



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"INMOVILIZACION DE CELULAS CON ACTIVIDAD

β - GALACTOSIDASA PARA LA HIDROLISIS DE
LACTOSA EN LECHE "

T E S I S

EXAMEN
FAC. Q.

Que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Presenta

ANGEL OCTAVIO CANALES RUBIO

México

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE PROF. VICTORIA VALLES SANCHEZ
VOCAL " PEDRO VALLE VEGA
SECRETARIO " AGUSTIN LOPEZ-MUNGUIA CANALES
1ER. SUPLENTE " LOURDES ESCAMILLA HURTADO
2DO. SUPLENTE " MARCOS FRANCISCO BAEZ FERNANDEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

" LABORATORIO DE TECNOLOGIA ENZIMATICA, DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA DEL CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA, UNAM."

ASESOR DEL TEMA :

DR. AGUSTIN LOPEZ-MUNGUIA CANALES Agustín López Canales

SUPERVISOR TECNICO:

M. EN C. LIDIA T. CASAS Lidia T. Casas

SUSTENTANTE :

ANGEL OCTAVIO CANALES RUBIO Angel Octavio Canales Rubio

LO ÚNICO QUE VALE LA PENA APRENDER

SON LOS CONOCIMIENTOS QUE ADQUIRI-

MOS DESPUÉS DE SABERLO TODO.

A MI MADRE POR SU GRAN
CONFIANZA Y APOYO PARA
EL LOGRO DE MI FORMACION
COMO PROFESIONISTA

A MI HERMANA POR TODOS SUS
DETALLES QUE ME INVITAN A
SEGUIR ADELANTE TRAZANDO
NUEVAS METAS

Y PORQUE

" SON LO MAXIMO "

AGRADECIMIENTOS

SIN PALABRAS AL DR. AGUSTIN LOPEZ M. CANALES Y A LA M. EN C. LIDIA T. CASAS T., A AMBOS POR SU INVALUABLE GUIA EN EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO, ADEMAS DE LA AMISTAD QUE RECIBI DE ELLOS.

AL DR. RODOLFO QUINTERO POR SUS OBSERVACIONES Y CONSEJOS ASI COMO POR LOS DETALLES FORMATIVOS DE QUE FUI OBJETO AL FORMAR PARTE DE SU GRUPO DE TRABAJO.

A LA SEÑORA LAURA GENIS QUIEN EFECTUO LA TRANSCRIPCION MECANOGRAFICA DE ESTE TRABAJO, POR SU ESFUERZO E INTERES PARA LA CONCLUSION DEL MISMO.

A MIS COMPANEROS Y A CADA UNA DE LAS PERSONAS QUE ME BRINDARON SUS CONOCIMIENTOS Y AYUDA CUANDO LO REQUERI.

INDICE

	Página
I. Introducción	1
II. Antecedentes	
2.1. Intolerancia a la lactosa	25
2.2. Fuentes de la galactosidasa	27
2.3. Características físico-químicas de la galactosidasa de <u>E. coli</u> .	33
2.4. PH Óptimo para la actividad galactosidasa	36
2.5. Temperatura Óptima para la actividad de la galactosidasa	38
2.6. Efecto de diversos iones en la actividad galactosidasa	40
2.7. Especificidad	42
2.8. Mecanismo de reacción postulado para la galactosidasa	45
2.9. Cinética de células inmovilizadas	47
2.10 Inmovilización de células usando carragenina como soporte	53
2.11 Condiciones de operación y estabilidad de reactores enzimáticos con células inmovilizadas	60
2.12 Reactores en la hidrólisis de lactosa ...	64
III. Objetivos	71
IV. Metodología Experimental	
4.1. Equipo	75
4.2. Métodos	
4.2.1. Método del ONPG.	75

	Página
4.2.2. Método GOD-Perid.	78
4.2.3. Método para determinar actividad galactosidasa en células inmovilizadas	80
4.2.4. Método del DNS.	81
4.2.5. Producción de células	82
4.2.6. Método X-gal	84
4.2.7. Método de inmovilización en carragenina	86
4.2.8. Método de Lowry	89
V. Presentación y discusión de resultados	
5.1. Caracterización parcial del microorganismo	94
5.2. Caracterización cinética de la galactosidasa contenida en células de <u>E. coli.</u>	98
5.3. Inmovilización en carragenina	124
5.4. Caracterización cinética del biocatalizador	131
5.5. Caracterización del biocatalizados en <u>leche</u>	141
VI. Conclusiones	150
VII. Sugerencias	155
VIII. Bibliografía	157

LISTA DE FIGURAS

	<u>Página.</u>
Fig. 1.- Hidrólisis de lactosa	3
Fig. 2.- Esquematzación de la digestión de lactosa ingerida	5
Fig. 3.- Declinación de la actividad lactosa durante la vida	6
Fig. 4.- Diagrama Esquemático de la inmovilización de enzimas por el método de atrapamiento . . .	17
Fig. 5.- Proceso para la inmovilización de enzimas o células completas	18
Fig. 6.- Tipo de reactores de acuerdo a su forma de operación y características de flujo	19
Fig. 7.- Influencia del grado de hidrólisis de lactosa en la floculación	21
Fig. 8.- Aplicaciones de lactosa inmovilizada	23
Fig. 9.- Representación esquemática del operón lac y su regulación metabólica	32
Fig. 10.- Estructura de diversos compuestos que actúan como sustratos de la β -galactosidasa	44
Fig. 11.- Mecanismo de reacción propuesto para la acción de la β -galactosidasa	46
Fig. 12.- Posible estructura del complejo enzimá- sustrato para la β -galactosidasa	48
Fig. 13.- Estructura química de la carragenina	58
Fig. 14.- Esquema del proceso de inmovilización de células microbianas usando carragenina como matriz según Tosa <u>et. al.</u>	59
Fig. 15.- Comparación del costo relativo entre un proceso batch o intermitente y un proceso continuo en el uso de una enzima	62
Fig. 16.- Curva estandar de lactosa determinada por el método del DNS	83
Fig. 17.- Curva estandar de proteína determinada por el método de Lowry	91

	<u>Página</u>
Fig. 18.- Células de <u>E.coli</u> β -galactosidasa constitutivas	95
Fig. 19.- Curva de crecimiento de <u>E.coli</u> CSH-36	96
Fig. 20.- Curva estandar de peso seco Vs D.O.	97
Fig. 21.- Curva de actividad - mg de células de <u>E.coli</u> CHS-36	99
Fig. 22.- Perfil de ph - actividad de células libres	100
Fig. 23.- Perfil de temperatura-actividad para células libres	102
Fig. 24.- Termoestabilidad 29 y 4° C	104
Fig. 25.- Termoestabilidad a 55°C	105
Fig. 26.- Determinación de la energía aparente de activación para la hidrólisis de lactosa por células libres de <u>E.coli</u>	107
Fig. 27.- Representación de Lineaweaver-Burk para la determinación de Km y Vmáx de la galactosidasa de células libres de <u>E.coli</u>	111
Fig. 28.- Gráfica de doble recíproco de la actividad β -galactosidasa de células libres de <u>E.coli</u> para la determinación de Km y V máx con lactosa como sustrato	112
Fig. 29.- Efecto de la galactosa en la velocidad de reacción de β -galactosidasa de células libres usando ONPG como sustrato	116
Fig. 30.- Patrón de Lineaweaver-Burk para la determinación del efecto de la glucosa en la velocidad de hidrólisis de la β -galactosidasa de células libres usando ONPG como sustrato	117
Fig. 31.- Evolución de una reacción de hidrólisis de una solución de lactosa con células libres conteniendo actividad β -galactosidasa y modelo de cinética enzimática	122
Fig. 32.- Sistemas de Extrusión	125
Fig. 33.- Sistemas de resistencia a la agitación del biocatalizador	128

	<u>Página.</u>
Fig. 34.- Resultado de la prueba para determinar que las células no se salen del soporte	130
Fig. 35.- Perfil de pH-actividad del biocatalizador	132
Fig. 36.- Perfil de temperatura-actividad del sistema inmovilizado	133
Fig. 37.- Relación gráfica de Arrhenius para la determinación de la energía aparente de activación para la hidrólisis de lactosa por células inmovilizadas de <u>E.coli</u>	135
Fig. 38.- Efecto de la concentración de lactosa en la actividad β -galactosidasa de células de <u>E.coli</u> inmovilizadas en carragenina	137
Fig. 39.- Cinética de la reacción de hidrólisis de una solución de lactosa con β -galactosidasa en células inmovilizadas	140
Fig. 40.- Proceso para la determinación de la actividad proteolítica del biocatalizador	142
Fig. 41.- Diagrama esquemático del reactor enzimático usado	144
Fig. 42.- Cinética de hidrólisis de lactosa, contenida en leche evaporada, por células inmovilizadas con actividad de β -galactosidasa.	145
Fig. 43.- Estabilidad operacional del biocatalizador	147

INDICE DE TABLAS

	<u>Página.</u>
Tabla 1.- Ocurrencia de la insuficiencia de lactosa o intolerancia a la lactosa en adultos sanos	11
Tabla 2.- Inmovilizaciones de lactasa de diferente fuente y en diversos soportes	13
Tabla 3.- Fuentes microbianas de la β -galactosidasa . . .	29
Tabla 4.- Composición de aminoácidos de la β -galactosidasa	37
Tabla 5.- pH y temperatura óptima de actividad β -galactosidasa de diversas fuentes	39
Tabla 6.- Efecto de varias sales en la actividad β -galactosidasa	41
Tabla 7.- Constante de Michaelis y velocidad máxima de varios sustratos para la β -galactosidasa de <u>E.coli</u>	43
Tabla 8.- Constante de Michaelis y velocidad máxima para la β -galactosidasa inmovilizada proveniente de diversas fuentes, usando lactosa como sustrato	51
Tabla 9.- Constantes de inhibición y tipo de inhibición de la actividad β -galactosidasa de fuentes diferentes, respecto a diferentes sustratos	54
Tabla 10.- Aplicaciones potenciales de microorganismos y enzimas inmovilizadas en la industria	56
Tabla 11.- Comparación de las propiedades enzimáticas de células microbianas intactas e inmovilización y condiciones para la producción de compuestos orgánicos por células inmovilizadas . . .	63
Tabla 12.- Reactores tubulares en la hidrólisis de lactosa	66
Tabla 13.- Reactores para la hidrólisis de lactosa con β -galactosidasa inmovilizada de <u>E.coli</u> . .	70
Tabla 14.- Efecto de varias sales en la actividad β -galactosidasa de células completas de E.coli CSH-36 libres	109

Página.

Tabla 15.- Comparación del Km y V máx obtenido experimentalmente tanto en el sistema soluble como inmovilizado con los encontrados en literatura respecto a lactosa	114
Tabla 16.- Dureza y elasticidad de diferentes relaciones de carragenina-células	127
Tabla 17.- Propiedades organolépticas de la leche tratada con el biocatalizador	149

I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

→ Como sabemos, la leche contiene prácticamente un solo carbohidrato, que es la lactosa, cuya fórmula estructural es 4-o-(β -D-galactopiranosil)D-Glucopiranososa. En la naturaleza, la lactosa solamente se encuentra en la leche de los mamíferos femeninos. El azúcar de la leche es un disacárido compuesto por los monosacáridos glucosa y galactosa. La lactosa por si misma no es dulce, presenta baja solubilidad y dado que es un disacárido, no es absorbida directamente en el intestino. Para que la energía proporcionada por los monosacáridos pueda ser aprovechada por el organismo, la lactosa tiene que ser hidrolizada o desdoblada en glucosa y galactosa (Figura 1).

La hidrólisis necesaria para la utilización de la lactosa es efectuada por la acción de la enzima β -D-galactósido galactohidrolasa (E.C.3.2.1.23) ó β -galactosidasa (nombre trivial), comunmente conocida como "lactasa".

Esta enzima, se encuentra en las mucosas del intestino delgado de la mayoría de los mamíferos jóvenes; no se encuentra en el intestino del embrión ó del feto, sino hasta mediados de la última fase de gestación. ~~Se~~ ^{se} encuentra presente también, en plantas, principalmente almendras, duraznos, chabacanos y manzanas. Y también es producida durante el crecimiento de algunos microorganismos, ya sea en forma intra o extracelular (4).

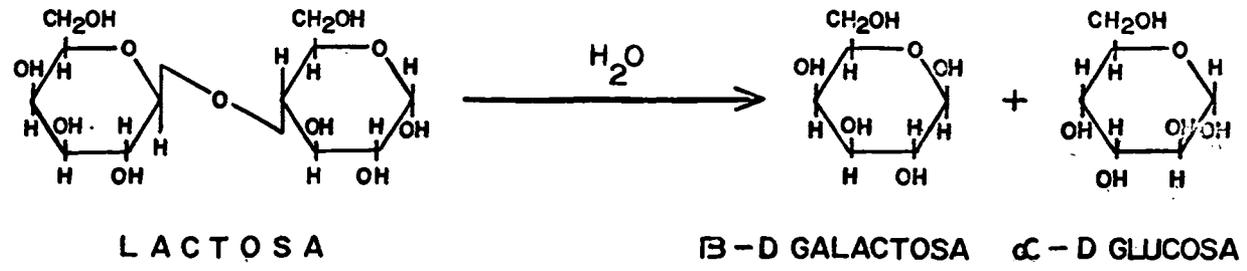


FIGURA 1. Hidrolisis de lactosa

La digestión de la lactosa se lleva a cabo principalmente en el yeyuno, donde la lactasa la escinde a glucosa y galactosa. Parte de la glucosa se emplea "in situ", el resto pasa a la corriente sanguínea con la galactosa y ambos son metabolizados en el hígado.

En el caso de que no haya suficiente lactasa, parte de la lactosa no digerida, pasa a la circulación. La mayor parte, no obstante, va hacia el ileón y el colón, donde la alta concentración de lactosa, da lugar, por osmosis, a una transferencia de agua al interior del intestino. La lactosa no digerida, es también fermentada por bacterias en el colón, con lo que se forman diversos ácidos y dióxido de carbono. Las consecuencias son las de una diarrea fermentativa, incluyendo la sensación de hinchamiento, flatulencia, eructos, espasmos y una rápida diarrea fluida (1). (Figura 2)

Después del nacimiento, durante el período llamado de lactancia, los mamíferos se nutren únicamente con leche. Por esta razón, la facultad para poder digerir la lactosa que contiene este alimento, es de gran importancia.

