluyveromyces fragilis</i>	23

CAPITULO III	
MATERIALES Y METODOS	26

3.1 Material biológico	27
3.2 Propagación del microorganismo	27
3.3 Determinación de la concentración celular	28
3.4 Determinación de azúcares reductores	28
3.5 Permeabilización celular	30
3.6 Determinación de actividad enzimática con ONPG	30
3.7 Etapas del proyecto planteado	32

CAPITULO IV  
RESULTADOS Y DISCUSION 33

4.1 Selección de la cepa.	34
4.2 Extracción de la enzima.	36
4.3 Optimización de la composición del medio de cultivo.	39
4.4 Efecto del pH inicial en la producción de lactasa.	43
4.5 Estabilidad de la enzima a diferentes valores de pH.	45
4.6 Producción en matraz Fernbach.	45
4.7 Producción en fermentador de 1 litro.	49
4.8 Producción en Fermentdor de 14 litros.	49

CAPITULO V  
CONCLUSIONES 59

CAPITULO VI  
BIBLIOGRAFIA 62

## SIMBOLOGIA

a	Actividad especifica (U/g)
Act <sub>TM</sub>	Actividad a la temperatura de medición (U)
b	Ordenada al origen
k <sub>L</sub> a	Coefficiente de transferencia de oxígeno (h <sup>-1</sup> ).
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis (mM)
N	Número de experimentos
n	Número de variables
Q	VVM (litros de aire por litro de medio por min.)
R	RPM (revoluciones por min.)
S	Concentración de sustrato (mM)
t	Temperatura (°C)
T <sub>M</sub>	Temperatura de medición (°C)
U	Unidades de actividad enzimática (μmol/min)
V	Velocidad de reacción (U/g)
V <sub>max</sub>	Velocidad máxima de reacción (U/g)
X	Biomasa (g/l)
μ	Velocidad especifica de crecimiento (h <sup>-1</sup> )

## Indice de figuras

Fig. 4.1.1	Producción de biomasa de 4 cepas de levadura.	35
Fig. 4.2.1	Efecto de la temperatura sobre la expresión de actividad lactasa a diferentes concentraciones de solvente.	37
Fig. 4.2.2	Efecto de la temperatura sobre la expresión de actividad lactasa a diferentes concentraciones de solvente.	38
Fig. 4.3.1	Cinética de crecimiento y producción de lactasa de <i>K. fragilis</i> .	40
Fig. 4.4.1	Efecto del pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lactasa de <i>K. fragilis</i> .	44
Fig. 4.5.1	Cinética de crecimiento, producción de lactasa y pH de <i>K. fragilis</i> crecida en matraz erlenmeyer de 500 ml.	46
Fig. 4.5.2	Efecto del pH sobre la actividad lactasa en células de <i>K. fragilis</i> , después de ocho horas de contacto.	47
Fig. 4.6.1	Cinética de crecimiento, producción de lactasa y consumo de azúcares de <i>K. fragilis</i> , crecida en matraz Fernbach.	48
Fig. 4.7.1	Fermentaciones realizadas en equipo Bio-Flo de 1 l. de volumen de trabajo en medio optimizado para <i>K. fragilis</i> .	50

## Índice de tablas

Tabla 2.5.1	Inductores análogos de algunas enzimas.	13
Tabla 2.8.1	Algunas levaduras más comunmente usadas y los procesos asociados a ellas.	18
Tabla 2.9.1	Desgloce de las diversas fuentes de obtención de la enzima lactasa.	20
Tabla 2.9.2	Principales preparaciones comerciales de la enzima lactasa y sus fuentes.	21
Tabla 2.10.1	Propiedades de la enzima lactasa y su fuente de obtención.	24
Tabla 4.1.1	Producción de lactasa por las diferentes cepas utilizadas.	36
Tabla 4.3.1	Método Box-Wilson; desgloce de variables y unidades utilizadas.	41
Tabla 4.3.2	Diseño experimental realizado y resultados obtenidos en la optimización del medio de cultivo para la producción de lactasa de <i>K. fragilis</i> .	42

## RESUMEN

Se estudió el proceso de producción de la  $\beta$ -galactosidasa obtenida de una cepa de *Kluyveromyces fragilis*. Inicialmente se hizo un estudio de selección de la cepa que mostrara una mayor producción de la enzima y con ésta se realizó la optimización del medio de cultivo. Después de realizar el montaje de las metodologías necesarias en el estudio, se estableció la composición básica del medio de cultivo y se definió la concentración de los componentes mediante un diseño experimental tipo Box-Wilson en matraces agitados. A este nivel se encontró que el oxígeno era un parámetro importante a considerar en la implementación del proceso de producción. Los estudios realizados en fermentadores de 14 litros mostraron que existe una relación estrecha entre el coeficiente de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ) y la producción específica de la enzima, de tal manera que a niveles bajos de transferencia de oxígeno, la producción de la enzima se ve favorecida. El incremento en el valor del  $k_L a$  produce un incremento en la generación de biomasa, aunado a un decremento en la producción específica de la enzima, mostrando un comportamiento asintótico a valores elevados de  $k_L a$ . Por esta razón se concluyó que la transferencia de oxígeno es el criterio más adecuado para el escalamiento del proceso.

## CAPITULO I

### INTRODUCCION

La lactasa cataliza la hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa. El hombre al momento de su nacimiento posee la capacidad de producir la suficiente cantidad de enzima para hidrolizar la lactosa presente en la leche materna (7.5 % aproximadamente). Sin embargo, conforme transcurre su desarrollo, dicha capacidad va disminuyendo hasta alcanzar un nivel mínimo crítico, aproximadamente a los cuatro años de edad.<sup>1</sup>

El grado de disminución en la producción de la enzima varía de acuerdo al grupo étnico al que se pertenece. El hecho de tener disminuida la actividad lactásica trae como consecuencia problemas de intolerancia a la lactosa que se manifiesta con la producción de heces irritantes y diarrea. Se ha observado que los grupos étnicos con hábito de consumo de productos lácteos en general son más tolerantes a este disacárido<sup>1</sup>.

Lo anterior justifica una de las más importantes aplicaciones de la enzima lactasa: la obtención de leche deslactosada. La leche así modificada no provoca problemas de intolerancia debido a que los productos de la hidrólisis son fácilmente digeridos.

La enzima lactasa es producida naturalmente por microorganismos tales como bacterias, hongos y levaduras, siendo estos últimos los microorganismos idóneos para ser utilizados en alimentos por sus características probadas de inocuidad.

Otra de las aplicaciones de la enzima es en el procesamiento del suero de leche. En México hay aproximadamente 2500 queserías donde se producen anualmente 146,000 toneladas de queso, de las cuales se puede

obtener un millón de toneladas de suero al año. Esta cantidad de suero contiene 48,000 toneladas de lactosa y 4,500 de proteína verdadera<sup>2</sup>.

El procesamiento del suero de leche le da al producto los siguientes atractivos: mayor digestibilidad de los productos elaborados a base de suero hidrolizado; mayor poder edulcorante de los productos de la hidrólisis (glucosa y galactosa); menor cristalización debido a la mayor solubilidad de los productos de la hidrólisis. Además, el suero representa un problema para las industrias en las que se produce, debido a que al ser deshechado se convierte en un contaminante al ocasionar una alta demanda bioquímica de oxígeno. Ante estos problemas, la alternativa de un procesamiento enzimático al suero para hidrolizar la lactosa presente y utilizar el producto resultante para la formulación de productos alimenticios, resulta sumamente atractiva. Los jarabes edulcorantes a base de suero hidrolizado se producen industrialmente desde 1982 en Estados Unidos, Gran Bretaña y Francia, para ser utilizados en helados, productos de panadería, aderezos, confitería y como sustitutos parciales de de azúcar y proteína de huevo.

El suero de leche es un magnífico medio de cultivo para el desarrollo de microorganismos por lo que se puede utilizar con este fin, ya sea con su contenido normal de azúcar (lactosa) o deslactosarlo para facilitar su metabolismo.

El objetivo general planteado en el presente trabajo consiste en la optimización de condiciones para la producción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa a partir de una cepa de *K. fragilis*.

Los objetivos particulares son:

- a) A partir de una cepa productora de lactasa, optimizar un medio de cultivo, cuya composición sea la más adecuada para la producción de la enzima.
- b) Establecer que variables de operación tienen mayor influencia en la expresión de la enzima y a partir de esto definir un posible criterio de escalamiento del proceso.

## CAPITULO II

### ANTECEDENTES

## 2.1 INTOLERANCIA A LA LACTOSA

La lactasa en el hombre es una enzima intestinal que actúa solo sobre la lactosa primordialmente en el yeyuno, el segundo de los tres segmentos del intestino delgado. La unidad funcional de la pared intestinal lo constituyen los vellos, compuestos de células metabólicamente activas diferenciadas sin división y las criptas de donde derivan los vellos. La lactasa rompe al disacárido lactosa en dos monosacáridos: glucosa y galactosa. Algo de la glucosa producida es utilizada directamente por las células de las vellosidades; la restante, al igual que la galactosa, entra al torrente sanguíneo para ser metabolizada en el hígado<sup>3</sup>.

La fisiología de la intolerancia es ahora bien conocida. Si la cantidad de lactosa presente en las células intestinales excede a la capacidad hidrolítica de la lactasa disponible (ya sea porque los niveles de lactasa sean bajos o por ingestión de grandes cantidades de lactosa) una porción de lactosa permanece sin digerirse. Una mínima parte de ésta se desplaza a la sangre para ser excretada en la orina; la mayor parte continúa su camino hacia el intestino grueso donde ocurren dos procesos. El primero es un proceso físico: las moléculas de lactosa incrementan el contenido de partículas del fluido intestinal comparado con el fluido de las células fuera del intestino y así, por acción osmótica, se drena agua fuera de los tejidos hacia el intestino. El otro proceso es bioquímico: la lactosa es fermentada por las bacterias en el colon produciéndose ácidos orgánicos y  $\text{CO}_2$  y los síntomas llegan a ser como los de cualquier diarrea fermentativa. La mayoría de los casos en que se presenta esta intolerancia es como

reacción secundaria a alguna enfermedad intestinal, principalmente en los infantes, por lo que se habla de una intolerancia transitoria. Si consideramos que en nuestro país las enfermedades intestinales tienen un alto grado de morbilidad, sería de gran importancia el producir un alimento lácteo deslactosado (leche o un derivado) que pudiera ser incorporado a la dieta sin que se corra el riesgo de producir el fenómeno de intolerancia<sup>3</sup>.