Después del período de lactancia, la leche va reemplazándose por otros alimentos gradualmente, y la actividad de la lactasa va desapareciendo también gradualmente, como puede observarse (20) (Figura 3).

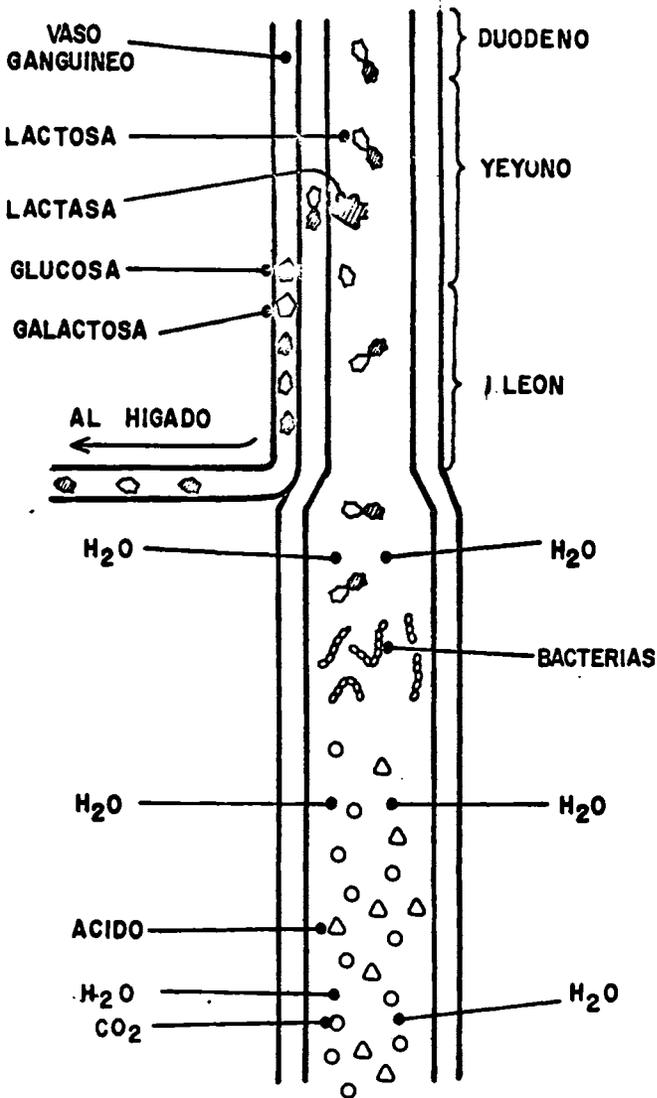


FIGURA 2. Esquematización de la digestión de lactosa ingerida.

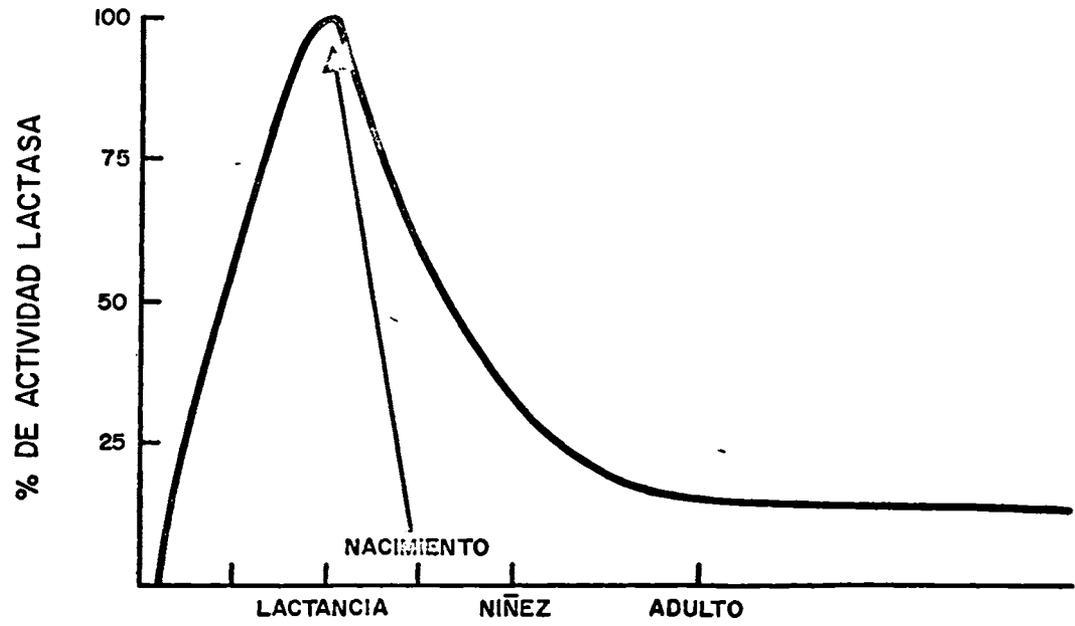


FIGURA 3. DECLINACION DE LA ACTIVIDAD LACTASA DURANTE LA VIDA

En épocas anteriores a la industrialización o consumo doméstico de productos lácteos y antes de la domesticación de animales productores de leche, los alimentos que los seres humanos recibían después del período de lactancia, no contenían lactosa alguna. Por esta razón, la mayoría de los adultos, padecían deficiencia de lactasa e intolerancia a la lactosa. Tan pronto como se dispuso de leche para la población en general, se favoreció la actividad permanente de la lactasa. Los seres humanos capaces de digerir la lactosa, podían beber leche y mantener o mejorar así su estado general de salud. Los seres humanos que no pudieran digerir la lactosa de manera adecuada, no tendrían esta posibilidad. En tiempos de escasez los seres humanos que podían asimilar la leche, pudieron posponer el sacrificio de los animales, sobreviviendo con la leche que éstos les proporcionaban. (45)

La leche a pesar de ser el alimento universal de los mamíferos recién nacidos, resulta en ocasiones tóxica para algunos infantes, quienes no la pueden digerir por deficiencia de lactasa. Los adultos de todas las especies animales también carecen de esta enzima y lo mismo sucede, tal como lo sabemos en la actualidad, con la mayoría de los seres humanos después de los dos o cuatro años de edad.

La leche es un alimento casi completo y seca puede almacenarse y transportarse a grandes distancias. Por esto es una conocida fuente de proteínas y otros nutrientes, em-

pleada en muchos programas de ayuda para una mejor nutrición de niños.

Al observar que un gran número de infantes no toleran fisiológicamente la lactosa, se ha puesto en evidencia un problema importante, y sus implicaciones son estudiadas en la actualidad por organismos tales como la U.S. Office of Child Development y el grupo de expertos en proteínas de la Organización de las Naciones Unidas.

A finales de los años 50's, Paolo Durand, de la Universidad de Génova, y Aaron Holzd y sus colaboradores, de la Universidad de Manchester, publicaron estudios sobre niños con intolerancia a la lactosa, reaccionando frente al azúcar de la leche con una severa diarrea, malnutrición e incluso la muerte. Este trabajo resucitó el interés por la lactosa y la lactasa, a lo que siguió un período de activas investigaciones sobre el problema (1).

En México, Lisker y colaboradores (21-24), del Departamento de Genética, Instituto Nacional de la Nutrición, iniciaron estudios sobre este problema, a partir de 1974, obteniendo resultados a la fecha realmente sorprendentes. La intolerancia a la lactosa en México, es muy superior a lo imaginado, ya que resultó ser del 75% en la población.

Debe señalarse, que mucha gente intolerante a la lactosa puede, no obstante, beber un poco de leche y consumir

productos lácteos; la relación de los síntomas clínicos con la ingestión de lactosa es cuantitativa.

Para la mayoría de la gente, incluso después de haber cumplido cuatro años, beber cantidades moderadas de leche no da lugar a efectos adversos e incluso es benéfico desde el punto de vista nutritivo. Sin embargo, deberían modificarse los programas indiscriminados de distribución a gran escala de leche en polvo a poblaciones con esta intolerancia, o bien, habría que impulsar el suministro de leche en polvo con bajo contenido de lactosa.

Los pueblos tradicionalmente pastoriles, presentan una incidencia de insuficiencia de lactosa inferior a la de los pueblos tradicionalmente cazadores o agricultores.

Lo anterior, lo podemos respaldar, con ejemplos de naciones como China, o Japón, donde la frecuencia de intolerancia a la lactosa es alta, mientras que la raza caucásica de Europa del Norte, presenta una frecuencia bastante baja.

Otro fenómeno que se correlaciona con una alta actividad lactasa es la radiación ultravioleta. Cuando la radiación ultravioleta es baja, la síntesis de vitamina D, lo es también, y dado que la vitamina D, desempeña un papel importante en la absorción de calcio, las posibilidades de que el calcio sea absorbido son disminuídas también.

En individuos con una alta actividad lactasa, la lactosa es hidrolizada, esto influencia de una manera positiva la absorción de calcio; personas con una actividad lactasa baja, carecen de éste posible mecanismo de compensación, y por lo tanto, la absorción de calcio es inferior (1).

El antecedente genético es demostrado por la incidencia de una absorción de lactosa deficiente en diferentes grupos étnicos (Tabla 1).

Por lo expuesto anteriormente, es de gran interés el desarrollo de un sistema de procesamiento para la preparación de alimentos lacteos, con la lactosa parcial o totalmente hidrolizada o removida. Varios métodos para reducir el contenido de lactosa en leche han sido propuestos, pero sólo algunos tienen aplicación industrial. Estos métodos incluyen procesos físicos, químicos y enzimáticos.

La solución a este problema, con el uso de los dos primeros métodos, sería la eliminación de la lactosa, lo cual representaría un nuevo problema pues se ocasiona una pérdida del 30% del valor calórico de la leche ya que se pierden en el proceso otros nutrientes de bajo peso molecular (4, 20).

Tratando la leche con procedimiento enzimático, ésta retiene su valor nutricional porque la glucosa y la galactosa, los productos de hidrólisis de la lactosa no son eli-

TABLA 1. OCURRENCIA DE INSUFICIENCIA DE LACTOSA O INTOLERANCIA A LA LACTOSA EN ADULTOS SANOS.

Grupo étnico	Muestras de población	% Absorción Déficit de Lactosa
Europeo Occidental		
Danés	700	1 - 2
Blanco Americano	20	10
Negroide		
Negro Americano	41	72
	22	77
Negro Nigeriano	4	98
Asiático		
Indú	100	62
	22	54
Chino Indú	20	85
Chino	4	90
Tailandés	140	97
Cino Coreano	75	100
Japonés	11	100
Chino Americano	3	100
Indio Hemisferio Occidental		
Colombiano	24	58
Peruano	30	66
Mexicano	136	75
Norteamericano	3	67

Los resultados anteriores se basan en pruebas llevadas a cabo por diversos investigadores mediante métodos diferentes, por lo que los resultados no son comparables, en sentido estricto, ni reflejan con toda exactitud la situación de las poblaciones (1, 21-24, 60).

minados, además, este procedimiento altera mínimamente las propiedades organolépticas de la leche pues es más dulce solamente.

La lactasa puede agregarse directamente a la leche algún tiempo antes de ser consumida. Sin embargo, el proceso resulta costoso, pues la enzima purificada no se recupera y hay necesidad de contar con una gran cantidad de enzima disponible (45).

Recientes avances en las técnicas de inmovilización de enzimas, sugieren que este procedimiento puede ser aplicado para solucionar los problemas anteriores (1,58).

Existen varios trabajos que demuestran que el uso de la lactasa en procesos industriales se ha propagado enormemente, llevándose a cabo inmovilizando la enzima en forma pura o semipura en diferentes soportes orgánicos e inorgánicos, por ejemplo: en vidrio silonizado, en gel de poli-acrilamida, DEAE-celulosa, resinas fenólicas, en la superficie de nylon, etc.) (Tabla 2).

Así de esta forma, se solucionan algunos problemas para su uso como biocatalizador, como podrían ser: estabilidad, la enzima puede ser reusada, la operación continua es posible en algunos casos, se requiere de menos espacio, el control de la reacción es mayor, se obtiene alta pureza y rendimiento del producto.

TABLA 2. INMOVILIZACIONES DE LACTASA DE DIFERENTE FUENTE Y EN DIVERSOS SOPORTES.

Fuente de la Enzima	Inmovilización	% de actividad retenida	Observaciones	Ref.
A. niger	Atrapamiento en gel de P.V.P.	30%	55°C y pH 4	10
E.coli	Atrapamiento por micro-encapsulación con dicloruro de teraptolil	28%	37°C, pH 7.3, (0.38 M)Na ⁺	37
E.coli	Unión covalente a carbomida Diazo Glutaraldehido	25%	37°C, pH 5.5-8.0	59
E.coli	Adsorción física en papel Whatman No.1	-	25°C, pH 7.2	47
E.coli	Atrapamiento en fibras de triacetato de celulosa	-	25°C, pH 7.2, (0.01M)Na ⁺	32
A.niger	Adosrción en resina fenólica, luego unión covalente con glutaraldehido	30%	25°C, Ph 6.2	36
E.coli	Atrapamiento en partículas de glutaraldehido y albúmina bovina con sonicación	-	30°C, pH 7	43
S.lactis	Atrapamiento en poliacrilamida	30%	pH 6.5, 30°C	35

Ahora bién, la producción de enzimas a través de microorganismos, con respecto a fuentes vegetales o animales, resulta más económica y no está sujeta a factores de localización de la fuente, a la estación del año, ya que la producción se encuentra concentrada en la unidad de producción (fermentador) y además el tiempo de producción es corto.

Debido a los altos costos de extracción y purificación de las enzimas microbianas es interesante el desarrollo de la tecnología enzimática para llevar a cabo la inmovilización de microorganismos que contengan intracelularmente la enzima de nuestro interés.

Las reacciones enzimáticas que son llevadas a cabo por células microbianas inmovilizadas indican que son ventajosas en los siguientes casos:

- 1) Cuando las enzimas son intracelulares.
- 2) Cuando las enzimas extraídas de las células son inestables durante y después de la inmovilización.
- 3) Cuando las enzimas que contienen los microorganismos no interfieren o las enzimas que interfieren son fácilmente inactivadas o removidas.
- 4) Cuando los sustratos o productos no son compuestos de

alto peso molecular. ✓

En estos casos, las siguientes ventajas de las células inmovilizadas pueden ser esperadas:

- a) Los procesos de extracción y/o purificación de la enzima no son necesarios.
- b) El rendimiento de la actividad enzimática en la inmovilización es alto.
- c) La estabilidad operacional es generalmente alta.
- d) Bajo costo de la enzima.
- e) Es posible para la aplicación a sistemas de reacciones multienzimáticas.
- f) Retención íntegra de la estructura y conformación de la enzima.
- g) Alta resistencia a perturbaciones del medio ambiente.

Así encontramos trabajos que describen la inmovilización de células por atrapamiento en geles de poliacrilamida, agar, carragenina y polímero de triacetato de celulosa, por adsorción en colágena o bien directamente unidos a hidróxido de zirconio.

El método de inmovilización por atrapamiento se basa en confinar células en una matriz polimérica o englobadas en una membrana semipermeable tipo encapsulamiento. Al inmovilizar por este método las enzimas o células no reaccionan con el soporte, pues solo quedan atrapadas (Figura 4).

Este método es el más usado para inmovilizar células y las matrices más usadas son: colágena, agar, carragenina, alginatos, poliacrilamida, poliestireno y triacetato de celulosa.

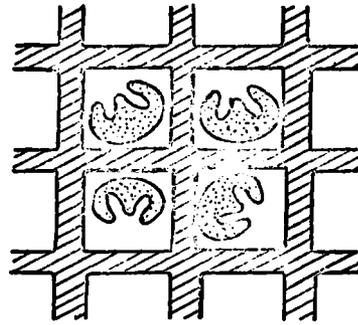
Después de atrapar las células es conveniente llevar a cabo un tratamiento con un agente bifuncional, o una mezcla de ellos con el fin de dar mayor rapidez al catalizador.

El proceso que normalmente se sigue para la inmovilización de enzimas o células microbianas es presentado en la Figura 5.

Una vez optimizadas las condiciones de inmovilización, se prosigue al diseño y utilización del reactor enzimático.

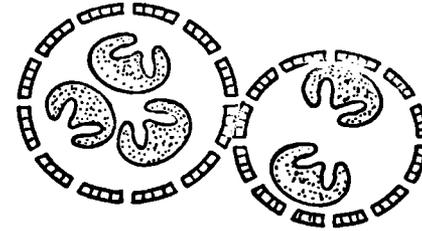
Existen diferentes tipos de reactores que se clasifican por su forma de operación y características de flujo (Figura 6).

Para elegir o diseñar el tipo de reactor a utilizar conviene considerar la reología del sistema de reacción, la



①

TIPO ENREJADO



②

TIPO MICROCAPSULA

FIGURA 4. DIAGRAMA ESQUEMATICO DE LA INMOVILIZACION DE ENZIMAS POR EL METODO DE ATRAPAMIENTO

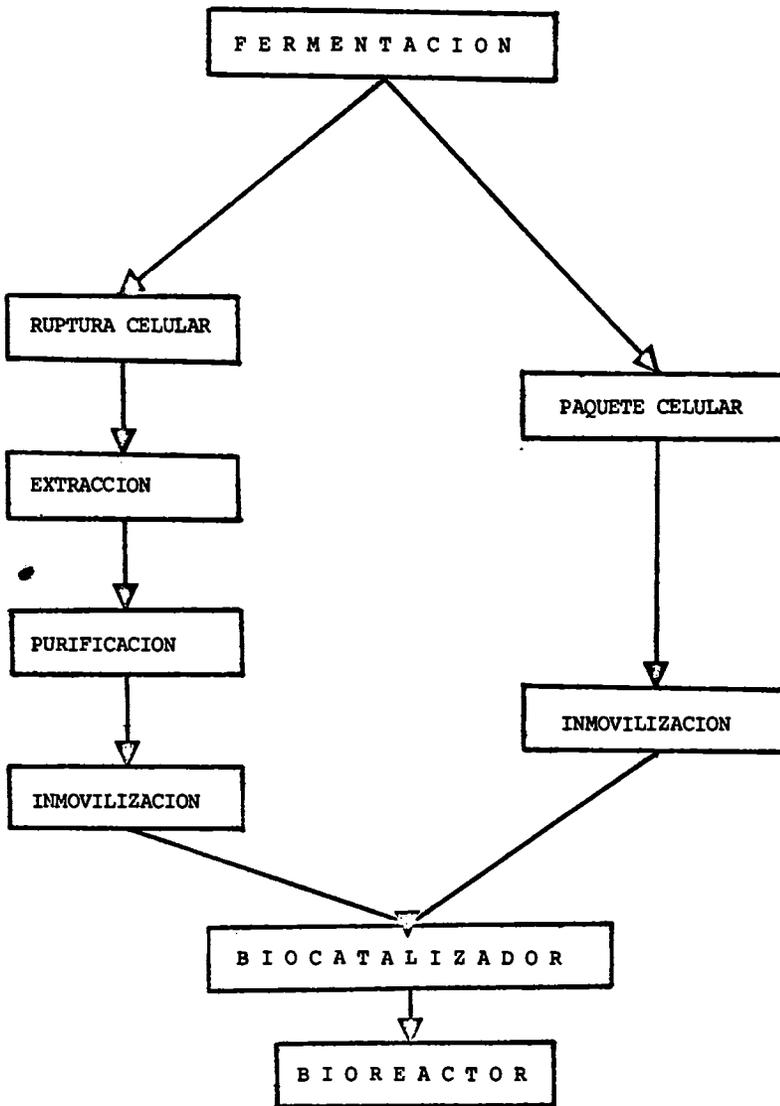
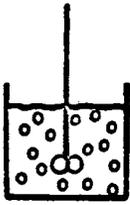
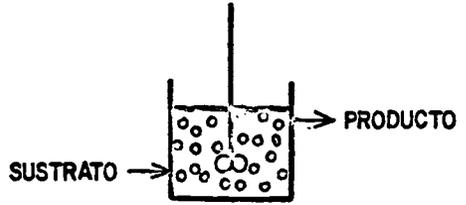


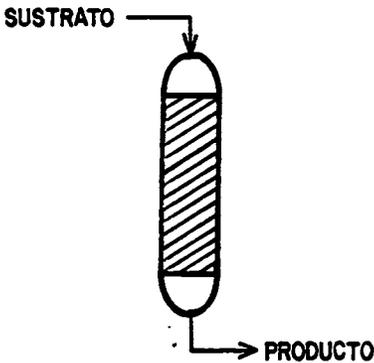
FIGURA 5. Proceso para la inmovilizacion de células o de enzima.



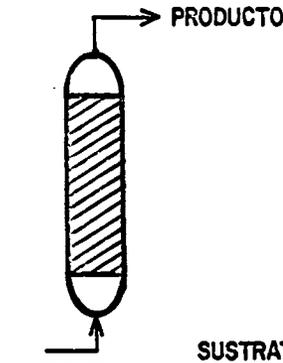
a) Tanque agitado intermitente



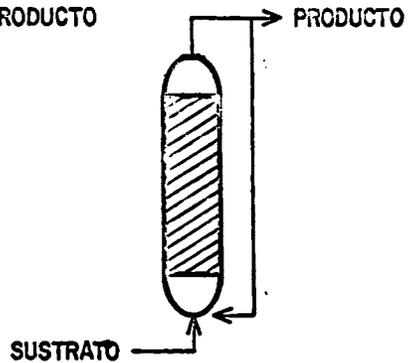
b) Tanque agitado continuo



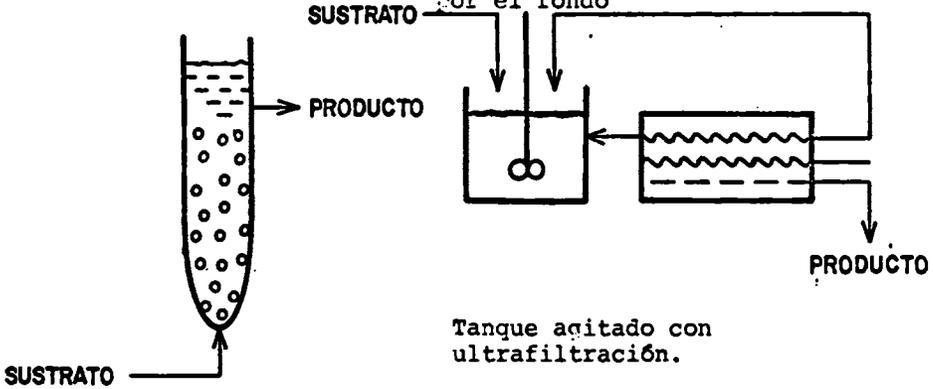
a) Alimentación por el domo



b) Alimentación por el fondo



c) con recirculación



Tanque agitado con ultrafiltración.

Columna fluidizada

FIGURA 6. Tipo de reactores de acuerdo a su forma de operación y características de flujo

estabilidad del soporte a la agitación y la cinética enzimática.

Otros factores importantes a considerar para la elección de un reactor a nivel industrial son: costo del soporte y reactivos para la inmovilización, actividad enzimática del sistema inmovilizado, estabilidad operacional, la capacidad de regeneración del catalizador y la posibilidad de contaminación microbiana del sistema (6, 51, 53, 58).

Al hidrolizar la lactosa en leche, además de cumplir con la finalidad principal, que es hacerla asequible a personas con intolerancia, se logra una de las metas de la Química de Alimentos que ve la posibilidad de convertir este azúcar relativamente insoluble y de bajo poder edulcorante, en una mezcla de sus monosacáridos, que presentan un mayor poder edulcorante (aproximadamente 80% con respecto a Sacarosa) y además son 3 o 4 veces más solubles que la lactosa, siendo aún más fácilmente absorbidos por el intestino. Además de que podría utilizarse en la preparación de medios de cultivo, en la preparación de leches concentradas, ya que la hidrólisis parcial (25-30%) de la lactosa puede prevenir la cristalización de otros azúcares en leches condensadas; en mantecados y helados la hidrólisis parcial (30-40%) de la lactosa previene la arenosidad y/o la floculación de proteínas durante períodos prolongados de almacenamiento (Figura 7).

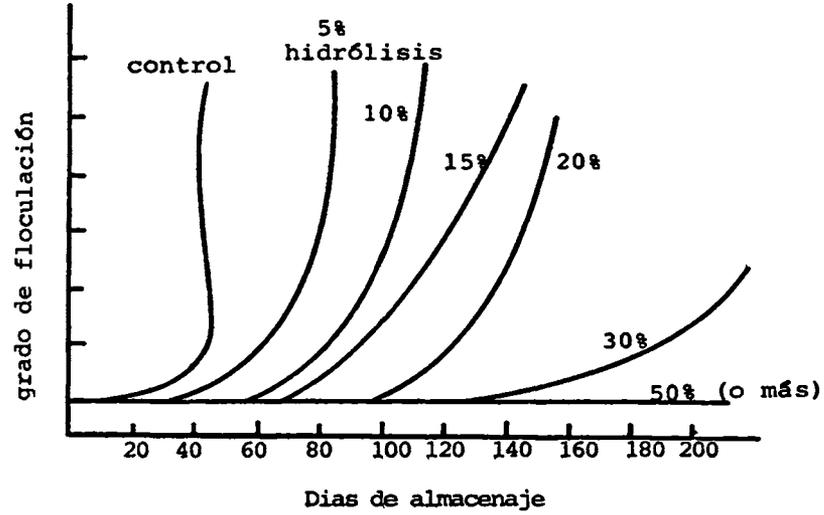


FIGURA 7. Dependencia del grado de floculación de proteína en el grado de hidrólisis de lactosa. Leche concentrada a 35 % de sólidos y almacenada a - 18°C.

La leche con lactosa hidrolizada es estable hasta por un año de almacenamiento. Debido al incremento en la dulzura, la adición de azúcar a algunos productos lácteos puede ser reducida o aún eliminada.

Al hidrolizar la lactosa en leche, se reduce el tiempo de coagulación de yogurt en un 15-20%, además de obtenerse una cuajada firme; aún más, se han reportado incrementos del 10% en el rendimiento. En la producción de quesos madurados, se producen más rápidamente aminoácidos y ácidos grasos libres, contribuyendo a desarrollar en consecuencia más rápido la estructura y sabor de estos quesos, (4,44) así nos encontramos que al hidrolizar la lactosa de la leche, se puede tener un sinfín de aplicaciones que hacen justificable este proyecto (Figura 8).

En el presente estudio se trata la inmovilización de células completas con actividad β -galactosidasa, así como las propiedades enzimáticas de las células libres e inmovilizadas, además del proceso para la hidrólisis de lactosa en leche por la β -galactosidasa contenida en células completas de E.coli CSH-36 inmovilizadas en carragenina.