De acuerdo a un estudio realizado por Lisker y col.<sup>(4)</sup>, la intolerancia a la lactosa en México es muy superior a lo imaginado pues el 75% de la población es, en mayor o menor grado, intolerante a este disacárido.

## 2.2 LAS ENZIMAS

Las enzimas en general han tenido un papel muy importante en la vida del hombre. Desde los albores de la historia, el hombre ha hecho uso de las enzimas para proveerse de satisfactores que le reeditaran un tipo de alimentación más variada, a pesar de desconocer la naturaleza de las sustancias utilizadas. La producción de vinos, quesos, cerveza y pan son algunos ejemplos de la utilización empírica de las enzimas. No es sino hasta 1790 que el papel de las enzimas como tales se establece al hacerse los primeros estudios sobre la digestión enzimática en el estómago; sin embargo se podría decir que Luis Pasteur, en 1860, estableció las primeras bases de la enzimología como ciencia, cuando afirmó que los procesos fermentativos son catalizados por enzimas y postuló que éstas estaban íntimamente ligadas con la estructura y la vida de los microorganismos, siendo a partir de entonces que el misterio sobre la naturaleza y función de las enzimas

empezan a dilucidarse. En 1879, E. Buchner demuestra que la función catalítica de las enzimas es independiente de la estructura celular, al realizar una fermentación alcohólica con un extracto de células. En 1926 J.B. Sumner, aislando la enzima ureasa, postuló que las enzimas son de naturaleza protéica, lo cual no es aceptado sino hasta el periodo de 1930-36 en el que Northrop cristalizó pepsina y quimiotripsina<sup>(5)</sup>.

La utilización de microorganismos cobra un auge inusitado a medida que se avanza en la comprensión de la función y regulación de estas maquinarias multienzimáticas. Es precisamente cuando dicho conocimiento permite la manipulación de los microorganismos para la producción de enzimas que surge la enzimología como una disciplina y una tecnología, mismas que se afinan y especializan continuamente.

### 2.3. Cinética enzimática.

Una reacción enzimática se define como la interacción de una enzima con su sustrato para dar un determinado producto. Dicha interacción puede dar como resultado diversos cambios en la molécula de sustrato como son: hidrólisis, oxidación, isomerización, reducción, fosforilación, etc. La interacción entre enzima y sustrato se da cuando éste llega a la vecindad de la enzima y es atraído por las cadenas salientes de aminoácidos de su sitio activo<sup>(6)</sup>.

#### $\beta$ -galactosidasa (E.C. 3.2.1.23).

La  $\beta$ -galactosidasa está considerada dentro del grupo de las hidrolasas. En relación al mecanismo de reacción de la  $\beta$ -galactosidasa

con su sustrato se ha propuesto la transferencia del residuo galactosa de un galactósido a un aceptor (como agua, otro azúcar o alcohol) ocupando la galactosa y el aceptor una misma posición en la molécula enzimática. Aquí el aceptor entraría solo después de haber sido removida la galactosa.<sup>(7)</sup>

La reacción enzimática puede ser afectada por diversos factores como son el pH, la temperatura, tiempo de reacción y concentración de sustrato. El pH óptimo de reacción está en función de la fuente enzimática; por ejemplo, se sabe que la lactasa de *E. coli* tiene un pH óptimo de 7.0, mientras que la enzima de *K. fragilis* muestra una mayor actividad a un pH de 6.6. Se ha propuesto que la dependencia de la actividad enzimática al pH está influenciada fuertemente por iones divalentes<sup>(7)</sup>. En relación a la temperatura óptima de reacción de la lactasa, se reporta que las lactasas bacterianas generalmente muestran una mayor actividad a 37°C; se ha reportado que la enzima de *K. fragilis* tiene una temperatura óptima de reacción entre 37 y 40°C<sup>(15,16)</sup>.

En la literatura se describe el comportamiento de las enzimas al variar la concentración de sustrato.<sup>(8)</sup> A bajas concentraciones de sustrato, la velocidad de reacción será proporcional a dicha concentración por lo que se dice que la reacción es de primer orden. Conforme aumenta la concentración de sustrato la velocidad de reacción aumenta hasta alcanzar un valor máximo en el cual tenemos un orden cero de reacción, es decir, que la velocidad de reacción se hace independiente de la concentración de sustrato<sup>(8)</sup>.

La ecuación que describe la catálisis enzimática (modelo de

Michaelis-Menten), es la siguiente:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S}$$

donde:

$K_m$  = constante de Michaelis

$V_{\max}$  = velocidad máxima de reacción.

#### 2.4 INDUCCION DE ENZIMAS

De los cientos de enzimas que una célula es capaz de producir, un cierto número de ellas siempre está presente en concentraciones sustanciales. A tales enzimas se les dá el nombre de enzimas constitutivas. Ejemplos de éstas son las enzimas que convierten la glucosa a piruvato. Otras enzimas se producen solo cuando su sustrato o un compuesto análogo muy específico está presente en el medio; a éstas se les llama enzimas inducibles. A este último grupo pertenece la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

La inducción enzimática es definida como un incremento relativo en la velocidad de síntesis de una enzima específica resultado de la exposición del sistema de producción a una sustancia química.

Las enzimas inducibles se utilizan cuando el organismo se encuentra limitado a una sola sustancia como única fuente de carbono o energía, como podría ser un polisacárido, un oligosacárido o un aminoácido. El fenómeno de inducción es un mecanismo que posee la célula para economizar energía pues se evita la utilización de aminoácidos en la

manufactura de enzimas que no serán utilizadas a menos que se encuentre presente el sustrato para ella.

El modelo de inducción más ampliamente aceptado es el propuesto por Jacob y Monod (1961)<sup>(9)</sup>, apoyado por muchas evidencias genéticas y fisiológicas.

Existen al menos cuatro genes en el cromosoma (ADN) que condicionan la formación de una enzima en particular. El gen regulador R codifica para la formación de una proteína represora la cual es capaz de unirse a un gen operador O que controla el funcionamiento de un vecino gen estructural S. El gen promotor P es el sitio de iniciación de la ARN polimerasa, la enzima que cataliza la transcripción del ADN a ARN mensajero (ARNm).

Si la proteína represora se combina con O, la ARN polimerasa se bloquea y no se formará el ARNm complementario a la secuencia de ADN. Cuando O no se combina con la proteína represora por acción del inductor sobre R la ARN polimerasa puede realizar su función de transcribir el o los genes S.

## 2.5 Regulación en la producción de enzimas.

Muchas enzimas catabólicas caen dentro de la clasificación de enzimas inducibles. Los inductores típicos son sustratos tales como almidón y dextrinas para amilasa, sacarosa para invertasa, urea para ureasa, lactosa para lactasa, etc. La potencia de algunos inductores es enorme si consideramos el caso de una cepa de *E. coli* que produce 1000 veces más cantidad de  $\beta$ -galactosidasa en estado inducido, comparada con el

estado de no inducción<sup>(10)</sup>.

En muchos casos algunos análogos del sustrato natural de la enzima son más potentes como inductores (tabla 2.5.1), y algunos productos de la reacción enzimática también actúan como inductores<sup>(9)</sup>.

Tabla 2.5.1. Inductores análogos de algunas enzimas .

Enzima	Sustrato	Análogo inductor
$\beta$ -galactosidasa	Lactosa	Isopropil- $\beta$ -tiogalactósido.
Penicilin $\beta$ -lactamasa	Benzilpenicilina	Meticilina.
Amidasa alifática	Acetamida	N-metilacetamida
Celulasa	Celulosa	Soforosa

Existen algunos reportes en la literatura en los que se ha tratado de hacer que enzimas que son producidas mediante un mecanismo de inducción se conviertan en enzimas constitutivas. Dickson y colaboradores trabajaron con una cepa de *Kluyveromyces fragilis* de la que, por medio de mutaciones, se logró derivar otra cepa que producía 7 veces más enzima que la silvestre en ausencia del inductor<sup>(11)</sup>. Sin embargo, por ser la inducción un fenómeno muy complejo, aún no se ha logrado la obtención de cepas constitutivas estables que presenten los niveles de producción de enzima comparables con los obtenidos en sistemas inducibles.

Algunas enzimas son producidas durante el desarrollo del microorganismo pero llegan a ser reprimidas por los productos finales de la reacción que catalizan. Estos compuestos llamados corepresores se combinan con una proteína intracelular (apopresor), la cual es codificada por un gene regulador, para finalmente producir un represor. Así, algunas proteasas de muchos bacilos se producen a bajos niveles en presencia de algunos aminoácidos, aunque la eliminación de tales compuestos del medio de cultivo incrementa considerablemente la producción de la enzima.

También la limitación de amonio en el medio de cultivo provoca que ciertas enzimas, que catabolizan compuestos de nitrógeno, se desrepriman. Esas enzimas son: proteasas, ureasa, nitrato reductasa, ribonucleasa, arginasa, etc.

## 2.6 CRECIMIENTO MICROBIANO

Todo microorganismo requiere para su crecimiento una fuente de carbono y una de energía. En la mayoría de los casos la fuente de carbono y energía es la misma, aunque se hace necesario que el medio de cultivo en el que se realiza la propagación contenga todos los elementos suficientes para que la célula microbiana pueda sintetizar las macromoléculas necesarias para su desarrollo y para el óptimo funcionamiento de los sistemas enzimáticos que la constituyen.

Las levaduras requieren para su crecimiento fuentes de carbono y oxígeno, varios minerales, vitaminas, factores de crecimiento, oxígeno disuelto, temperatura y pH apropiados.

#### *Fuente de carbono*

La mayoría de las levaduras son capaces de utilizar D-glucosa, D-fructosa y D-manosa. Las enzimas para la hidrólisis de azúcares como sacarosa, rafinosa, melobiosa, almidón e inulina se encuentran fuera de la membrana celular, mientras que las enzimas para hidrolizar maltosa, lactosa y celobiosa se encuentran en el interior de la célula. La fermentación de polisacáridos tales como almidón o inulina (un polímero de fructosa), está restringido a pocas levaduras y a bajas velocidades de crecimiento<sup>(12)</sup>.