APLICACIONES DE LA LACTASA INMOVILIZADA

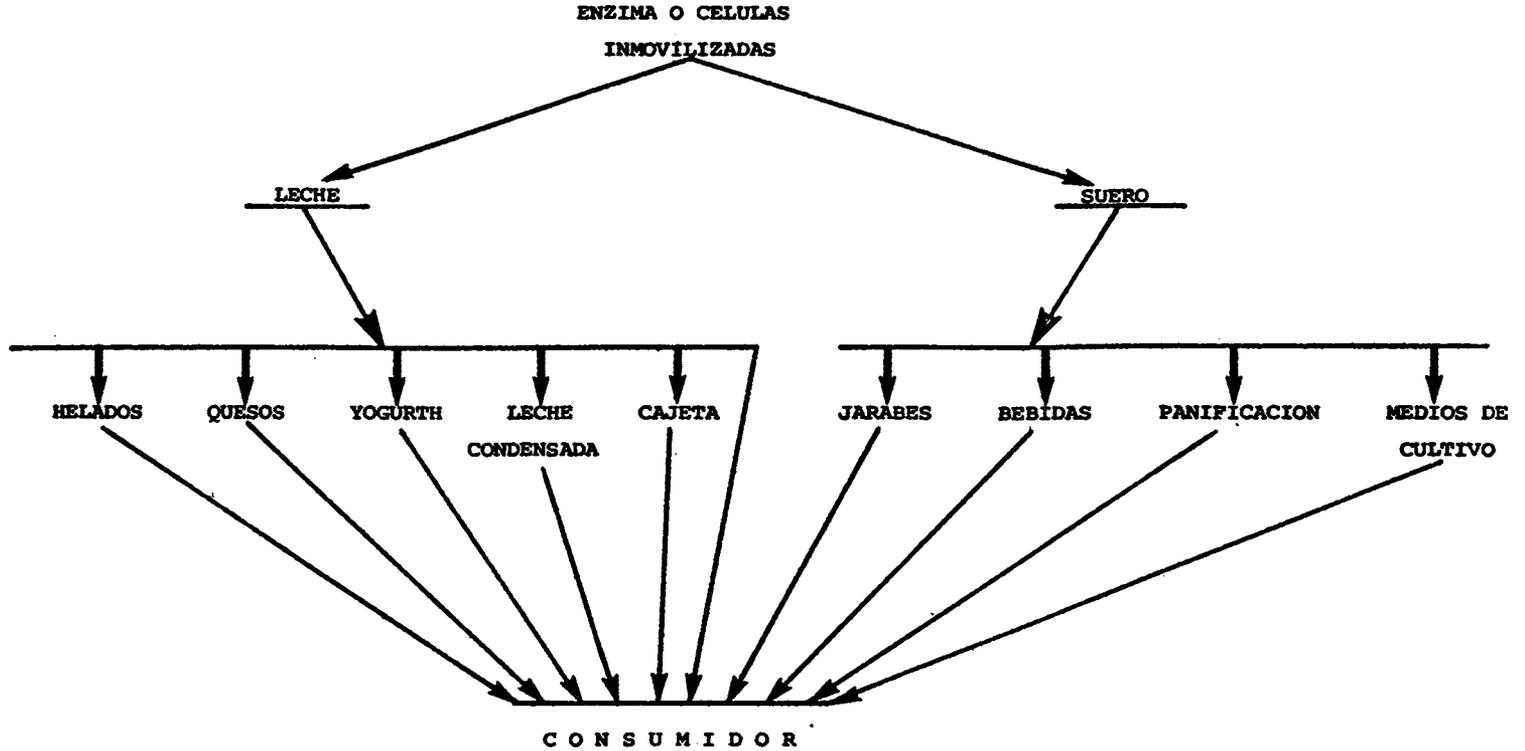


FIGURA 2. Aplicaciones potenciales de la lactasa inmovilizada en forma pura o bien contenida en células completas.

II. ANTECEDENTES

II. ANTECEDENTES

2.1 Intolerancia a la lactosa.

Debido a una enfermedad congénita algunas personas carecen de actividad lactasa desde el nacimiento. Esta afección trae consigo problemas gastrointestinales severos, que pueden tener un desenlace fatal si no se toman las medidas pertinentes.

En un intento por vencer los aspectos negativos de la intolerancia a la leche, varios grupos de investigadores han realizado estudios comparativos con leche en presentación normal y leche con lactosa hidrolizada o reducida.

Lisker et.al., estudiaron los efectos producidos por la ingestión de 250ml de leche conteniendo 0, 12.5 y 37.5 g de lactosa, en 150 sujetos, aplicando el método doble ciego standard y encontraron que las diferencias en los síntomas eran altamente significativas. La frecuencia de los síntomas debidos a la mala absorción de la lactosa, se incrementaron en relación directa al contenido de lactosa en leche (23).

Payne-Bose et. al., probaron la respuesta a la leche normal y con lactosa hidrolizada en un 92%. Estas leches fueron administradas en cantidades de 5 ml/Kg de peso corporal, a siete mujeres. En ambas pruebas se encontraron

diferencias estadísticamente significativas, que indican una mejor utilización de la leche hidrolizada (42).

Beaufrond et. al., demostraron que una mezcla de glucosa/galactosa, era mejor absorbida que la lactosa, por medio de la medición de los niveles de glucosa y galactosa en sangre. Además, encontraron que el aumento del nivel de insulina era comparable al que normalmente se detecta en cualquier organismo después que la persona en cuestión ha consumido un desayuno normal (2).

Mitchell et. al., demostraron que 5 de cada 6 individuos responden de un modo favorable cuando se reemplazan 12 g de lactosa por una mezcla de 6 g de glucosa y 6 g de galactosa, lo que es equivalente a una hidrólisis de 100% de lactosa (31).

Turner et. al., realizaron una investigación, en la que tomaron parte 12 personas intolerantes a la leche y otras 12 personas tolerantes, sobre el efecto de ingerir 250 ml de leche normal descremada, 250 ml de leche descremada con bajo contenido de lactosa, 12.5 g de lactosa y una mezcla de 6 g de glucosa y 6 g de galactosa. En el grupo de intolerantes a la leche, las diferencias fueron significativas, cuando se utilizó la leche descremada en comparación con la leche descremada de baja lactosa. Los resultados encontrados fueron los mismos cuando se trató de la lactosa pura y de la mezcla de glucosa (52).

Jones, et. al., en dos estudios con 16 y 17 individuos respectivamente, reportan que los otros componentes de la leche no tienen influencia alguna en la aparición de síntomas de intolerancia (16).

Mitchell, et. al., estudiaron 35 casos de niños aborígenes ligeramente desnutridos. Niños que en la primera infancia fueron alimentados a base de leche con lactosa hidrolizada ganaron 70% más peso que niños alimentados con leche normal, esto sin considerar el peso estandar correspondiente a la edad, la presencia de diarrea y las concentraciones de azúcar en la evacuación (31).

De lo anteriormente expuesto, se concluye que el uso de leche baja en lactosa puede ser la solución a la gran incidencia de intolerancia a la lactosa en México (21-24), lo que es posible de lograr hidrolizando este azúcar usando la enzima lactasa para así conservar las propiedades nutritivas de la leche; en apoyo a lo anterior cabe mencionar que la lactosa es bastante resistente a la hidrólisis ácida.

2.2 Fuentes de la Enzima β -galactosidasa.

La β -galactosidasa, se encuentra en plantas, microorganismos y animales.

En plantas las principales fuentes de la enzima son: al-

mendras, duraznos, chabacanos y manzanas. En animales la encontramos en la mayoría de los mamíferos jóvenes, mientras que en microorganismos la encontramos en una gran variedad de éstos (Tabla 3), pero los principalmente usados para la obtención de esta enzima son Escherichia coli, Aspergillus niger y Kluyveromyces sp. Cabe mencionar que las propiedades de la enzima difieren de una fuente a otra considerablemente.

En contraste a la enzima de E.coli, las propiedades enzimáticas de la β -galactosidasa de otros microorganismos han sido poco estudiadas debido a que E.coli ha sido ampliamente investigada en conexión con estudios en la síntesis de proteínas y su control genético.

Las enzimas constitutivas son aquellas que se forman a velocidades constantes y en cantidades también constantes durante el crecimiento de un microorganismo, independientemente de su estado metabólico, en tanto que, las enzimas inducibles, se encuentran normalmente, tan solo en cantidades ínfimas en una determinada especie bacteriana, pero su concentración puede elevarse rápidamente cuando el microorganismo se halla en presencia de un inductor, generalmente su sustrato, particularmente cuando dicho sustrato puede ser la única fuente de carbono para la célula.

Las células de tipo silvestre de E.coli no utilizan lactosa si hay glucosa disponible; pero al adicionar un β -ga-

TABLA 3. FUENTES MICROBIANAS DE LA β -GALACTOSIDASA

Microorganismo Fuente	Tipo de Enzima	Referencia
<u>E.coli</u> (ML 308)	Constitutiva, intracelular	12
<u>E.coli</u> (K-10)	Constitutiva, intracelular	43
<u>E.coli</u> (?)	Constitutiva, intracelular	32
<u>E.coli</u> (CA 8.00)	Inducida, intracelular	26
<u>E.coli</u> (lav UV5)	Inducida, intracelular	26
<u>E.coli</u> (lac ⁻ /F ⁻ lac UV5)	Inducida, intracelular	26
<u>E.coli</u> (lac ⁻ pro ⁻ /F ⁻ lac UV5) pro ⁺	Inducida, intracelular	26
<u>E.coli</u> (ATCC-26)	Constitutiva, intracelular	59
<u>E.coli</u> (E-106)	Constitutiva, intracelular	35
<u>Fusarium Moniliforme</u>	Inducida, extracelular	27
<u>Caldariella acidophila</u>	Inducida, extracelular	46
<u>Aspergillius foetidus</u>	Inducida, extracelular	41
<u>Aspergillius orizae</u>	Inducida, extracelular	40
<u>K. fragilis</u>	Inducida, intracelular	28
<u>K. lactis</u>	Inducida, intracelular	8
<u>A. niger</u>	Inducida, intracelular	10
<u>Tololopsis sphaerica</u>	Inducida, intracelular	14
<u>Candida psudotropicalis</u>	Inducida, intracelular	35
<u>L. bulgaricus</u>	Constitutiva, intracelular	35
<u>L. acidophilus</u>	Constitutiva, intracelular	35
<u>Streptococcus cremoris</u>	Constitutiva, intracelular	35
<u>Streptococcus thermophilus</u>	Constitutiva, intracelular	35
<u>Neurospora crassa</u>	Inducida, intracelular	35

lactósido, se induce no solo la síntesis de β -galactosidasa sino también la de dos enzimas funcionalmente relacionadas; la β -galactosido-permeasa y la β -tiogalactósido acetil transferasa. La primera es una proteína de la membrana de las células de E.coli que permite el paso de β -galactósidos al interior celular contra gradiente de concentración; la función de la segunda no está completamente elucidada.

Por otra parte, [se han descubierto mutantes de E.coli que contienen actividad β -galactosidásica elevada, a pesar de que las células no sean expuestas a un β -galactósido como agente inductor.] A tales mutantes se les denomina mutantes constitutivas, porque se comportan como si la β -galactosidasa fuese una enzima constitutiva y no una enzima inducible.

Jacob y Monod llegaron a la conclusión de que en el mapa genético de E.coli existen 3 loci distintos que influyen en la formación de la β -galactosidasa: se designan "z", "i" y "o" (Figura 9). El locus "z" especifica la secuencia aminoácido de la molécula de la β -galactosidasa; las mutaciones en este locus conducen a la síntesis de una molécula enzimática alterada o inactiva. Este tipo de gen se denomina gen estructural y se define como un gen que porta el mensaje codificador de la secuencia de aminoácidos de una proteína no específica, que en este caso es la

β -galactosidasa. El segundo locus, el "i", se postula que no tiene influencia sobre la estructura de la β -galactosidas- sino que determina si el gen estructural de la β -galactosidasa será o no transcrito. Dicho gen se denomina regulador. Cuando el gen "i" experimenta mutación, se torna defectuoso, ya no puede inhibir la transcripción del gen estructural; en tal caso, la β -galactosidasa es sintetizada, en presencia o ausencia del inductor, lo cual nos dá una explicación de los mutantes constitutivos.

Jacob y Monod propusieron que el gen regulador codifica la secuencia aminoácida de una proteína específica denominada represor, y el lugar en el DNA al cual se une, según se propuso, la molécula de represor, se le denomina operador o locus "o", cuando éste locus es defectuoso, porque ha experimentado mutación, se transcribe el locus "z" y se forma la β -galactosidasa.

Como se mencionó anteriormente los β -galactosidos inducen coordinadamente un grupo de tres proteínas, la β -galactosidasa, la β -galactósido-permeasa y la β -tiogalactósido-acetil transferasa, que están codificadas por 3 genes: "z", "y" y "a", respectivamente, y que está agrupado en esta secuencia en el genóma de E.coli, éstos genes estructurales, regulados por el mismo gen "i" y el mismo operador "o", fueron denominados por Jacob y Monod operón lac (Figura 9).

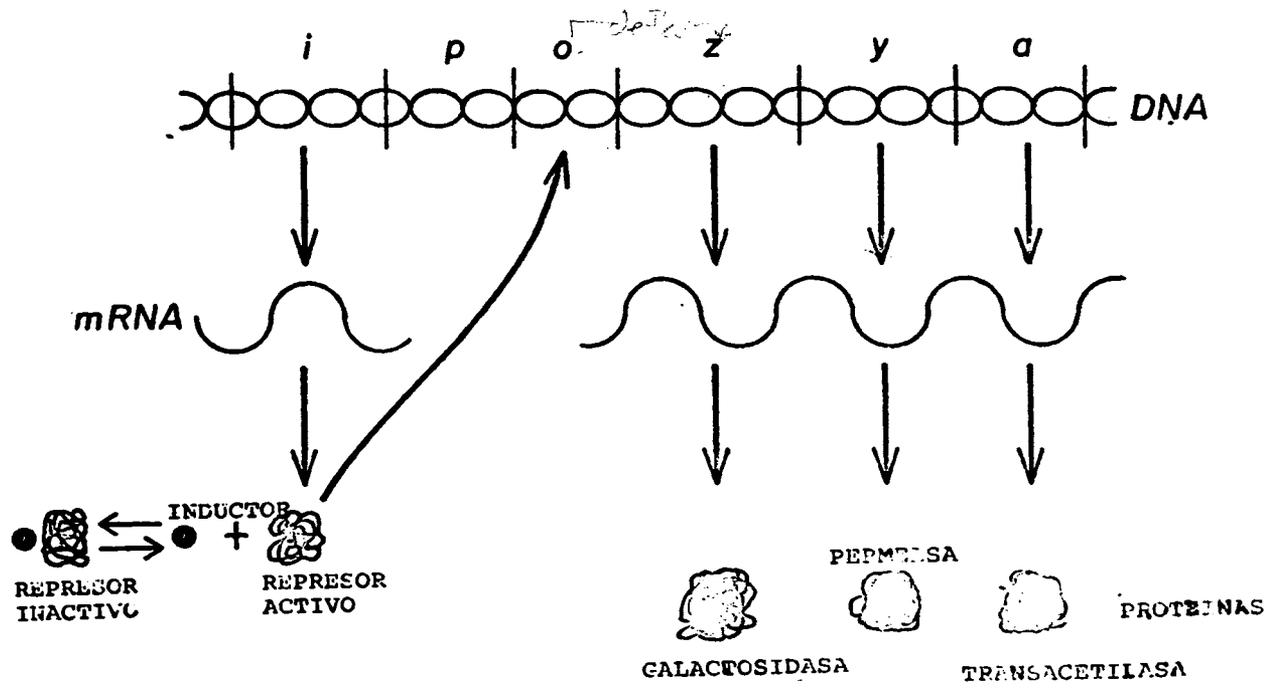


FIGURA 9. Representación esquemática del operón lac y su regulación metabólica.

Así, en base a lo dicho anteriormente, una cepa constitutiva de β -galactosidasa puede tener z^+ , y^+ , i^+ (19).

La β -galactosidasa en la mayoría de los microorganismos es inducible, por lo que si se desea producir la enzima, se tendrá que hacer uso de sustancias con un costo muy elevado, (tal como el isopropil β -D tiogalactósido) o bien manejar las condiciones ambientales hasta lograr una buena producción de la enzima. Estos inconvenientes a su vez son las principales ventajas de las bacterias constitutivas.

De las diversas fuentes de obtención de la enzima la más adecuada para uso comercial es la de origen microbiano, pues resulta más económica y no está sujeta a factores de localización de la fuente o época del año, ya que la producción se encuentra concentrada en la unidad de producción (fermentador) y el tiempo de producción es corto.

2.3 Características Fisicoquímicas de la β -galactosidasa de E.coli.

Las propiedades de la β -galactosidasa de E.coli, cristalizada, han sido examinadas por ultracentrifugación, electroforesis en gel, electroenfoque y por la prueba de Ouchterlony de doble difusión. Los resultados indican que la preparación enzimática es homogénea con respecto al tamaño, configuración, carga neta y comportamiento inmuno-

lógico. Se le ha determinado un punto isoeléctrico de 4.61.

Sund y Weber determinaron algunas propiedades fisicoquímicas de la enzima de E.coli ML-305 y ML-309, con ellos determinaron que el peso molecular de la enzima es de 518,000. Su configuración es descrita como un elipsoide de revolución con una proporción axial cercana a 3 asumiendo 30% de hidratación. La longitud y altura de la molécula son de 150 y 50 Å respectivamente. Crave et. al., determinaron el peso molecular por equilibrio de sedimentación a baja y alta viscosidad obteniendo valores de 489,000 y 538,000 respectivamente, mientras que Colby y Hu usando el mismo método reportan 503,000 y 491,000 (5).

Zipser establece que la enzima nativa está compuesta por cuatro monómeros. Este resultado concuerda con lo encontrado por Wallenfels et. al., en cuanto a la disociación de la enzima reducida y carboximetilada en urea y cloruro de guanidina.

El peso molecular de un monómero calculado con datos fisicoquímicos es de 147,000, este peso es confirmado por Shifrin y Steen que obtienen un peso de 118,000 por equilibrio de sedimentación en urea, en tanto que Ullman et. al., obtienen un peso de 135,000.

La estructura tetramérica de la enzima fué demostrada di-

rectamente por microscopio electrónico que además demuestra que las cuatro subunidades son arregladas en las esquinas de un cuadrado.

Se ha encontrado que en dodecil sulfato de sodio al 0.1%, la enzima se disocia en unidades de un peso molecular de alrededor de 60,000. Esta misma disociación parece ocurrir también en una mezcla de ácido fórmico y ácido acético dando pequeñas subunidades con un peso molecular de 46,000. Streers et. al., reportan un peso similar para la enzima tratada con ácido fórmico al 70%, SDS al 0.5% y NaOH 0.05M.

La energía de activación para la hidrólisis de lactosa por la β -galactosidasa de E.coli es de 17.5 Kcal/mol según Sharp et. al. y de 15.2 Kcal/mol según Hustad et. al., los valores reportados para la enzima inmovilizada son 16.3 y 12.5 Kcal/mol. (56) respectivamente.

Kuby y Lardy reportan la energía de activación para la hidrólisis de o-nitrofenil- β -D-galactósido a dos intervalos de temperatura y obtienen 7.3 y 13.1 Kcal/mol a 30-37°C y 0-30°C respectivamente.

La β -galactosidasa de E.coli ML 309, contiene 51.5% de carbono, 6.3% de hidrógeno, 16.1% de nitrógeno y 0.93% de azufre, no contiene carbohidratos o fosfatos.

La composición de aminoácidos de la β -galactosidasa de diferentes cepas de E.coli fue determinada por diversos laboratorios, los resultados de estos estudios son resumidos en la Tabla 4 (10).

2.4 pH óptimo para la actividad de la β -galactosidasa.

Al hablar en general de la β -galactosidasa encontramos que el pH óptimo de esta enzima varía apreciablemente, dependiendo de la fuente de la enzima; pues mientras que para la enzima de origen bacteriano es en las inmediaciones de 7, en las preparaciones de origen fúngico es cercano a 5 y para la enzima de levadura es próximo a 6, lo anterior lo podemos ver en la Tabla 5.

Para preparaciones de enzima provenientes de E.coli el pH óptimo va de 6.8 a 7.2 en buffer a 30°C. Cohn y Monod reportan pH 7 como óptimo para la β -galactosidasa de E.coli ML en buffer de fosfatos a 28°C. Un valor de pH 7.3 ha sido reportado para la β -galactosidasa de E.coli ML-309, a 40°C en buffer Veronal. A 20°C y en buffer tris-ácido acético (0.05M) la misma β -galactosidasa presenta un pH óptimo de 7.7. En la presencia de NaCl (0.05M) este valor es desplazado a 6.6.

A partir de la influencia del pH en el Km y la velocidad máxima en la hidrólisis de ONPG con β -galactosidasa de E.coli, se ha deducido (56) la existencia de dos grupos

TABLA 4. COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA β -GALACTOSIDASA (Moles de a.a./10⁵g de proteína).

A.A.	E.coli ML-309	ML-35	K-12	K-12
Ly5	19.0	18.3	21.5	20
His	31.2	22.5	26.7	26.7
Arg	56.5	51.2	54.8	54.0
1/2Lys	17.1	17.5	14.1	12.7
Asp	88.6	83.6	91.3	90.5
Thr	54.9	46.0	48.2	51.9
Ser	47.6	56.0	49.7	51.3
Glu	95.7	93.0	105.0	108.0
Pro	44.1	47.1	49.5	52.5
Gly	60.6	60.9	63.1	62.5
Ala	65.0	61.5	69.0	69.6
Val	53.0	49.4	55.6	55.6
Met	20.1	20.5	17.8	15.6
Ile	36.2	32.2	35.6	31.6
Leu	82.1	72.6	81.6	83.0
Tyr	20.8	24.4	26.6	25.1
Phe	31.8	30.1	33.4	33.4
Trp	35.0	35.5	26.0	26.0

disociables (cuyos valores de pK son 6.67 y 8.9 a 20°C). El grupo disociable en el lado alcalino del pH óptimo ha sido identificado como un grupo sulfhidrilo (-SH), lo cual es soportado por la inhibición de la enzima por iones de metales pesados y p-mercuribenzoato. Por otro lado, al otro grupo se le determinó paralelamente a 5°C un Calor de disociación de 5.75 Kcal/mol. Por este hecho se sostiene que es bastante probable el que este grupo sea el anillo imidazol de un residuo histidina.

También se menciona que en presencia de NaCl 0.05M, los valores de pK de ambos grupos son desplazados hacia el lado ácido (por 0.8 unidades de pH para el grupo imidazol y 0.3 para el grupo sulfhidrilo) (56).

2.5 Temperatura óptima para la actividad de la β -galactosidasa de E.coli.

Como podemos apreciar en la Tabla 5, la temperatura óptima de la enzima depende de su origen. En general la temperatura óptima varía desde 35°C hasta 65°C. También es de hacer notar que la variación de la temperatura óptima es según la forma en que encontramos a la enzima (purificada, en células completas, libre o inmovilizada).

Es importante mencionar que así como la forma que presenta la enzima afecta el valor de la temperatura óptima, de igual forma se ve afectada la energía de activación, como

TABLA 5. pH y TEMPERATURA OPTIMA DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA DE
DIVERSAS FUENTES.

Fuente de la enzima	pH Óptimo	T Óptima °C	Observaciones	Ref.
<u>A.niger</u>	4	65	Enzima purificada libre	10
<u>K. lactis</u>	6.5	45	Enzima purificada libre	8
<u>K. fragilis</u>	6.3-6.8	35-40	Enzima purificada libre	28
Fusarium noniliforme	4-5	50-60	Enzima purificada libre	27
<u>A. orizae</u>	4-5	55-60	Enzima purificada libre	40
Candida psudotropicalis	7.5	30	Enzima purificada libre	35
Tolulopsis sphaerica (J-28)	7	30	Enzima purificada libre	14
<u>T. versatilis</u> (M 6)	7	30	Enzima purificada libre	14
<u>E.coli</u> (ML 308)	7	37	Enzima purificada libre	12
<u>E.coli</u>	7	55	Enzima purificada y libre	32
	7	55	Enzima purificada inmovilizada	
<u>E.coli</u> (ATCC 26)	6.8	55	Enzima pura, libre e inmovilizada	59
<u>E.coli</u> (K -12)	6.5	37	Enzima pura, libre	12
	7.3	45	Enzima pura, inmovilizada	13
<u>E.coli</u> (K-10)	7	55	Célula completa libres/inmovilizadas	32
<u>E.coli</u> (E-106)	7.2	55	Célula completa	35
	8.0	55	libres/inmovilizadas	
<u>L. bulgarius</u>	5.5	55	Células completas libres/inmovilizadas	35
<u>K.lactis</u>	6.3	37	Células completas libres/inmovilizadas	35

demuestran los reportes en los que se usa la energía de activación de la reacción como indicio de la existencia de limitaciones difusionales en la inmovilización.

La β -galactosidasa de E.coli es bastante estable desde el punto de vista térmico, tanto en forma purificada como en células completas (libre o inmovilizada) como lo demuestran varias publicaciones, a diferencia de la enzima proveniente de levadura que es termolábil (8,14,28,32).

2.6 Efecto de diversos iones en la actividad enzimática de β -galactosidasa de E.coli.

Diversos investigadores han estudiado el efecto de la presencia de varios iones en la determinación de actividad enzimática de la β -galactosidasa y han encontrado que éstos tienen una importante influencia sobre la actividad de la enzima.

Wondolowski et. al., probaron el efecto de diversos iones en la hidrólisis de ONPG, PNPg y lactosa, después de incubar la enzima en presencia de los diferentes iones encontraron que los iones de metales pesados (Cu^{2+} , Hg^{2+} y Zn^{2+}) ejercen una poderosa inhibición, en tanto que los iones Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} y Ba^{2+} , incrementan la actividad de la enzima con respecto a su actividad frente a los sustratos libres de iones, cuando menos en dos de los tres sustratos probados (Tabla 6) (56). El ión amonio

TABLA 6. EFECTO DE VARIAS SALES EN LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA.

S a l...	ONPG	PNPG	Lactosa
	Actividad Relativa ^a		
0	1	1	1
5×10^{-4} M MgCl ₂	1.12	1.33	1.19
5×10^{-4} M CaCl ₂	0.92	1.04	0.66
5×10^{-4} M HgCl ₂	0	0	0
5×10^{-4} M CuSO ₄	0	0	0
5×10^{-4} M ZnSO ₄	0	0	0
5×10^{-4} M BaCl ₂	0.79	1.23	1.24
5×10^{-4} M MnCl ₂	1.49	2.20	1.72
5×10^{-4} M FeSO ₄	0.89	1.46	1.34
5×10^{-4} M CoCl ₂	1.05	1.83	1.83
1×10^{-1} NH ₄ C ₂ H ₃ O ₂	.92	1.55	1.06
1×10^{-1} NaCl	1.19	0.99	0.95
5×10^{-2} K ₃ C ₆ H ₅ O ₇	0.37	0.79	0.90
5×10^{-2} THAM ^b	0.41	0.80	0.57
2.5×10^{-2} Na ₂ EDTA	0.07	0.22	0.22

a) Actividad comparada en fosfato de potasio 0.02 M, pH 6.8 - 7.0, 25°C

b) Trishidroximetil amino metano.

eleva la actividad enzimática, pero su sal del buffer tris hidroximetilamino metano así como el citrato de potasio fueron inhibidores; el EDTA reduce la actividad poco más del 75%, el ión sodio incrementa la hidrólisis de ONPG, mientras que no tiene ningún efecto sobre la hidrólisis de PNPNG o lactosa. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Wallenfiels et. al., y por Kuby & Lardy.

La Tabla 6, nos refiere la actividad relativa de los iones mencionados anteriormente (56).

2:7 Especificidad de la Enzima β -galactosidasa.

La enzima actúa sobre una amplia variedad de β -galactósidos. Es bastante específica respecto a la parte glicona de la molécula (galactosa) y es mucho menos específica con respecto a la parte aglicona de la molécula del sustrato. La glucosa y otros glucósidos o alquil o aril alcoholes pueden servir como aglicona.

La misma enzima cataliza reacciones de transglicosidación cuando el aceptor es diferente al agua 3-o- β -D-galactopiranosil-D-glucosa, 6-o- β -D-galactopiranosil D-galactosa (galactobiosa) y otros oligosacáridos pueden producirse por la acción de la β -galactosidasa en lactosa (5, 7, 18).

Los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de un grupo de sustratos son presentados en la Tabla 7.