#### *Fuente de nitrógeno.*

La habilidad de las levaduras de asimilar diferentes fuentes de nitrógeno varía de especie a especie. Entre las fuentes de nitrógeno, el sulfato de amonio es asimilado por casi todas las levaduras. La asimilación de nitratos es mucho más reducida y de hecho, esto es utilizado como un criterio de clasificación. Los aminoácidos se utilizan también como fuente de nitrógeno, dependiendo de la habilidad particular de la levadura de desaminar el aminoácido para después incorporar el nitrógeno en algún constituyente celular. Otras fuentes alternativas de nitrógeno son la urea y las bases nitrogenadas.

### 2.7 Fermentaciones

Pasteur definió la fermentación como "la vida sin aire" y reconoció que en este proceso la energía metabólica se obtiene gracias a la propiedad de los organismos para realizar, en una u otra forma las funciones respiratorias, con el concurso del oxígeno presente, aunado a la presencia de fuentes de carbono y energía .

La fermentación se define actualmente como un proceso metabólico en el cual la energía procede de compuestos orgánicos que actúan tanto como donadores o aceptores de electrones<sup>(12)</sup>.

Desde el punto de vista de la energía de enlace, la fermentación puede interpretarse como un reagrupamiento de átomos de hidrógeno y oxígeno para la formación de compuestos más sencillos (más oxidados) y en donde se obtiene energía de una manera eficiente.

Con el fin de evitar confusiones, se considera como metabolismo fermentativo (fermentación) aquel que se desarrolla sin el concurso del oxígeno y metabolismo oxidativo (respiración) aquel que requiere la presencia de oxígeno.

Durante la propagación de un microorganismo en un medio de cultivo se pueden distinguir 3 fases de crecimiento: la fase *lag* en la que el microorganismo inicia su adaptación a las nuevas condiciones a las que se vé sometido; fase *log* en la cual el microorganismo se multiplica de manera exponencial para después alcanzar una última fase, la llamada fase *estacionaria* en la que las células dejan de crecer por agotamiento de sustrato o por la acumulación de algún metabolito inhibitorio del crecimiento.

Obviamente, la duración de cada fase de crecimiento dependerá de las condiciones a las cuales la célula se vea sometida. En algunos casos se busca favorecer el que una de las fases prevalezca sobre las demás; tal es el caso del cultivo continuo en donde, por ejemplo, el microorganismo se mantiene en fase *log* a una velocidad específica de crecimiento constante que será equivalente a la tasa de dilución del

cultivo. En otros casos, es la fase estacionaria la que interesa pues la célula puede dejar de crecer para utilizar el sustrato en la elaboración de un metabolito de interés.

#### *Respiración.*

De acuerdo a la acción que desarrolla el oxígeno en su comportamiento metabólico, los microorganismos se clasifican en:

-Aerobios obligados: necesitan la presencia de oxígeno para su desarrollo.

-Anaerobios estrictos: pueden crecer solo en ausencia de oxígeno.

-Organismos facultativos: crecen en ausencia de oxígeno y pasan, en presencia de oxígeno a un metabolismo de tipo respiratorio.

-Anaerobios aerotolerantes: se trata de organismos parecidos a los facultativos ya que pueden desarrollarse en presencia o ausencia de oxígeno pero su metabolismo es siempre de tipo fermentativo.

La habilidad de las levaduras para realizar la fermentación alcohólica varía de especie a especie y de cepa a cepa,<sup>(11)</sup> existiendo muchas levaduras que son totalmente incapaces de producir alcohol.

El metabolismo aeróbico es afectado tanto por los niveles de oxígeno presente como por la concentración de azúcares. Algunas levaduras que son crecidas en medios de cultivo con mas del 5% de glucosa, muestran una total inhibición para la síntesis de enzimas respiratorias; este es el efecto llamado "Crabtree". Las especies del género *Kluyveromyces* y algunas *Saccharomyces* no muestran dicho efecto. Cuando los niveles de azúcar decrecen en un cultivo aireado, hay un incremento en la actividad de las enzimas del Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos (CAT)

y una mayor actividad de las enzimas involucradas en el Ciclo del Glicolato (CG) en el sistema de transporte de electrones <sup>(12)</sup>.

## 2.8 Productos de la fermentación.

En el contexto general de las fermentaciones, los productos obtenidos mediante la utilización de las levaduras ocupan un lugar preponderante a pesar de que solo unas pocas de las 349 especies descritas por taxonomistas son de importancia económica (tabla 2.8.2) <sup>(6)</sup>.

---

Tabla 2.8.1. Algunas de las levaduras más comunmente usadas y los procesos asociados a ellas.

---

Especie	Productos/aplicación
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Panificación, cerveza, vino, biomasa, etanol.
<i>Saccharomyces uvarum</i>	Cerveza.
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Lactasa.
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Lactasa, etanol, biomasa.
<i>Candida utilis</i>	Acidos nucleicos, biomasa.

---

Los productos de la fermentación, ya sean metabolitos primarios o secundarios, pueden estar asociados a alguna de las fases de crecimiento del microorganismo, dependiendo tambien del tipo de metabolismo que la célula realice. Por ejemplo, es conocido que la producción de alcohol por levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) está directamente relacionado con la utilización del carbohidrato o fuente de carbono, además de que dicha producción se ve favorecida si las condiciones de crecimiento permiten un metabolismo de tipo

fermentativo.

En otros casos, la formación del producto de interés en un proceso fermentativo puede no tener relación aparente con el patrón de consumo del sustrato como en el caso de la producción de penicilina<sup>(6)</sup>.

## 2.9 Producción de lactasa.

La enzima lactasa ha sido encontrada en numerosos microorganismos, animales y plantas. Esta actividad enzimática fué encontrada en cientos de cepas de Enterobacteriaceae, en cepas de Pseudomonadaceae, Parvobacteriaceae, y Neisseriaceae. Entre las bacterias gram positivas, *Diplococcus pneumoniae*, *Streptococcus lactis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* y algunas *Propionibacteria* producen  $\beta$ -galactosidasa. La actividad  $\beta$ -galactosidasa está presente también en numerosas levaduras, protozoarios y en varios hongos<sup>(7)</sup> (tabla 2.9.1).

No todas las fuentes de la enzima pueden ser usadas para la elaboración de productos con fines alimenticios<sup>13</sup>. Las preparaciones de lactasa provenientes de *A. niger*, *A. oryzae* y *Kluyveromyces lactis* o *fragilis* son consideradas confiables para su utilización en alimentos, ya que tradicionalmente se han utilizado en la industria alimentaria.

La lactasa proveniente de *E. coli*, la especie más investigada, en principio no puede ser utilizada en alimentos debido a la toxicidad que producen los extractos crudos de coliformes.

---

Tabla 2.9.1. Desgloce de las diversas fuentes de obtención de la enzima lactasa

---

**Organos animales:**

Intestino, cerebro.

**Levaduras:**

*Kluyveromyces lactis*  
*Kluyveromyces fragilis*  
*Candida pseudotropicalis*  
*Brehanomyces anomalus*  
*Wingea roberstii*

**Bacterias:**

*Escherichia coli*  
*Bacillus megaterium*  
*Thermus aquaticus*  
*Streptococcus lactis*  
*Lactobacillus bulgaricus*  
*Lactobacillus helveticus*  
*Bacillus circulans*  
*Bacillus stearothermophilus*  
*Lactobacillus sporogenes*

**Hongos:**

*Neurospora crassa*  
*Aspergillus niger*  
*Aspergillus orizae*  
*Aspergillus foetidus*  
*Aspergillus flavus*  
*Aspergillus phoenicis*  
*Mucor pucillus*  
*Mucor miehei*  
*Alternaria palmi*

---

En la tabla 2.9.2 se enlistan las principales preparaciones comerciales de la enzima y la fuente de la cual se obtiene.<sup>(14.15)</sup>

---

Tabla 2.9.2. Principales preparaciones comerciales de la enzima  
lactasa y sus fuentes.

---

*Aspergillus niger*

1. Baxter laboratories Chicago Il., USA.
2. Dairyland Food Labs. Waukesha W., USA.
3. Kyona Hakko Kogyo Co., Japan.
4. Societé Rapidase, Seclin, France.
5. Wallerstein Co. Morton Grove Il., USA.
6. G B Fermentation Industries Inc. Il., USA.

*Kluyveromyces lactis*

1. Gist-Brocades, Holanda (Maxilact).
2. Nutricional Biochemical Coltd, Cleveland, USA.
3. Tokyo Tanabe Co. LTD, Japan.

*Kluyveromyces fragilis*

1. Kyowa Hakko Kogyo Co., Japan.
2. Sigma Chemical Co. St. Louis, USA.
3. Novo A/S. Dinamarca (Lactozym).

*Escherichia coli*

1. CF Boeringer GmbH Mannheim FRG.
2. Worthington Blochemical Corp. Freehold, USA.

---

Preparaciones de levadura suplementadas por:

1. British Drug House LTD. London, England.
  2. Debi Cassina de Pechi, Milan, Italy.
  3. Sturge Enzymes LTD. England, (Hydrolact).
  4. Miles laboratories, USA (GODO).
-

Existen en la literatura numerosos reportes acerca de la producción de lactasa por microorganismos que van desde bacterias (*E. coli*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*), hongos (*A. niger*, *A. oryzae*, *N. crassa*), hasta levaduras, siendo estas últimas las más citadas en la literatura<sup>(15,16,17,18)</sup>.

Existe consenso en cuanto a la composición básica del medio de cultivo para la producción de lactasa de levadura. Este medio deberá contener: lactosa, sulfato de amonio, fosfato de potasio y extracto de levadura.

De los reportes presentados a cerca de la producción de lactasa, destaca el realizado por Mahoney y col.<sup>(15)</sup>, ya que presenta de manera más completa y detallada los diversos estudios realizados; este estudio fué tomado como base para la realización del presente trabajo.