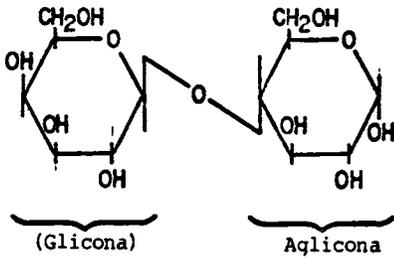
TABLA 7. CONSTANTE DE MICHAELIS Y VELOCIDAD MAXIMA DE
 VARIOS SUSTRATOS PARA LA β -GALACTOSIDASA DE
 E.coli

C O M P U E S T O	Km (Moles/lit)	Ymax (Moles/lit min)
o-nitrofenil β -galactósido	1.8×10^{-4}	32×10^{-6}
p-nitrofenil β -D-galactósido	0.97×10^{-4}	5.8×10^{-6}
o-nitro α -L-arabinósido	2.6×10^{-3}	2.2×10^{-6}
fenil β -D-galactósido	7.3×10^{-4}	5.0×10^{-6}
Metil β -D-galactósido	6.9×10^{-3}	2.9×10^{-6}
n-butil- β -D-galactósido	6.9×10^{-4}	2.3×10^{-6}
Lactosa	5.5×10^{-3}	2.3×10^{-6}
Alolactosa	8.3×10^{-3}	-
Lactositol	3×10^{-2}	-2.5×10^{-7}
Lactobionato	4×10^{-2}	-1.0×10^{-7}

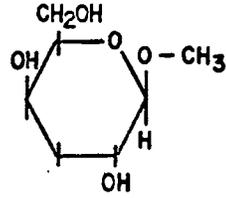
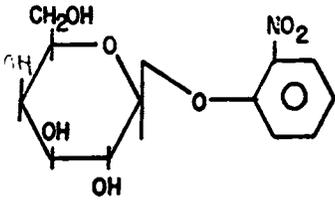
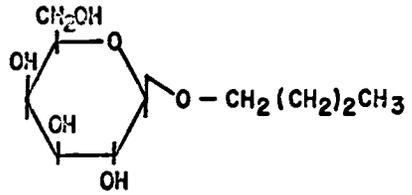
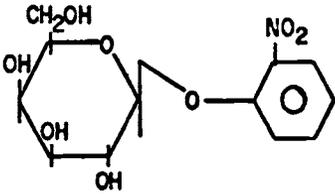
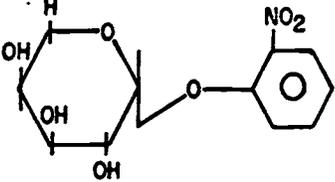
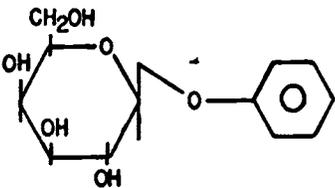
Como podemos apreciar en la Tabla 7 y la Figura 10, los cambios marcados en la estructura de la aglicóna son compatibles con la actividad enzimática

Algunos cambios en el anillo de galactosa (sustitución, reducción, oxidación y cambios en la configuración estérica) producen un sustrato derivado inerte.

La inversión de el enlace β -galactósido a la configuración alfa produce un galactósido resistente a la hidrólisis enzimática. Sin embargo, los α -galactósidos no son excluidos del sitio activo como puede inferirse en la inhibición competitiva en la actividad enzimática.



Lactosa

Metil β -D galactósidoO-nitrofenil β -D galactósidon-butil β -D galactósidoP-nitrofenil β -D galactósidoO-nitrofenil α -L arabinósidoFenil β -D galactósidoFIGURA 10. Estructura de diversos sustratos para la enzima β -Galactosidasa

Estudios semicuantitativos, indican que, en general, la velocidad de hidrólisis depende del tipo de unión entre β -D-galactósido y que estas velocidades se decremantan en el orden (1-6)>(1-4)>(1-3)>(1-1). Por otro lado α -D galactósidos, α ó β D glucósidos, α D manósidos y β -D-fructósidos no son hidrolizados (55).

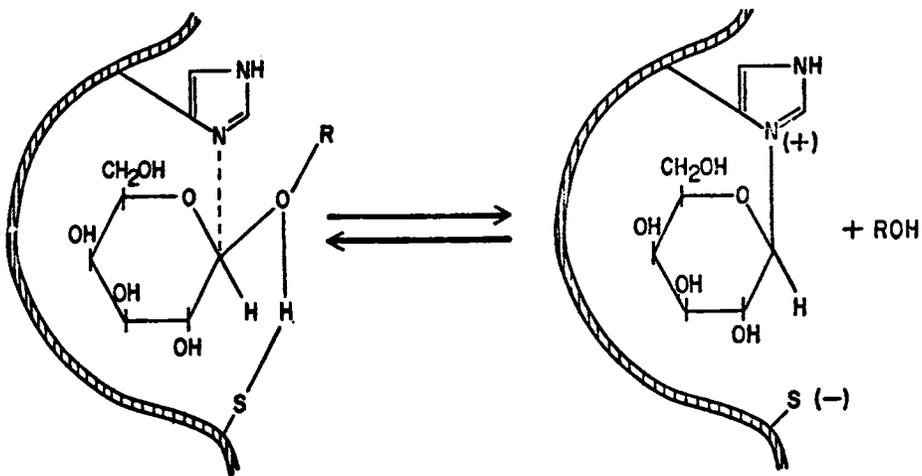
2.8 Mecanismos de Reacción postulado para la acción de la β -galactosidasa.

Wallenfels y Malhotra han propuesto un mecanismo para la acción de la β -galactosidasa en donde se plantea la transferencia de un residuo galactosa de un galactósido a un aceptor (agua, otro azúcar o alcohol). Este mecanismo, además, sostiene que la aglicona y el aceptor ocupan la misma posición en la molécula enzimática, en donde el aceptor entra solo después de haber sido removida la aglicona. Con ello la actividad de este enzima frente a los tiogalactósidos es fácilmente explicable, porque en este caso una unión de tipo enlace de hidrógeno, debe formarse entre los dos átomos de azufre, lo que es bastante improbable (Figura 11).

Examinando el modelo molecular se propone que el grupo imidazol solo se puede acercar por el mismo lado que el anillo piranosa se une al oxígeno galactosídico.

Otra base que se dá para la proposición de este mecanismo,

1



2

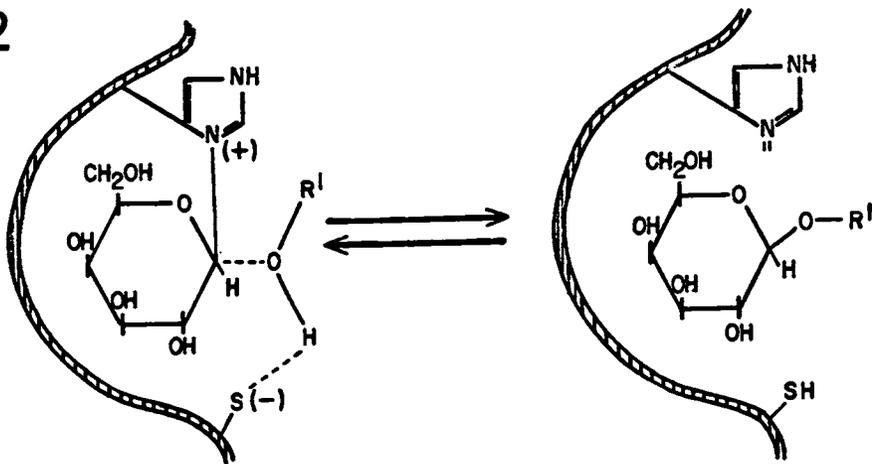


FIGURA 11. Mecanismo de reaccion propuesto para la accion de la β -galactosidasa

es que dado que la afinidad aparente por la enzima no se ve afectada por el reemplazo del oxígeno galactosídico por un átomo de azufre, se sugiere que este átomo no interviene en la configuración del complejo enzima-sustrato. Considerando lo anterior, se puede notar que los requerimientos específicos para el residuo galactosa (glicóna) son más rígidos que los requerimientos específicos para la parte aglicóna, lo que sugiere que es el anillo galactosa el responsable de la formación del complejo enzima-sustrato. Además las fuerzas inespecíficas de Van der Waals operan por igual en la parte aglicóna como en la glicóna, por lo que esta última puede estar o ser enlazada a la enzima por medio de puentes de hidrógeno como se puede observar en la Figura 12.

De lo anterior se concluye, que solo grupos de péptidos alternados están en condiciones de formar enlaces, de modo que necesitan estar presentes 6 ó 7 residuos aminoácidos entre la cisteína y la histidina.

Debido a que los α -L-arabinósidos tienen un $\bar{O}H$ menos que los β -D galactósidos y recordando lo dicho anteriormente, es lógico que estos exhiban una menor afinidad por la enzima (56).

2.9 Cinética de Células Inmovilizadas.

La cinética inherente y la efectiva pueden ser definidas

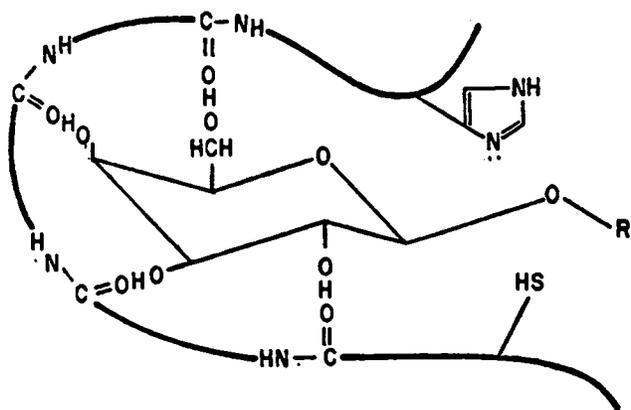


FIGURA 12. Posible estructura del complejo enzima-sustrato de la β -galactosidasa.

como el comportamiento de las células inmovilizadas en la ausencia de limitaciones difusionales y cuando son significativas, las limitaciones difusionales, respectivamente. La cinética de las células inmovilizadas es más compleja que la expresión que describe una actividad enzimática simple, pero más simple que la cinética de fermentación debido a que normalmente no hay crecimiento.

El efecto difusional es el más importante modificador de la cinética de las células inmovilizadas especialmente en el caso de una reacción enzimática veloz ó donde la concentración de sustrato es baja, una alta porosidad, mucha actividad o un prolongado uso de las partículas inmovilizadas.

Las limitaciones difusionales externas pueden ser minimizadas por el incremento de la velocidad de agitación en un reactor agitado o por el incremento de la velocidad de flujo de un reactor tubular.

Las restricciones difusionales internas pueden ser detectadas por una disminución en la energía de activación aparente, para la reacción y puede ser esperada una mayor influencia en la actividad de las células inmovilizadas debido a que las partículas de ellas son generalmente mayores que la correspondiente preparación de enzima inmovilizada. Las restricciones difusionales internas pueden ser reducidas usando partículas de soporte irregulares con

una relativa alta relación de area superficie/volumen, pero por supuesto esto nos lleva a un rápido desgaste en un reactor agitado y causa flujo irregular y compresión en una columna empacada.

La cinética de células inmovilizadas usualmente es mas compleja que la correspondiente a enzimas inmovilizadas debido a dos factores adicionales. Estos son la posibilidad de una limitada cantidad de células en división, por parte de las células inmovilizadas, y la presencia de una barrera difusional creada por la existencia de la pared celular y la membrana citoplásmica intactas, lo cual puede provocar enormes variaciones, debido a la estructura de la pared y membrana celular, así como el tipo de sustrato usado. El efecto de esta barrera difusional puede ser cuantificado por el incremento en actividad después de lisis las células (58).

En general la determinación de la K_m y la $V_{m\acute{a}x}$ para la β -galactosidasa se ha hecho por el método de Lineaweaver-Burk, usando lactosa como sustrato. (Tabla 8).

Como se puede ver en la Tabla 8, al momento de inmovilizar la enzima o células la K_m se ve incrementada, en algunos casos esto puede ser explicado al analizar la carga del soporte empleado, así como la porosidad de éste y todas las demás características anteriormente citadas que pueden afectar el valor del K_m .

TABLA 8. Comparación de la constante de Michaelis y velocidad máxima para la α -galactosidasa inmovilizada proveniente de diversas fuentes usando lactosa como sustrato.

Fuente de la enzima	$V_{m\acute{a}x}$ nM min ⁻¹ mg enz ⁻¹ biocat. ⁻¹	Km (mM lact)	pH	T°C	Ref.
<u>E.coli E.106</u>					
Cél. inmovilizadas	7.5×10^{-7}	5.4	6.5	30°	Ohmiga <u>et.al.</u>
Cél. libres	1.1×10^{-3}	5.4			
<u>L. bulgaricus</u>					
Cél. inmovilizadas	0.29×10^{-3}	4.2	6.5	30°	Ohmiga <u>et.al.</u>
Cél. libres	1.3×10^{-2}	4.2			
<u>K. lactis</u>					
Cél. inmovilizadas	0.83×10^{-3}	30	6.5	30°	Ohmiga <u>et.al.</u>
Cél. libres	0.33×10^{-3}	30			
<u>E.coli ATCC 26</u>					
Enz. inmovilizadas	0.24×10^{-3}	4.1	6.8	37	Wandolowski <u>et.al.</u>
Enz. libres	0.26×10^{-3}	4.5			
<u>E.coli</u>					
Enz. libre	-	4.7	7	20	Morisi <u>et.al.</u>
<u>E.coli ML-308</u>					
Enz. libre	0.59×10^{-3}	0.625	-	25	Sharp <u>et.al.</u>
Enz. inmovilizadas	0.45×10^{-3}	1.2			
<u>E.coli</u>					
Cél. inmovilizadas	3.1×10^{-3}	2.9	-	-	Toda K.

Por lo que al efecto de la galactosa y la glucosa en la actividad β -galactosidasa de E.coli se refiere, es necesario mencionar que diversos autores han investigado el efecto de estas sustancias, tanto en enzima purificada como en células libres o inmovilizadas, sobre la velocidad de reacción. Kuby y Lardy demuestran inhibición competitiva para la galactosa y no competitiva para la glucosa, sobre la velocidad de hidrólisis de ONPG, estos investigadores usan la enzima purificada de E.coli K-12. Por otro lado Wondolowski y Woychik investigan el mismo efecto, pero usando como sustrato ONPG, PNPg y lactosa, demostrando para todos los sistemas inhibición competitiva para galactosa e inhibición competitiva de los sustratos sintéticos por la glucosa, en esta investigación se usó enzima purificada de E.coli (ATCC-26).

Ohmiya et. al., llevan a cabo la investigación del mismo efecto, sobre la hidrólisis de lactosa, por células libres e inmovilizadas de E.coli (E-106) L. bulgaricus y K. lactis con actividad lactasa. En este trabajo se encontró que la velocidad de hidrólisis de lactosa por células inmovilizadas de L. bulgaricus y E.coli fue casi constante, no obstante que la concentración de galactosa fué incrementada. El mismo resultado se observó con las células libres de estas bacterias; estos resultados revelan obviamente que no hay inhibición por galactosa. La actividad de K. lactis, sin embargo, es decremada con el aumento en la concentración de galactosa y es demostrada una inhi-

bición competitiva. El efecto de la glucosa en la actividad lactasa de estos microorganismos y siguiendo los patrones de Lineaweaver-Burk fue el de una típica inhibición no competitiva.

Los Ki correspondientes a cada trabajo son presentados en la Tabla 9.

Como podemos observar en la Tabla 9, la comparación sería un poco ambigua pues no todas las constantes han sido determinadas con respecto a un solo sustrato, el único punto de comparación sería el tipo de inhibición, que en general se puede decir es reproducible para ambas sustancias inhibitoras, con la salvedad en el efecto de la glucosa determinado por Wondolowski para la β -galactosidasa purificada de E.coli (ATCC-26) que da un tipo de inhibición diferente a lo esperado.

2.10 Inmovilización de Células usando como soporte Carragenina Kappa.

Recientemente, la investigación y técnicas en la Ingeniería Enzimática ha cobrado un creciente interés, especialmente en sistemas inmovilizados, muchos artículos en la aplicación potencial de enzimas y células inmovilizadas han sido publicados, adquiriendo con ello un rápido desarrollo. Sin embargo la práctica industrial ha sido bastante limitada para el uso de enzimas o células inmoyili-

TABLA 9 .

CONSTANTES DE INHIBICION Y TIPO DE INHIBICION PARA β -GALACTOSIDASA DE E.coli Y OTRAS FUENTES

Fuente de la enzima	K_i (galactosa)mM	K_i (glucosa)mM	Referencia
<u>E.coli</u> K-12 enz. pura	9.4 competitiva frente a ONPG	70 no competitiva frente a ONPG	Kuby - Lardy
<u>E.coli</u> ATCC-26 enz. pura	160 competitiva frente a ONPG	- acompetitiva frente a ONPG	Wondolowski
	80 competitiva frente a ONPG	- acompetitiva frente a PNPG	
	100 competitiva frente a lactosa	- acompetitiva frente a lactosa	
<u>E.coli</u> E-106 Células libres Células inmovilizadas	^a frente a lactosa	70 no competitiva	
	^a frente a lactosa	76 frente a lactosa	
<u>L.bulgaricus</u> Células libres Células inmovilizadas	^a frente a lactosa	230 no competitiva	Ohmiga
	^a frente a lactosa	230 frente a lactosa	
<u>K.lactis</u> Células libres Células inmovilizadas	46 y 103 ^b	340 no competitiva	
	47 y 103 ^b	380 frente a lactosa	

a: Los valores de K_i son mayores que los niveles probados de inhibidor

b: mezcla de inhibición competitiva

zadas (Tabla 10).

En 1969, se consigue la aplicación industrial de una enzima inmovilizada, v. gr. la inmovilización de la aminoacilasa, para la producción continua de L-aminoácidos a partir de DL aminoácidos. Esta fué la primera aplicación industrial de enzimas en el mundo. Posteriormente se desarrolla la aplicación industrial de las células inmovilizadas, consiguiéndose la producción industrial de ácido L-Aspártico y ácido L-Málico, usando células inmovilizadas en gel de poliacrilamida en 1973 y 1974 respectivamente.

Para promover el mejoramiento de los sistemas con células inmovilizadas, se continua estudiando varios polímeros naturales y sintéticos, como matrices para el atrapamiento de células o enzimas en geles, llegando a establecer en base a los resultados que la carragenina kappa es uno de los polímeros más adecuados para la inmovilización de células.

La carragenina kappa, esta compuesta por unidades estructurales de β -D-galactosa sulfato y 3,6, anhidro α D-galactosa, éste polisacárido es fácilmente obtenido de las algas rojas (Rodoficeas). Es un compuesto no tóxico comunemente usado como aditivo alimenticio.

Los grupos sulfato en este tipo de carragenina, se encuentran principalmente en el Carbono 4. La estructura química

TABLA 10. APLICACIONES POTENCIALES DE MICROORGANISMOS Y ENZIMAS INMOVILIZADAS EN LA INDUSTRIA.

Microorganismo o enzima	Sistema Enzimático	Producto	Soporte	Ref.
<u>Pseudomona putida</u>	L-Arginina de imidasa	L-citrulina	gel de poliacrilamida	53
<u>Achromobacter liquidum</u>	L-Histidina amonoliasa.	Acido Uracónico	Gel de poliacrilamida	53
<u>E.coli</u>	Penicilino amidasa	6-APA	Gel de poliacrilamida	53
<u>E.coli</u> <u>Sacharomices cerevisiae</u>	Glutati6n sintetasa	Glutati6n	Gel de poliacrilamida	53
<u>E.coli</u>	Aspartasa	Acido aspártico	Gel de poliacrilamida K. carragenina	6
<u>Streptomyces phaeochomogenes</u>	Glucosa-isomerasa	Fructuosa	Poliacrilamida K.carragenina colágena	6
<u>Brevibacterium ammoniogenes</u>	Fumarasa	Acido Málico	Poliacrilamida K.carragenina	6
<u>Brevibacterium flavum</u>				
<u>Corynebacterium glutamicum</u>	Glutamato deshidrogenasa	Acido glutámico	Poliacrilamida	35
<u>Gluconobacter melonogenus</u>	?	L-sorbozona	Poliacrilamida	35
Aminoacilasa	Aminoacilasa	L-aminoácidos	Poliacrilamida K.carragenina	20
Aspartasa	Aspartasa	Acido aspártico	Poliacrilamida K. carragenina	20
Glucosa-Isomerasa	Glucosa-Isomerasa	Fructuosa	Poliacrilamida K. carragenina	20

ca de la carragenina kappa es presentada en la Figura 13. (20).

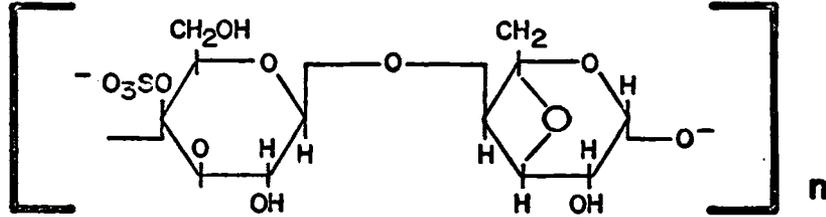
La carragenina se caracteriza por formar geles termoreversibles bajo condiciones suaves, así entonces, gelifica por enfriamiento como en el caso del agar, por contacto con soluciones acuosas del ión amonio o aminas tales como diaminas alifáticas o aromáticas y derivados de aminoácidos, la formación del gel puede también ocurrir por el contacto con solventes orgánicos miscibles en agua.

La función gelificante del potasio en la carragenina kappa parece residir en el ester sulfato, que al gelificar se conforma con una doble hélice, estabilizando proteínas, como la caseína de la leche.

El proceso de inmovilización de células microbianas usando carragenina como matriz es el reportado por Tosa et. al., y es esquematizado en la Figura 14. (51).

El tratamiento con glutaraldehído tiene por objeto aumentar la estabilidad del catalizador ya que el grupo aldehído reacciona con la hexametildiamina y algunos grupos amino de la célula formando puentes intramoleculares.

La efectividad del tratamiento con glutaraldehído depende de su concentración, pH, temperatura, tiempo de contacto con el catalizador (soporte-células), etc.



Unidad estructural: β -D galactosulfato y 3,6 anhidro
 α -D galactosa.
 Peso molecular: 100,000 - 800,000
 n: 200 - 250
 Contenido de ester sulfato: 20 - 30 % en peso
 Contenido de 3,6 Anhidro α -D galactosa: 34 % en peso
 Otros tipos de Carragenina: Theta, Iota, Lambda, Mu, Nu y Xi.

FIGURA 13. Estructura química de la Carragenina

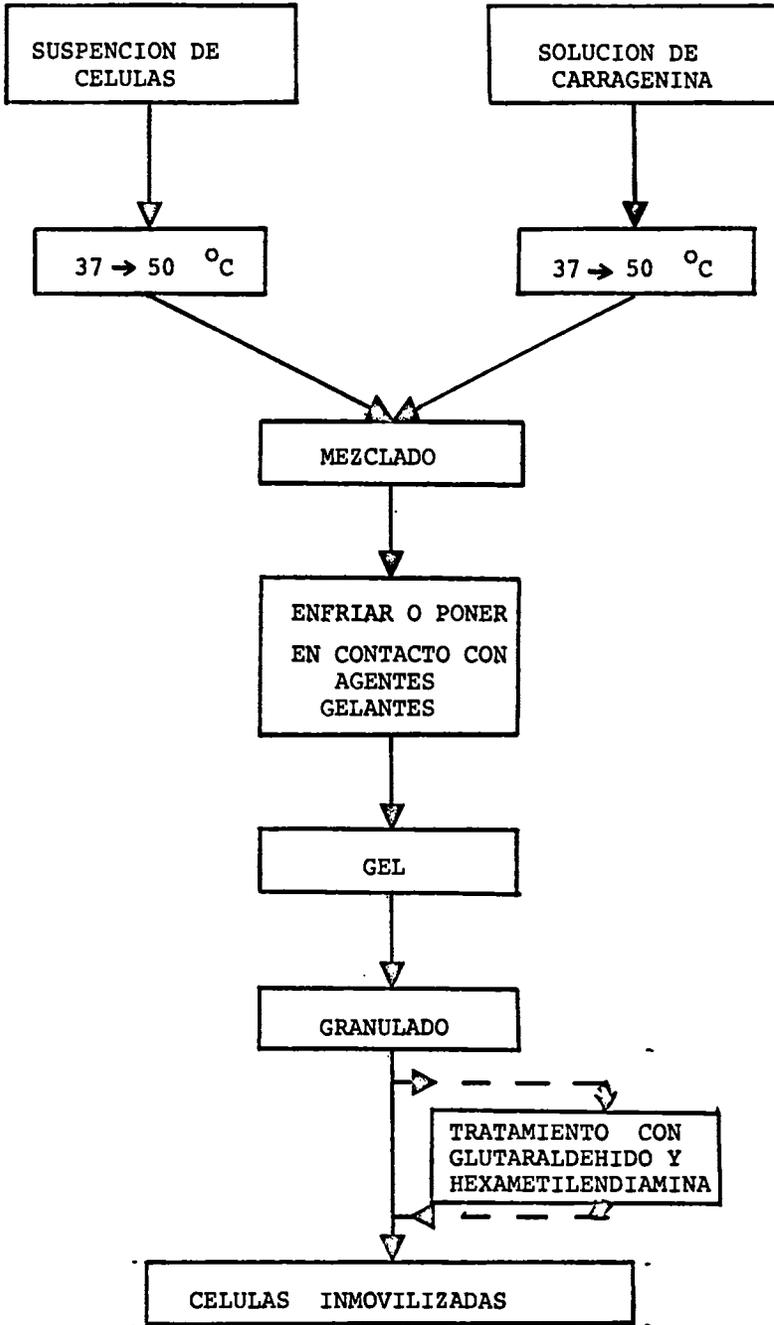


FIGURA 14. Esquematización del proceso de inmovilización de células microbianas usando carragenina como matriz según Tosa *et al.*

Se han hecho nuevos estudios en sistemas con células inmovilizadas, preparando éstas con carragenina, para la producción continua de etanol y L-isoleucina. El perfeccionamiento no solo se ha hecho en estos sistemas, sino también en la producción continua de compuestos usuales como aminoácidos, antibióticos y otros (53).

2.11 Condiciones de operación y estabilidad de reactores enzimáticos con células inmovilizadas.

Los reactores enzimáticos difieren de los reactores químicos, principalmente en que las enzimas operan a presión atmosférica y comparativamente son poco exotérmicas o endotérmicas las reacciones catalizadas por ellas. Como en el caso de reactores químicos, los reactores bioquímicos son caracterizados por sus productos, especificidad y fundamentalmente tipo de flujo, la selección del tipo de reactor depende de una variedad de factores tales como: las propiedades físico-químicas de el o los sustratos y productos, la naturaleza del material de soporte, el tipo de células usado, el método de inmovilización y el tipo de reacción enzimática efectuado.

Los reactores son clasificados de acuerdo al método de retención del catalizador, las características de flujo, y si es usado en operación continua o intermitente. El perfil de la concentración de sustrato dentro del reactor varía con las diferentes configuraciones, por ejemplo en

un reactor agitado en donde se obtiene un mezclado casi completo; la concentración del sustrato y productos, son considerados, en el caso ideal, iguales en cualquier punto del reactor, en tanto que en un reactor empacado, en el cual el flujo es tapón, la concentración de sustrato y productos varían con la distancia en la columna. Los perfiles de concentración se pueden afectar por la actividad y estabilidad de las células inmovilizadas.

La operación continua de los reactores ofrece ventajas económicas, especialmente por los altos rendimientos, económicos y los bajos costos operacionales. Por otro lado, la operación constante es más fácil de controlar y automatizar. Sin embargo el reemplazo y regeneración de la actividad catalítica son más difíciles. La actividad por unidad de volumen del reactor es muy importante, ya que este parámetro determina principalmente el tamaño del reactor requerido para obtener la productividad deseada (58) (figura 15).

La Tabla 11 presenta la actividad y estabilidad de algunas de las más importantes células inmovilizadas, incluyendo los 3 procesos industriales en uso. En esta Tabla podemos ver que la estabilidad de las células inmovilizadas es mayor que las células libres; pero son significativamente diferentes de la correspondiente preparación enzimática.