Mahoney y col. utiliza una gran variedad de cepas, seleccionando finalmente una cepa de *Kluyveromyces fragilis* (NRRL-Y1109). Los resultados más interesantes de este trabajo, se refieren al efecto de la concentración de lactosa en el medio de cultivo y al efecto del oxígeno en la producción de la enzima. De acuerdo a éstos, altas concentraciones de sustrato favorecen la producción específica de lactasa y niveles altos de oxígeno en el medio la desfavorecen.

Mahoney y col. emplea medios de cultivo hasta con un 15% de lactosa, concentración a la cual la producción de lactasa es máxima (10,000 U/l), mientras que con velocidades de aereación del orden de 0.03 vvm obtiene hasta 45,000 U/l.

Para la evaluación de la enzima producida en las células, realiza una extracción utilizando tolueno a bajas concentraciones por periodos largos de exposición.

## 2.10 Propiedades de la enzima lactasa

En la tabla 2.10.1 se resumen las propiedades de la enzima lactasa y su fuente de obtención<sup>(19)</sup>.

### 2.11 Lactasa de *K. fragilis*

Mahoney<sup>(15)</sup> reporta un estudio sobre las propiedades de la enzima  $\beta$ -galactosidasa aislada de una cepa de *Kluyveromyces fragilis*. La enzima contiene un solo tipo de subunidad con un peso molecular de 200,000. La lactasa purificada muestra una  $K_m$  para o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido de 1.61 mM y de 12.2 mM para lactosa. Además, esta enzima muestra un pH óptimo de reacción de 6.6 y una temperatura óptima de 37°C. La lactasa muestra inhibición por producto (galactosa), siendo ésta de tipo competitiva. Los iones  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$  y  $K^+$  parecen ser necesarios para la óptima actividad de la enzima.

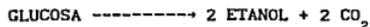
### 2.12 *Kluyveromyces fragilis*

Por ser la lactasa de *K. fragilis* la de mayor impacto en la hidrólisis de la lactosa en leche y suero dulce de leche, conviene señalar algunas de sus características: la reproducción de esta levadura es por medio de gemación multipolar (reproducción vegetativa) o por medio de ascosporas (reproducción sexual). Las ascosporas se forman después de una división meiótica, por lo que contienen un número haploide de

Tabla 2.10.1. Propiedades de la enzima lactasa y su fuente de obtención.

Fuente	pH óptimo	Temp. óptima °C	Peso molecular Kd	Iones activadores
<i>A. niger</i>	3-4	55-60	124	
<i>A. oryzae</i>	5	50-55	90	
<i>K. fragilis</i>	6.6	37	201	Mg, Mn
<i>K. lactis</i>	6.9-7.3	35	135	Mn, Na
<i>E. coli</i>	7.2	40	540	
<i>S. thermophilus</i>	6.2-7.1	55-57	530	
<i>C. inequalis</i>	3.4-4.3	30-55		
<i>B. circulans</i>	6	60-65		
<i>Bacillus sp.</i>	6.8	65		
<i>F. moniliforme</i>	3.8-5.0	50-60		
<i>L. bulgaricus</i>	7	42-45		
<i>L. citrovorum</i>	6.5	60		
<i>Scopulariopsis</i>	3.6-5.0	50-65		
<i>Mucor puccillus</i>	4.5-6.0	60		
<i>A. alternaria</i>	4.5-5.5	50-70		
<i>Thermus aquaticus</i>	4.5-5.5			

cromosomas, volviendo a recuperar su número diploide después de una conjugación de dos ascosporas. *K. fragilis* puede optar por varias vías metabólicas, dependiendo de las condiciones del medio en que se encuentra. En ausencia de aire esta levadura realiza la conversión de hexosas a etanol y CO<sub>2</sub> siguiendo la vía de Emben-Meyerhof:



El metabolismo aeróbico o respiración es el mecanismo predominante en

la célula para producir energía; en éste, el oxígeno molecular es el último aceptor de electrones. Mediante la vía oxidativa se producen precursores de la síntesis de aminoácidos y de muchos constituyentes macromoleculares de la célula.

## CAPITULO III

### MATERIALES Y METODOS

### 3.1 Material biológico

Se contó con 4 cepas de levadura para seleccionar la mejor productora de lactasa:

*Kluyveromyces fragilis* NRRL Y1109 proporcionada por la Universidad de California, en Davis EUA.

*Kluyveromyces fragilis* CDBB-278, *Kluyveromyces fragilis* UCD-351 y *Kluyveromyces lactis* UCD-335 todas proporcionadas por el Dpto. de Microbiología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### 3.2 Propagación del microorganismo.

*Preparación de cuñas de agar (medio sólido):*

Se prepararon 200 ml de medio de cultivo (previamente seleccionado) con 2% de agar y se vertieron 20 ml a tubos de 25 x 200; se esterilizaron a 121<sup>o</sup>C durante 15 minutos y se sembraron los tubos por estría para incubarlos a 29<sup>o</sup>C durante 48 horas y después se guardaron en refrigeración.

*Crecimiento en matraces fernbach:*

Se prepararon 1 litro de medio de cultivo en un matraz fernbach de 2.8 litros. Se esterilizaron a 121<sup>o</sup>C durante 15 minutos, se enfriaron y se inocularon con 3 asadas bien cargadas (aprox. 15 mg de levadura, peso seco) de la cepa tomada de una cuña. Se incubaron a 29<sup>o</sup>C y 200 rpm durante 18 horas en agitadora New Brunswick G-25.

### 3.3 Determinación de concentración celular

Para poder determinar la concentración celular en el medio de cultivo se realizó una curva de peso seco mediante el siguiente procedimiento:

De una solución patrón de levaduras ( Absorbancia aprox. 0.8 a  $\lambda$  de 650 nm. con dil. 1:50 ) se prepararon por duplicado 25 ml de 11 soluciones a diluciones de 1:1 a 1:10. De cada solución preparada se hizo una dilución 2:100 y se leyó su densidad óptica a 650 nm en un espectrofotómetro Beckman mod. 35. Se puso a peso constante 20 membranas millipore (poro 0.45 $\mu$  ), se pesaron y se guardaron en desecador.

Se filtraron las soluciones en las membranas millipore por filtración al vacío, utilizando las membranas pesadas anteriormente y se pusieron nuevamente las membranas a peso constante. Se determinó por diferencia la cantidad de levadura retenida en las membranas y se calculó la concentración de levadura (mg/ml) en cada solución preparada.

Después se construyó una gráfica de concentración celular (mg de peso seco/ml) contra absorbancia; de la gráfica anterior se obtiene la ecuación de la curva:

$$\text{Conc (g/l)} = \frac{\text{Abs} - 0.03}{0.0599}$$

### 3.4 Determinación de azúcares reductores<sup>20</sup>.

Los azúcares residuales en el medio de cultivo (lactosa) se determinaron por el método del ácido dinitrosalicílico<sup>(21)</sup> y se

fundamenta en la reducción del DNS por azúcares reductores, formando un compuesto aminado colorido, siendo la intensidad de dicha coloración proporcional a la concentración de reductores presentes en la muestra.

A) Preparación de reactivo:

En un vaso de precipitado conteniendo 50 ml de agua se añadió y se disolvió 1.6 gramos de NaOH. Se agregaron 30 gramos de tartrato de sodio y potasio y se colocaron en una parrilla con agitación; se agregaron lentamente 1 gramo de ác. dinitrosalicílico (DNS). Se aforó a 100 ml y se guardó en refrigeración protegido de la luz (duración del reactivo: 30 días a 4°C).

B) Curva patrón:

Se prepararon soluciones de lactosa de 0 a 2 mg/ml, se tomó 1 ml de cada solución y se le agregó 1 ml de reactivo de DNS. Se puso en agua a ebullición durante 5 minutos y se enfrió en baño de hielo.

Se agregaron 10 ml de agua destilada, se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente y se leyó a 540 nm en espectrofotómetro utilizando como blanco agua mas reactivo.

Se construyó una gráfica de absorbancia contra concentración de lactosa para obtener la ecuación de la curva de la forma:

$$\text{Conc. l (g/l)} = \frac{\text{Abs} - b}{m}$$

C) Procesamiento de las muestras:

Se tomó 1 ml de la muestra, se le hace una dilución y se siguió el mismo procedimiento que para las soluciones de la curva patrón. Se

transformaron las lecturas de absorbancias a concentración (mg/ml) mediante la fórmula:

$$\text{Conc2} = \text{Conc1} \times \text{factor de dilución}$$

• La dilución de la muestra dependió de la concentración de lactosa presente; para concentraciones abajo de 2 mg/ml no se hizo dilución.

### 3.5 Permeabilización celular.

El proceso de permeabilización se define, previa experimentación, de la siguiente forma:

De una suspensión de levaduras (muestra) se tomaron 12.5 mg de células y se colocaron en un matraz aforado de 25 ml; se le añadieron 5 ml de solvente (tolueno o alcohol isoamilico) y se aforó con buffer de fosfatos 0.1 M con iones  $\text{Mg}^{++}$  1 mM y  $\text{Mn}^{++}$  0.1 mM (buffer A). Se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador por inversión.

nota: Las muestras permeabilizadas deben de procesarse inmediatamente después del periodo de agitación.

### 3.6 Determinación de la actividad enzimática con ONPG.

Se preparó una solución de ONPG (orto-nitrofenil- $\beta$ -D galactopiranosido) 0.068 M (20.5 mg/ml de buffer A). En un tubo de ensaye de 13 x 100 mm. se añadieron las siguientes soluciones:

2.7 ml de buffer A.

0.1 ml de 2-mercaptoetanol 3.36 M

0.1 ml de la mezcla de permeabilización agitada vigorosamente en vórtex.

Se agregó 0.1 ml de la solución de ONPG e inmediatamente se agitó y se colocó en la celda del espectrofotómetro, tomando lecturas de absorbancia ( $\lambda = 410 \text{ nm}$ ) cada 30 seg durante 4 min.

Se transformaron las lecturas de absorbancia a  $\mu\text{moles}$  de ONP/ml utilizando el coeficiente de extinción del ONP a la temperatura de medición ( $1.18 \mu\text{M}^{-1}\text{pH } 6.6$ ) y se hizo una regresión lineal de los datos de  $\mu\text{moles /ml}$  contra tiempo.

Se calculó la actividad total de la reacción (la pendiente de la recta, multiplicada por el volumen total de reacción) en unidades totales\* y la actividad específica de las células (actividad total/g de células) en U/g.

\* Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar un  $\mu\text{mol}$  de ONPG por minuto a las condiciones de reacción establecidas (pH 6.6).

Las unidades reportadas en este trabajo siempre están referidas a una temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ . Para la transformación a estas condiciones se determinó la energía de activación de la enzima, obteniéndose la siguiente expresión:

$$\text{Act}(40^{\circ}) = 1.0043 \times 10^{-7} (\text{Act}_{T_H}) e^{\frac{5043}{273+T_H}}$$

donde:

$\text{Act}_{T_H}$  = Actividad a la temperatura de medición.

$T_H$  = Temperatura de medición en  $^{\circ}\text{C}$ .

### 3.7 Etapas del proyecto planteado.

En el presente proyecto de tesis se contempló realizar las siguientes etapas:

- I. Establecer las metodologías necesarias para el proyecto en particular.
- II. Seleccionar, a partir de un lote de microorganismos productores disponible, una cepa que sea buena productora de la enzima lactasa.
- III. Optimizar la producción de la enzima lactasa, por medio del desarrollo de los siguientes puntos:
  - a) Establecer la composición adecuada del medio de cultivo que favorezca la producción de la enzima.
  - b) Verificar el efecto del pH, temperatura y volumen de trabajo en la producción de la enzima.
  - c) A partir de los resultados obtenidos a nivel matraz, evaluar la producción de la enzima en fermentadores de 1.5 litros, variando los niveles de aereación y agitación.
  - d) Realizar fermentaciones a nivel de 14 litros, optimizando las variables manejables en estas unidades de fermentación.
  - e) Establecer la concentración adecuada de solvente y el tiempo de tratamiento en la permeabilización celular y la extracción de la enzima.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSION

#### 4.1 Selección de la cepa:

Para esta etapa se contó con cuatro cepas (descripción en materiales y métodos), las cuales fueron propagadas en un medio de cultivo reportado por Mahoney. Aquí se sustituyó el  $\text{NH}_4\text{OH}$  por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  conservando la cantidad de nitrógeno equivalente.

Se inocularon 100 ml de medio en matraces de 500 ml con 3 asadas de las cepas conservadas en cuñas de agar. Las condiciones de crecimiento fueron:  $29^\circ\text{C}$  y 200 rpm en incubadora New Brunswick Mod. 25, siguiendo el curso de la fermentación por un periodo de 40 horas.

Los parámetros tomados en cuenta para la selección fueron la actividad específica de las células y la producción de biomasa.

Como puede observarse en la figura 4.1.1 la cepa de *K. fragilis* NRRL Y1109 muestra características de desarrollo notables en comparación a las otras cepas, presentando un máximo de actividad específica (470 U/g) a las 24 horas (mayor actividad de todos los ensayos realizados), para después tener una caída en la producción de enzima a partir de las 34 horas de crecimiento (tabla 4.1.1).

Como conclusión se decidió desarrollar el proyecto con la cepa *K. fragilis* NRRL-Y1109 pues se consideró que difícilmente se podría optimizar la producción a partir de las cepas restantes.

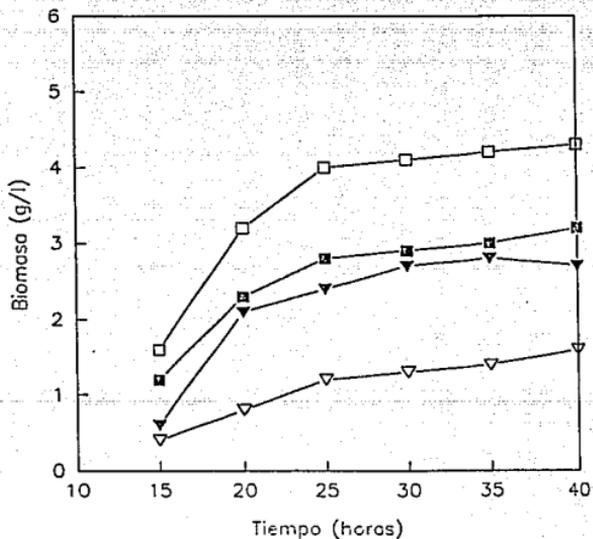


FIG. 4.1.1 Producción de biomasa de 4 cepas de levadura.  
 NRRLY-1109; CDBB-278, UCD-351; UCD-335.

Tabla 4.1.1. Producción de lactasa por los diferentes cepas utilizadas.

Cepa	Actividad específica (U/g)			
	24 hrs	29 hrs	34hrs	40 hrs
<i>K. fragilis</i> NRRL-Y1109	470	459	256	250
<i>K. fragilis</i> CDBB-278	130	92	80	104
<i>K. fragilis</i> UCD-351	208	221	189	173
<i>K. lactis</i> UCD-335	141	130	106	108

#### 4.2 Extracción de la enzima.

La enzima  $\beta$ -galactosidasa es intracelular y por esto se hace necesario dar un tratamiento a las células para determinar su producción por las diferentes cepas. En la figura 4.2.1 se muestra el efecto de la temperatura a diferentes concentraciones de tolueno sobre la expresión de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en la mezcla células-sobrenadante para la cepa de levadura a través del tiempo. Como se aprecia en la figura, la actividad es mayor a una concentración de solvente de 20% , siendo suficiente una hora de contacto para que la actividad expresada sea máxima. En este caso, hablamos de una permeabilización, pues la mayor cantidad de enzima aún se encuentra en el interior de la célula. La evaluación del efecto de la temperatura de permeabilización se presenta en la misma figura, mostrando que a 25<sup>o</sup>C y a una concentración de solvente de 20%, la actividad es máxima.

Tomando como base los anteriores experimentos se realizó la permeabilización utilizando alcohol isoamílico a las mismas concentraciones. En la figura 4.2.2 se aprecia que al sustituir

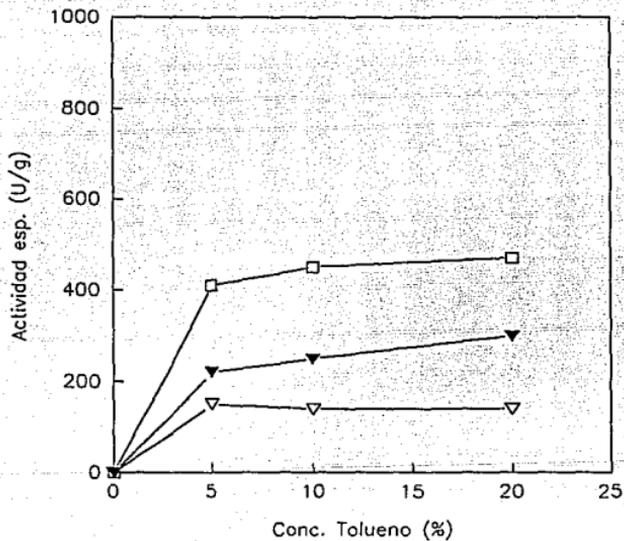


FIG 4.2.1 Efecto de la temperatura sobre la expresión de actividad lactasa a diferentes concentraciones de solvente. Actividad medida en la mezcla células-sobrenadante. ▼ 4°C; □ 25°C; ▽ 37°C.

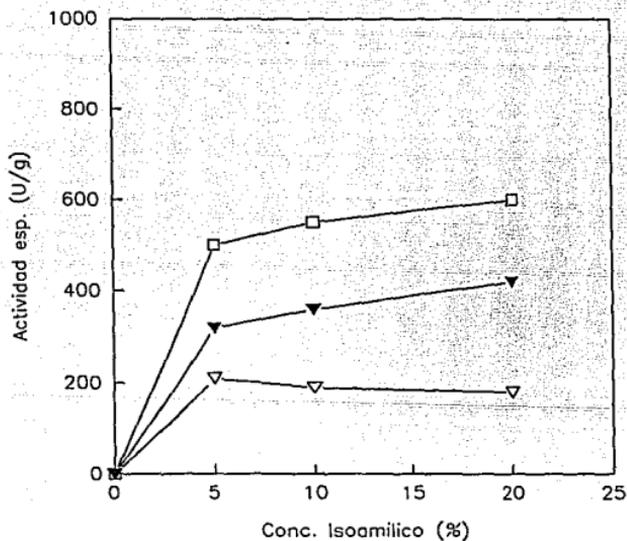


FIG 4.2.2 Efecto de la temperatura sobre la expresión de actividad lactasa a diferentes concentraciones de solvente. Actividad medida en la mezcla células-sobrenadante. ▼ 4°C; □ 25°C; ▽ 37°C.

tolueno por alcohol isoamílico la actividad expresada es significativamente mayor.

Después de esta serie de experimentos se definió la manera de evaluar la producción de enzima por la célula: poner a las células en contacto con una solución al 20% de alcohol isoamílico durante 1 hora a temperatura ambiente y medir la actividad en la mezcla completa.

#### 4.3 Optimización de la composición del medio de cultivo.

Como se mencionó anteriormente, el medio base a partir del cual se inició el estudio de optimización fué el propuesto por Mahoney. Las variables que se consideraron como importantes a evaluar en una primera etapa fueron: la concentración de lactosa, de extracto de levadura, de fosfato de potasio y de sulfato de amonio. La estrategia para evaluar el efecto de estas variables se basó en un diseño experimental tipo Box-Wilson. Este diseño se fundamenta en una combinación matricial de las variables a dos niveles, en donde el número de experimentos a realizar (y por lo tanto, el número de medios de cultivo a probar) se obtiene de la siguiente expresión:

$$N = 2^n$$

donde N es el número de experimentos y n el número de variables a manejar.

Los niveles probados para cada variable se muestran en la tabla 4.3.1. El efecto de las diferentes combinaciones probadas se evaluó en función de la actividad específica mostrada por las células. La matriz planteada y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.3.1.

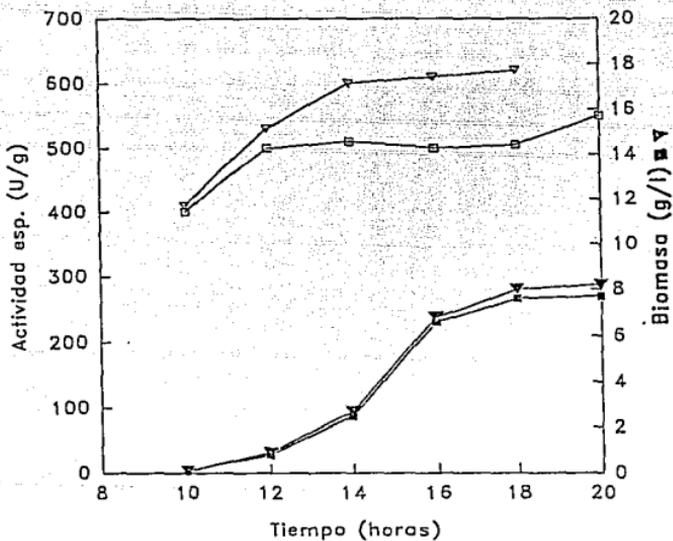


FIG. 4.3.1 Cinética de crecimiento y producción de lactasa de *K. fragilis*. Actividad específica (□) y biomasa (○) para medio optimizado; actividad específica (▽) y biomasa (▼) para medio optimizado más 0.05% MgSO<sub>4</sub>.

Tabla 4.3.1. Método Box-Wilson; desglose de variables y unidades utilizadas.

Variable	Unidades	Centro experimental	Nivel (+)	Nivel (-)	Unidad exp.
A lactosa	%	5	3	7	2
B $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	%	.56	.46	.66	.1
C ext. lev.	%	.5	.4	.6	.1
D $\text{K}_2\text{HPO}_4$	%	.3	.25	.35	.05

Este diseño experimental fué utilizado para realizar el análisis de las variables con el menor numero de experimentos sin llegar a la utilización del algoritmo de Yates.

De la observación de los resultados mostrados en la tabla 4.3.2 se puede concluir lo siguiente:

- el incremento en la concentración de lactosa en el medio de cultivo favorece ligeramente la producción de enzima.
- la concentración del sulfato de amonio arriba del centro experimental favorece la producción de enzima.
- un incremento en la concentración de extracto de levadura (fuente de vitaminas) favorece tambien la producción enzimática.
- la influencia del fosfato de potasio no es muy clara, sin embargo, el medio de cultivo en el cual se dió la máxima producción, incluye en su formulación niveles elevados de fosfato de potasio.

Tabla 4.3.2 Diseño experimental realizado y resultados obtenidos en la optimización del medio de cultivo para la producción de lactasa de *K. fragilis*.\*

Experimento	Interacción variables	Variables				Act. específica U/g
		A	B	C	D	
1	0	-	-	-	-	431
2	A	+	-	-	-	545
3	B	-	+	-	-	412
4	C	-	-	+	-	545
5	D	-	-	-	+	484
6	AB	+	+	-	-	609
7	AC	+	-	+	-	523
8	BC	-	+	+	-	556
9	AD	+	-	-	+	674
10	BD	-	+	-	+	793
11	CD	-	-	+	+	533
12	ABC	+	+	+	-	665
13	ABD	+	+	-	+	877
14	ACD	+	-	+	+	529
15	BCD	-	+	+	+	785
16	ABCD	+	+	+	+	764

\* Todos los medios de cultivo formulados (100 ml) tuvieron un pH inicial de 5.5 en matraces de 500 ml y fueron inoculados con 2 asadas de la cepa *K. fragilis* NRRL-Y1109.

A pesar del aumento relativo en la producción observado al incrementar los diferentes componentes del medio, éste no es muy significativo, debiendo realizarse otros estudios para lograr la optimización.

Una de las variables que afecta estos resultados y que resulta difícil de controlar es el cambio de solubilidad al oxígeno en las diferentes formulaciones de medios de cultivo; es decir, que los cambios en la

actividad específica mostrada por las células pueden deberse a variaciones en la concentración de oxígeno disuelto. Ante esto se consideró conveniente incrementar los valores de los sustratos (excepto la lactosa) y evaluar posteriormente la influencia del oxígeno en la producción de la enzima.

El medio de cultivo formulado en esta etapa presenta la siguiente composición (% p/v):

Lactosa..... 5  
Extracto de levadura.... 0.75  
Sulfato de amonio..... 0.84  
Fosfato de potasio.....0.45  
Sulfato de magnesio.....0.05

pH inicial de 5.5.

Aquí se evaluó la conveniencia de incorporar al medio de cultivo iones  $Mg^{++}$  como Sulfato de Magnesio. En la figura 4.3.1 se observa que la adición de 0.05% de sulfato de magnesio favorece la producción de la enzima.

#### 4.4 Efecto del pH inicial en la producción de lactasa.

Los reportes acerca de los medios de propagación para levaduras indican, sin excepción, que el pH inicial debe ser ácido. El nivel de acidez fluctúa entre valores de 3 a 5.5, dependiendo de la especie a propagar.<sup>(15,16,17)</sup>

En una serie de experimentos se probaron diferentes valores de pH inicial y se evaluó tanto la generación de biomasa como la producción de enzima lactasa por las células. En la figura 4.4.1 se observa que el pH óptimo para la maximización de los parámetros es 5.5

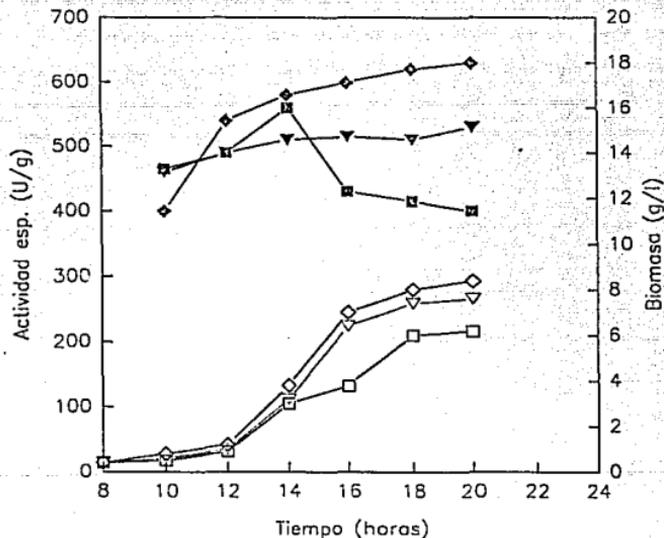


FIG. 4.4.1 Efecto del pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lactasa de *K. fragilis*.

Biomasa (□) y actividad esp. (■) a pH 4.5

Biomasa (▽) y actividad esp. (▼) a pH 5.0

Biomasa (◇) y actividad esp. (◆) a pH 5.5.

#### 4.5 Estabilidad de la enzima a diferentes valores de pH.

Si analizamos el patrón de pH de un cultivo de levadura en matraz agitado (figura 4.5.1) observamos que éste tiende a decrecer, de un valor inicial de 5.5 hasta un valor de 3.5. Un aspecto que consideramos importante evaluar fué el efecto que el pH final podía tener en la estabilidad de la enzima. Para este fin se cosecharon células y se pusieron en contacto con soluciones amortiguadoras a diferentes valores de pH (figura 4.5.2). En este experimento se observó que el hecho de que la enzima sea intracelular evita que la acidez del medio de cultivo afecte la estabilidad de la enzima; así, consideramos que al centrifugar las células en un tiempo que no mayor de 8 horas después de la fermentación, garantizamos que no se presenten problemas de desnaturalización de la enzima por efecto del pH.

#### 4.6 Producción en matraz Fernbach

En todos los experimentos descritos anteriormente la propagación de las células de levadura se llevó a cabo en matraces erlenmeyer de diferentes volúmenes. Los matraces Fernbach de 2.8 l tienen la característica de que su relación *superficie de líquido/volumen* (considerando un litro de medio de cultivo) es mas grande por lo que la aireación superficial se modifica en cultivos agitados. Un perfil típico de propagación en matraz Fernbach se presenta en la figura 4.6.1, en donde observamos que tanto la producción de biomasa como de la enzima lactasa se ven incrementados.

Aquí se estandarizó la cantidad de inóculo por litro de medio de cultivo en 15 mg de células, peso seco (aproximadamente 3 asadas).

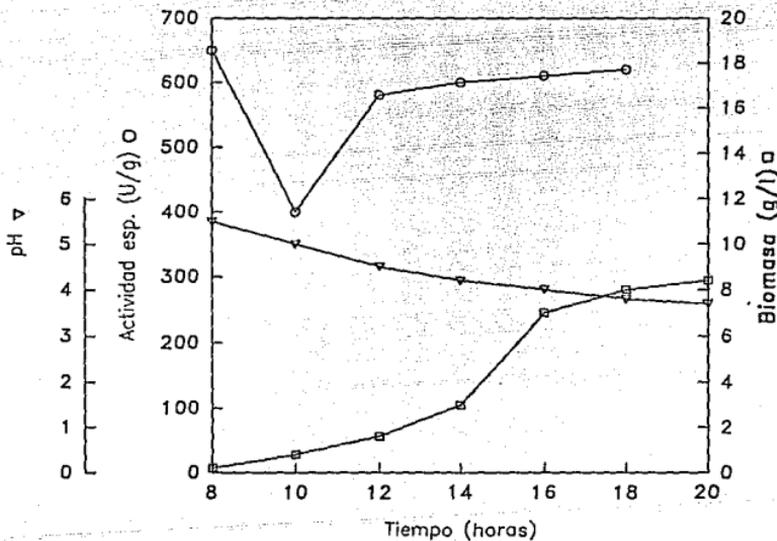


FIG. 4. 51 Cinética de crecimiento, producción de lactasa y pH de *K. fragilis* crecida en matraz erlenmeyer de 500 ml.

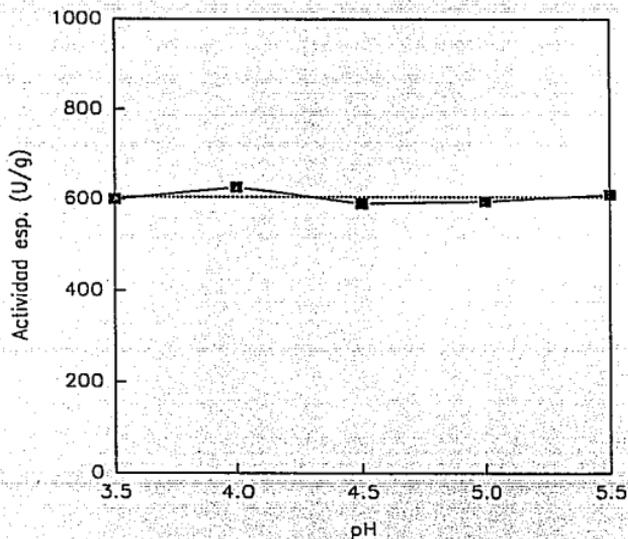


FIG 4.5.2 Efecto del pH sobre la actividad lactasa en células íntegras de *K. fragilis*, después de ocho horas de contacto.

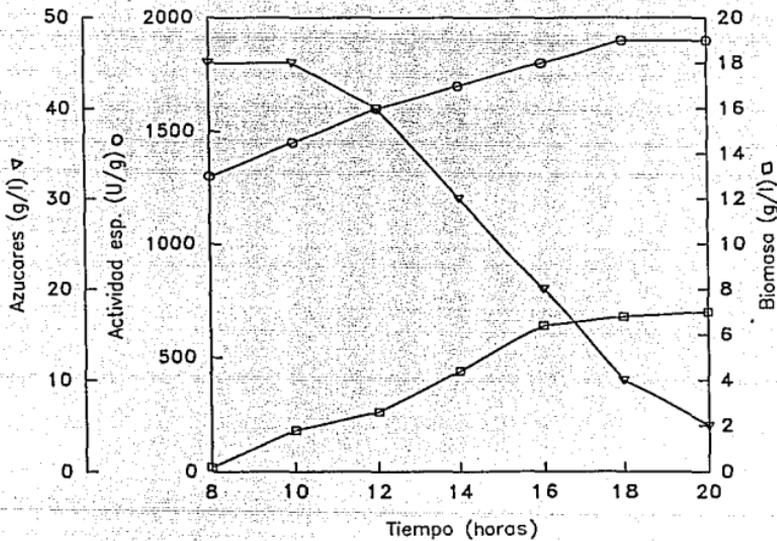


FIG. 4.6.1 Cinética de crecimiento, producción de lactasa y consumo de azúcares de *K. fragilis* crecida en matraz Fernbach.

#### 4.7 Producción en fermentador de 1 litro.

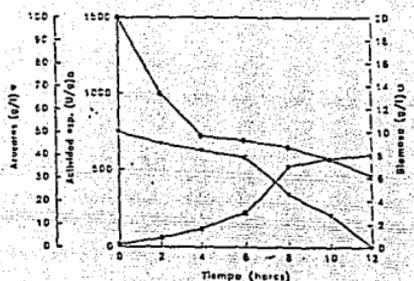
Los fermentadores son unidades de propagación y producción en las que se tiene un control más efectivo de las condiciones de operación, dentro de las que se incluyen: una agitación a través de uno o varios impulsores, un control de temperatura, control de la aireación y un control del pH.

En la figura 4.7.1 se presentan fermentaciones realizadas a diferentes condiciones de aireación y agitación.

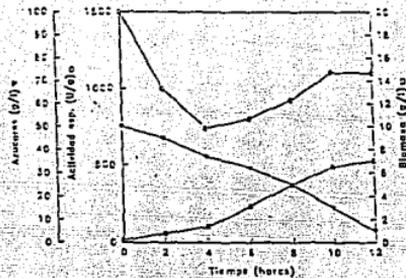
De los resultados de estos experimentos se desprende que niveles bajos de aireación y agitación (lo que implica un nivel bajo de transferencia de oxígeno) favorecen la producción de la enzima, siendo las condiciones óptimas una agitación de 200 rpm y aireación de 0.1 vvm. Es interesante notar que la producción de enzima en estas unidades no alcanza los niveles obtenidos en matraz Fernbach, lo que nos indica que aún es posible incrementar la producción de enzima bajo condiciones más controladas. Esta posibilidad se analizó en fermentadores de 14 litros.

#### 4.8 Producción en fermentador de 14 litros.

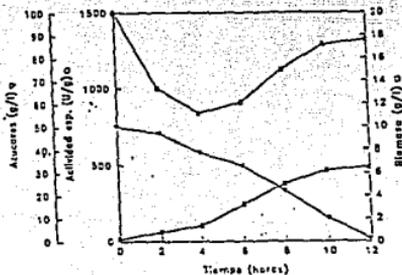
Para la producción de la enzima lactasa en jarras de 14 litros no se hizo propiamente un escalamiento, debido a que se consideró que el fermentador de 1 litro presentaba limitaciones en cuanto al mezclado (se contó solo con una turbina colocada en el fondo de la jarra). El objetivo de la utilización de estas unidades más grandes y con mayor



a)



b)



c)

FIG 4.7.1 Fermentaciones realizadas en equipo Bio-Flo con 1 l de volumen de trabajo en el medio optimizado para *K. fragilis*. a) 800 rpm, 1 vvm; b) 400 rpm, 0.5 vvm; c) 200 rpm, 0.1 vvm.

disponibilidad de aditivos, era el establecer claramente las condiciones de producción que nos permitieran seleccionar un criterio de escalamiento para un posterior aumento de escala. Debido a la evidencia que se tenía en la literatura y en este trabajo, respecto a la influencia notoria del oxígeno en la producción de la enzima, el criterio seleccionado fué el coeficiente de transferencia de oxígeno,  $K_L a$ , considerado en función de las variables rpm y vvm.

Los estudios realizados en jarras de 14 litros en donde se demuestra la relación existente entre el coeficiente de transferencia de oxígeno y la producción de la enzima se detalla en el artículo publicado en la revista *Biotechnology letters*<sup>(21)</sup> cuya traducción al español se anexa al presente trabajo.

INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO  
SOBRE LA PRODUCCION DE  $\beta$ -GALACTOSIDASA DE  
*Kluyveromyces marxianus*

M. García Garibay (1), J. Torres (1), A. López-Munguía  
Canales (2) y L.T. Casas (1).

- (1) Centro de investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología.
- (2) Departamento de alimentos, Facultad de Química.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Resumen.

La producción específica de  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces marxianus* mostró tener una relación con el  $k_L a$  (coeficiente de transferencia de oxígeno), a bajos niveles de aireación. La actividad específica de las células fué graficada contra el  $k_L a$ , mostrando una buena correlación. No se encontraron diferencias significativas en la actividad total producida a las diferentes condiciones de  $k_L a$ , ya que un incremento en la actividad específica fué compensada por un decremento en la concentración de biomasa.

## Introducción.

*Kluyveromyces marxianus* (sinónimo de *Kluyveromyces fragilis*), ha sido usada ampliamente en estudios que involucran la utilización de suero de leche. Los usos mas frecuentes son la producción de proteína unicelular, alcohol y  $\beta$ -galactosidasa. La cepa usada más frecuentemente en estos estudios es la NRRL Y 1109 (Bothast y col.<sup>(22)</sup>), debido a su alta capacidad para usar lactosa como fuente de carbono, lo cual está relacionado necesariamente con la capacidad de producir  $\beta$ -galactosidasa. La velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) está asociada en forma directa con la obtención de estos productos y ha sido reportada una relación entre bajos niveles de OTR y la producción específica de  $\beta$ -galactosidasa (Mahoney y col.<sup>(15)</sup>). Esta relación puede afectar la producción en algunos casos. El tema del presente trabajo es estudiar la relación entre la velocidad de transferencia de oxígeno y la producción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

## Materiales y métodos

Microorganismo: *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y1109 el cual se mantuvo en cuñas de agar con medio YM (Difco).

Medio: Se usó un medio con la siguiente composición: (g/l): lactosa grado U.S.P., 50;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 8.4; extracto de levadura, 7.5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 4.5 y  $\text{MgSO}_4$ , 0.5. El pH fué ajustado a 5.5 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Los reactivos fueron grado analítico (Baker y Bloxon) y se usó agua destilada y desionizada.

Condiciones de fermentación: Las corridas de 10 litros fueron

realizadas en un juego de 3 jarras de 10 litros New Brunswick. Todas las fermentaciones fueron realizadas a 25°C durante 12-13 horas, muestreando cada hora.

Análisis: La concentración celular ( $X$ , g/l) fue calculada de una curva de calibración de peso seco contra absorbancia a 650 nm de un caldo de cultivo diluido 1:50 y medido en un espectrofotómetro Beckman mod. 35. La actividad  $\beta$ -galactosidasa se midió como sigue: un volumen de cultivo conteniendo 10-20 mg de biomasa se mezcló con 5 ml de alcohol isoamílico (Baker) en un matraz de 25 ml y se aforó con buffer de fosfatos 0.1 M conteniendo  $MgSO_4$  (1 mM) y  $MnSO_4$  (0.1mM) (buffer A). Este se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y 0.1 ml de la solución se mezcló con 2.7 ml de buffer A, 0.1 ml de 2- mercaptoetanol 3.36 M y 0.1 ml de O-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido (ONPG, Sigma); esta mezcla fue preparada a 40°C y mantenida a esta temperatura en una celda del espectrofotómetro (Beckman 35). Se midió la absorbancia a 410 nm continuamente durante 5 min. La actividad específica (a) se estableció como las unidades de  $\beta$ -galactosidasa por gramo de biomasa; una unidad de  $\beta$ -galactosidasa (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar un  $\mu$ mol de ONPG por min a las condiciones dadas. La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) fue calculada por una regresión lineal de los datos de la fase de crecimiento exponencial de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\ln X = \mu t + b$$

Análisis estadístico: La estadística básica fue calculada con una calculadora Hewlett Packard 41CV con un módulo estadístico.

Coefficiente de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ): Como la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) es difícil de medir, debido a que

depende de algunas condiciones en el medio que cambian a lo largo de la fermentación, se tomó al  $k_{L,a}$  como el parámetro de transferencia de oxígeno. El  $k_{L,a}$  fué medido en agua por la técnica de eliminación de gas, reportada por Sobodka y col. <sup>(23)</sup> para las diferentes velocidades de aireación VVM (Q) y agitación RPM (R). Con estos datos, se hizo una regresión lineal múltiple y se estableció la siguiente ecuación:

$$k_{L,a} = 3.139 \times 10^{-4} (Q)^{0.51} (R)^{2.166}$$

De esta ecuación, los valores de  $k_{L,a}$  (todos referidos a agua) fueron obtenidos para cada pareja de Q y R usada durante una fermentación particular.

#### Resultados y discusión.

Se probaron cinco diferentes valores de  $k_{L,a}$  por duplicado (se hicieron dos fermentaciones para cada valor de  $k_{L,a}$ ). La tabla 1 muestra los valores promedio de la actividad específica, la máxima concentración celular, la velocidad específica de crecimiento y la producción total de enzima. Los valores promedio fueron obtenidos de las tres últimas muestras en donde el crecimiento había cesado, de cada juego de fermentaciones. Para los juegos de fermentación 1 y 2, las últimas muestras fueron tomadas de las 12 a las 13 horas, y para las otras de las 10 a las 12 horas. Cada valor es el promedio de seis muestras, por ejemplo, las tres últimas muestras de fermentaciones por duplicado.

El crecimiento celular mostró un comportamiento normal, siendo prácticamente igual para los valores bajos de  $k_{L,a}$  y diferente solo en los valores altos: la razón de ésto podría ser la existencia de un compromiso entre altos valores de  $a$  y el valor de OTR, pero no existen

suficientes datos para comprobar esta hipótesis.

Por otro lado, se encontraron diferentes perfiles de producción de enzima para diferentes juegos de fermentaciones (datos no mostrados). Para el juego 1, este perfil tiende a incrementarse al final del proceso (tabla 1); para los juegos 2 y 3, a permanece casi constante durante el tiempo de fermentación; y para los juegos 4 y 5, éste tiende a decrecer, siendo mucho más rápido en el último de éstos; los valores finales se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Valores promedio de la actividad específica ( $a$ ), y concentración máxima de biomasa ( $X_{max}$ ) con desviación estandar ( $s$ ) y coeficiente de variación ( $v$ ), velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y producción total ( $a \cdot X_{max}$ ) para diferentes valores de  $k_L a$ .

	$k_L a$ $h^{-1}$	$a$ U/g	$s$	$v$ %	$X_{max}$ g/l	$s$	$v$ %	$\mu$ $h^{-1}$	P.total U/l
1.	9.32	1915	79	4.2	6.64	0.16	2.4	0.176	12 715
2.	13.29	1810	28	1.5	7.5	0.53	7.1	0.361	13 575
3.	16.34	1737	39	2.3	6.83	0.25	3.6	0.307	11 863
4.	20.20	1628	52	3.2	6.94	0.11	1.7	0.315	11 298
5.	36.00	1485	56	3.8	8.30	0.13	1.5	0.335	12 325

Con el fin de encontrar una relación matemática entre el  $k_L a$  y  $a$ , se hizo una regresión con los datos de la tabla 1 ( $k_L a$  vs.  $a$ ), obteniendo una curva de tipo potencial ( $y = ax^b$ ). Esta curva se muestra en la figura 1. Los datos se ajustan muy bien con esta ecuación y se

obtuvieron los siguientes valores:

$$a = 2963.27 (k_L a)^{-0.194}$$

con una  $r^2 = 0.9888$

Expresando esta relación en la forma de una regresión lineal:

$$a = 7.99 - 0.194 \ln(k_L a)$$

Los resultados muestran que a valores altos de  $k_L a$  se obtienen bajos valores de actividad específica. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Mahoney y col.<sup>(15)</sup> pero de acuerdo a nuestros resultados,  $a$  llega a ser asintótica, de tal manera que para valores más altos de  $k_L a$  ésta podría llegar a ser constante.

El incremento neto entre el valor más alto y el más bajo de  $k_L a$  fué de 29% (tabla 1), mientras que  $X_{max}$  decrece un 20%. La producción total obtenida en esos dos valores fué prácticamente la misma, y la más alta producción se obtuvo a un  $k_L a$  de  $13.29 \text{ h}^{-1}$ , debido a la combinación de una alta actividad específica y una alta concentración celular. Así, con el fin de obtener una producción total elevada, se debe incrementar significativamente el valor del  $k_L a$  para producir gran cantidad de biomasa, en el entendido de que el valor de  $a$  no se verá reducido apreciablemente.

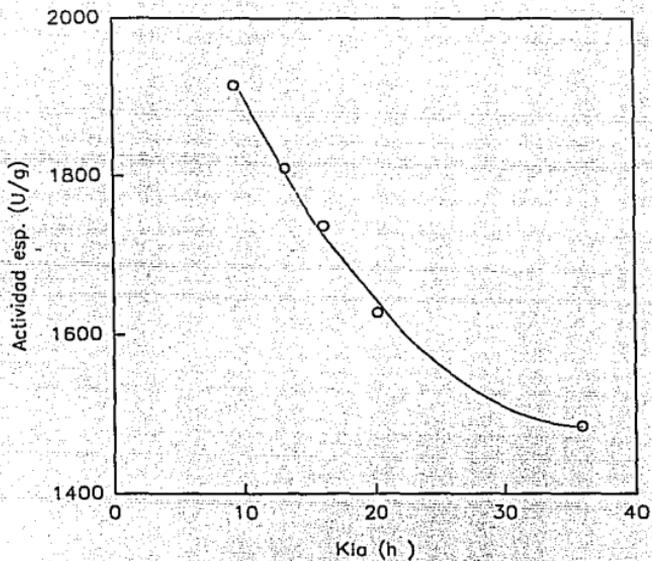


FIG. 1. Curva resultado de graficar  $K_{1a}$  contra actividad específica. Cada punto es el promedio de dos fermentaciones.

ESTA TESIS  
SOLAR DE LA  
NO ESTE  
BIBLIOTECA

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES

1. De las cepas con las que contamos para la realización de este trabajo, *K. fragilis* NRRL Y-1109 fue la que mostró en todos los experimentos un mayor rendimiento en biomasa y una mayor actividad específica.

2. El método más adecuado para cuantificar la cantidad de enzima producida por las células es a través de una "permeabilización" con una solución al 20% de alcohol isoamílico durante 1 hora a temperatura ambiente.

3. El medio de cultivo optimizado para la producción de la enzima presenta la siguiente formulación (% p/v):

Lactosa	5%
Extracto de levadura	0.75%
Sulfato de amonio	0.84%
Fosfato de potasio	0.45%
Sulfato de magnesio	0.05%
pH inicial:	5.5

4. Con respecto a la utilización de matraces agitados, el uso de matraces Fernbach para el crecimiento de *K. fragilis* favorece la producción de la enzima pues, al parecer, su relación área superficial/volumen resulta más adecuada para este propósito.

5. Las fermentaciones realizadas en fermentador bio-flo mostraron que los niveles de aireación tienen un efecto sobre la producción de la enzima, sin embargo, no fué posible maximizar la producción de enzima, debido a las limitaciones del equipo.

6. Utilizando fermentadores de 14 litros, se demostró el efecto del  $K_L a$  sobre los niveles de producción de  $\beta$ -galactosidasa por *K. fragilis*, pudiéndose establecer una relación a través de la siguiente ecuación:

$$\ln a = 7.99 - 0.194 \ln (K_L a)$$

## CAPITULO VI BIBLIOGRAFIA

1. Kretchmer, N. (1972) *Scientific American*, october.
2. Molina, E. (1984) *Industria Alimentaria*. 6,(6).
3. Houts, S. S. (1988) *Food Technol*, 42, 110-113.
4. Lisker, R., López-Habib, G., Daltabuit, M., Rosenberg, L. and Arroyo, P. (1974) *Amer. J. Clin. Nutr.* 27, 756-759.
5. Lenhinger, A. L. (1972) *Biochemistry*. Worth Publishers, Inc., Sixth printing.
6. Quintero, R. (1981) *Ingeniería Bioquímica, teoría y aplicaciones*. Ed. Alhambra mex. S. A. primera edición.
7. Wallenfels, K. and Weil, R. (1972)  $\beta$ -galactosidase. *The Enzymes*. Vol. VII, Academic Press, London.
8. López-Munguía, A. y Quintero, R. (1987) *Tecnología enzimática*. UNAM, primera edición.
9. Watson, J. D. (1978) *Biología Molecular del Gen*. Fondo Educativo Interamericano, tercera edición.
10. Dickson, R. and Markin, J. (1980). *J. Bacteriol.* 142 (3), 777-85.
11. Dickson, R. C. Sheetz, R. and Lacy, L. (1981) *Mol. Cel. Biol.* 1, (11), 1048-1056.
12. Reed, G. (1983) *Prescott & Dunn's Industrial Microbiology*. The Avi Publishing Company, Inc. Sec. ed.
13. Agrawal, S. Sonowat, H. M. and Dutta, S. M. (1982) *J. Dairy Sci.* 65, 866.
14. Coughlin, R. W., Charles, M. (1980) *Immobilized Enzymes for Food Processing* Ed. Pletcher W. CRC ed. Florida, USA.
15. Mahoney, R. R., Nickerson, T. A., and Whitaker, J. R. (1975) *J. Dairy Sci.* 58, 1620-1629.

16. Sánchez, L. y Castillo, F. J. (1980) Acta Cient. Venezolana. 31, 154-159.
17. Hewit, G. M. and GrootWassink, J. W. D. (1984) Enzyme Microb. Technol., 6 (6).
18. Biermann, L. and Morton, D. (1968) Biochem. Biophys. Acta, 167, 373-377.
19. Vasilis, G. and Lopes-Leyva. (1985) Process. Biochem. 2, 2-13.
20. Mahoney, R. and Whitaker, J. R. (1977) J. Food Biochem. 1, 327-350.
21. García-Garibay, M., Torres, J., López-Munguía, A. and Casas, L. (1987) Biotechnol. Lett. 9,(6), 417-420.
22. Bothast, R. J., Kurtzman, C.P., Saltarelli, M.D. and Slininger, P.J. (1986). Biotechnol. Lett. 8 (8), 593-596.
23. Sobotka, M., Rokop, A., Dunn, I.J. and Einsele, A. (1982) In Annual Reports on Fermentation Processes 5 Tsao G.T. (ed.) New York: Academic Press.