Deben ser considerados de igual forma, factores tales como

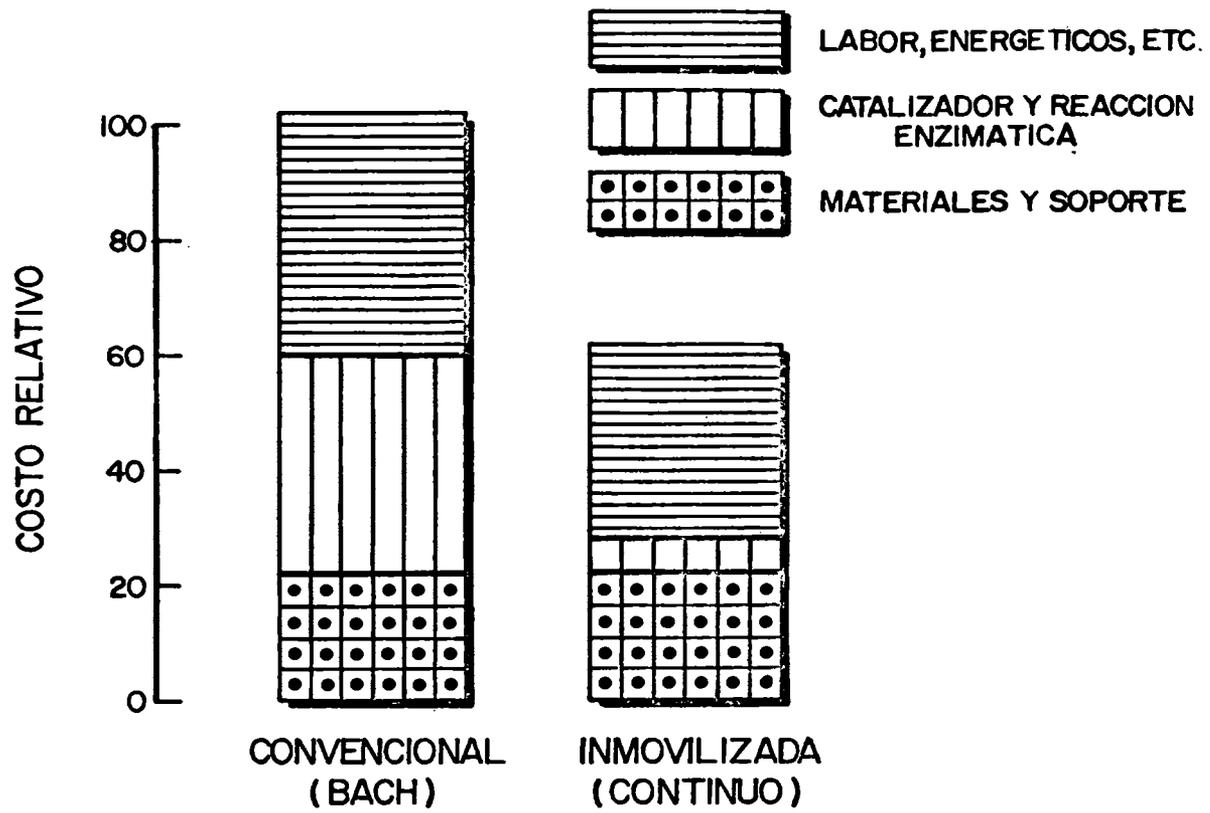


FIGURA 15. Comparación del costo relativo entre un proceso bach o - intermitente y un proceso continuo en el uso de una enzima.

TABLA 11

COMPARACION DE LAS PROPIEDADES ENZIMATICAS DE CELULAS MICROBIANAS INTACTAS
E INMOVILIZADAS Y CONDICIONES PARA LA PRODUCCION CONTINUA DE COMPUESTOS
ORGANICOS POR CELULAS INMOVILIZADAS

Enzima: Microorganismo	Aspartasa <u>E.coli</u>	Fumarasa <u>Brevibacterium</u> <u>ammoniaenes</u>	L-Arginina deimidasa <u>Pseudomona</u> <u>putida</u>	L-Histidina amonio-liasa <u>Achromobacter</u> <u>liquidum</u>	Penicilino amidasa <u>E.coli</u>
pH Optimo					
Intactas	10.5	7.5	5.5-6.0	9.0	8.5
Inmovilizadas	8.5	7.0	5.5-6.0	9.0	8.5
Temp. Optima (°C)					
Intactas	50°	60°	37°	60°	40°
Inmovilizadas	50°	60°	55°	60°	40°
Estabilidad Térmica (actividad remanente(%))					
Condiciones	50°, 30 min	55°, 60 min	60°, 60 min	-	60°, 30 min
Intactas	49	63	42	-	10
Inmovilizadas	58	65	63	-	25
Sustrato	Fumarato de amonio	Fumarato de sodio	L-Arginina	L-Histidina	Penicilina-G
pH	8.5	7.0	6.0	9.0	8.5
Estabilizador	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ o Mn ²⁺	-	-	Ca ²⁺ , Co ²⁺ , Mg ²⁺ o Zn ²⁺	-
Temperatura (°C)	37°	37°	37°	37°	40°
Velocidad de flujo (VE, hr ⁻¹)	0.80	0.23	0.26	0.06	0.24
Producto	Ac.L-aspártico	Ac. Máfico	L-Citrolina	Ac.Uracónico	6-APA
Rendimiento de producto(%)	95	70	96	91	80
Estabilidad operacional (vida media, días)	120 (37°)	52.5 (37°)	140 (37°)	180 (37°)	17, 42 (40°) (30°)

la disminución de actividad de las células inmovilizadas, que es a menudo debido a la lisis de las células, seguido de la pérdida del contenido intracelular, y en particular de iones divalentes. El uso de un soporte de poro compresible en un reactor de lecho empacado, ocasiona que las restricciones difusionales en la velocidad de reacción (que son reflejadas en la disminución del factor de efectividad) y la caída de presión en la columna, puedan ser incrementadas por el decremento en el tamaño de las partículas de células inmovilizadas y la viscosidad del sustrato.

Idealmente cuando se escala un proceso, el sistema modelo es geométrica y dinámicamente similar a una versión mayor. El uso de columnas empacadas permite la operación continua con el consecuente decremento de los costos operacionales.

El uso de columnas en paralelo es más satisfactorio, ya que se proporciona una calidad constante del producto y la productividad es mantenida, despreciando la constante declinación en la productividad obtenida en una columna individual. Son encontrados menos problemas de compresión de las columnas cuando se usa un número de pequeñas columnas, pero las determinaciones y los sistemas de control se complican (58).

2.12 Reactores en la Hidrólisis de Lactosa.

Un resumen de los estudios reportados de lactosa in-

movilizada para el proceso de hidrólisis de lactosa es presentado en las Tablas 12 y 13. En función de las técnicas, el diseño, la operación y las consideraciones económicas, el reactor tubular conteniendo partículas catalíticas parece ser la mejor elección para la hidrólisis de lactosa en leche o suero de leche. Tales reactores son la base para el desarrollo de la tecnología de hidrólisis de la lactosa y han sido usados sucesivamente por otros procesos de enzimas ya comercializados (por ejemplo, isomerización de glucosa, resolución de mezcla racémica de aminoácidos). (44).

De los procesos de la Tabla 12, los que mas parecen prometer son los desarrollados por Olson-Stanley (12,13,36), el grupo Corning (45), Coughlin-Charles (8) y el Snamprogetti-Central de Lacteos en Italia (32,38,39).

Todos ellos son relativamente baratos, presentan alta actividad y son bastante estables.

Los tres primeros procesos, de entre los mencionados, debido a las características que presenta la β -galactosidasa que emplean, son enfocados a la hidrólisis de lactosa en suero ácido debido a que la enzima proviene de Aspergillus niger y el pH óptimo de actividad de esta enzima se encuentra entre 3 y 4.5 lo cual nos sugiere que, a pesar de ser recomendados para su aplicación a suero dulce y leche, no tienen posibilidad pues el pH de estos productos es

TABLA 12. REACTORES TUBULARES EN LA HIDROLISIS DE LACTOSA

Fuente de la enzima	Soporte	Método de inmovilización	Eficiencia de enlace	Actividad inicial (UI/gm)	Vida media (días)	Tipo de reactor	Capacidad (ml/hr)	Sustrato	% de conversión	Temp.°C	Comentarios	Ref.
<u>A.niger</u>	Resinas fenólicas (duo lite 5-30) 10-50 malla	Adsorción + entrecruzamiento con glutaraldehído.	75%	200-500 (45°C, pH 4)	4 semanas (45°C)	Lecho fijo	30-300 ml/hr	Suero de leche proteínizado	80-90%	40-50°C	Retiene sus características en una escala de 500 x . La contaminación microbiana el mayor problema. Usando H ₂ O ₂ diluido y almacenado en frío se minimiza ésta.	36
Levadura	Resinas fenólicas	Covalente con cloruro de triacínolo	18%	-	8 días	Lecho fijo.	-	Leche	100%	5°C	-	61
<u>K.lactis</u>	Colágena molida	Entrecruzamiento con glutaraldehído	-	-	5 días (25°C)	Lecho fijo	18 l/hr	Suero dulce	85%	25°C	Taponamiento debido al crecimiento de bacterias	44
<u>A.niger</u>	CPG malla 120/200	Covalente	-	89	165 días (55°C)	Lecho fijo	1-5 ml/min	suero ácido reconstruido.	30-98%	55°C	-	-
<u>K.lactis</u>	CPG malla 120/200	Covalente	-	4.1	-	-	-	-	-	-	-	44
Dayryland Inc.	CPG malla 40/80	Covalente	-	-	3 días	Lecho fijo.	2ml/min	Suero de cheddar	38%	40°C	La conversión cae de 38% a 13% en 3 días. Desarrollo microbiano por altas dificultades operacionales.	62

Cont. Tabla 12.

Fuente de la enzima	Soporte	Método de inmovilización	Eficiencia de enlace	Actividad inicial	Vida Media (UI/g)	Tipo de Reactor	Capacidad	Substrato	% de Conversión	Temp °C	Comentarios	Ref.
Fungica (Miles)	CPG-ZnO ₂ malla 40/80	Covalente	-	50-100 (60°C)	60 días (40°C)	Lecho fijo	1-2 ml/min	Lactosa 5% Lactosa 10%	80% (E/F=3000) ^a 80% (E/F=6000)	40°C	1. El producto final fue 1% lactosa y 45% galactosa y 45% glucosa.	44
Levadura (Kyowa Hakko Kogyo Inc.)	CPG-ZnO ₂ malla 40/80	Covalente	-	400-1100 (60°C)	60 días (30°C)	-	-	-	-	-	-	20
<u>A. niger</u>	ZnO ₂ -CPG malla 40/80	Covalente	25-80%	250-800	38 días (40°C)	Columna	1-2 ml/min	Sol. lactosa suero dulce (UF), suero ácido (UF)	60-70%	30-50%	Se sugiere para usar con suero dulce t 1/2=53.7 días a 40°C) y posiblemente también en leche. La contaminación microbiana es el mayor problema en almacenamiento. Se sugiere el uso de glutaraldhído al 2% y aminas cuaternarias para el lavado del reactor industrial.	44
<u>A. niger</u>	ZnO ₂ -CPG	Covalente	30-50%	1150	7 días (60°C) 60 días (50°C)	Columna	4"x18"	Sol. de lactosa, suero desmineralizado (UF)	70-85%	38°C	La columna se lava diario 1/2 hr. con ac. acético diluido	44
<u>A. niger</u>	Alumina (100-150 µm)	Adsorción + Cross Linking con glutaraldehído	50%	700 (50°C)	50-60 días (50°C)	Lecho fluidizado	0.5L/min (3"x6")	Solución de lactosa, suero U.F.	70-85%	50°C	La columna se lava con losan. Las partículas y el desarrollo microbiano no constituyen problema	8
<u>K. fragilis</u> (SNAM-PRO GETTI)	Fibras de triacetato de celulosa	Atrapamiento	30%	1500	94 días	Columna	15 cm diámetro 56 cm altura	Leche	70-80%	25°C	Procesan 10,000 l. de leche en 50 Bach la pérdida de actividad 10%. Capacidad mínima de la planta 8000 l/día.	32 38 39

próximo a la neutralidad, lo cual sería la principal desventaja para su aplicación.

Asimismo, los dos primeros procesos emplean reactores de lecho fijo y por lo tanto solo son susceptibles para usar en suero filtrado o ultrafiltrado, la contaminación microbiana es la principal causa de los problemas de taponamiento, aún cuando se procese suero desproteínizado.

La caída de presión, a través del reactor de lecho fijo conteniendo pequeñas partículas catalíticas puede ser bastante alta aún en ausencia de bloques causados por partículas o microorganismos.

El reactor de lecho fluidizado desarrollado por Coughlin y Charles no está sujeto a problemas de taponamiento y caída de presión, pudiendo así descuidar la naturaleza de la alimentación, sin embargo, se necesita prevenir el desarrollo de una seria desviación del flujo tapón.

El proceso desarrollado por SNAM Progetti y la Central de Lácteos a diferencia de los anteriores, parece ser el más indicado para la hidrólisis de lactosa en leche, pues la enzima que emplean tiene características óptimas similares a las que prevalecen en la leche, además, al usar una columna empacada como reactor para los experimentos a nivel planta piloto, se pueden evitar el taponamiento y lograr altas velocidades de flujo, ya que estas últimas así como

la densidad del empaque, juegan un importante papel en la eficiencia por atrapamiento, se presenta la limitación por difusión y el problema general más serio que es la contaminación microbiana (9,58).

Este proceso es importante debido a que la actividad de la enzima inmovilizada es considerable a 4°C, lo que permite trabajar a bajas temperaturas, contribuyendo así a la disminución de las posibilidades de contaminación.

Durante los experimentos en planta piloto, la leche retiene sus propiedades organolépticas original exhibiendo solo un ligero incremento en la intensidad del sabor dulce.

Al analizar la Tabla 13, podemos señalar que los trabajos realizados con la β -galactosidasa de E.coli, la limitante más importante para su uso es debido a que la inocuidad del empleo de este microorganismo no ha sido demostrada por la FDA. Sin embargo todos estos catalizadores, enlistados en dicha tabla, son catalizadores susceptibles de comercializarse para la hidrólisis de lactosa en leche, pues son bastante baratos, sumamente estables, tienen alta actividad, se logran altas conversiones, su temperatura de trabajo puede ser bastante variable y su pH óptimo de actividad se encuentra en las inmediaciones del pH de la leche o en el pH de ésta.

TABLA 13. REACTORES PARA LA HIDROLISIS DE LACTOSA CON β -GALACTOSIDASA INMOVILIZADA DE E.coli

Fuente de la enzima	Método de inmovilización y configuración del reactor	Capacidad	Temp.	Conversión	Vida Media	Comentarios	Ref.
<u>E.coli</u> (Worthington)	Atrapamiento en membranas de colágena reactor modular	200 ml (volumen del reactor)	37°C	100%	Estable por 8 meses operación intermitente.	Soluciones de lactosa pura al 6%. Se opera solo con recirculación. Eficiencia de enlace 30%.	63
<u>E.coli</u> (Worthington)	Enlace covalente, unido a tubos de nylon.	0.3 cm x 40 cm 15 ml/hr	22°C	90% (20 hrs)	> 1 semana (4°C)	Opera con recirculación 300 ml de leche descremada a 9.3 cm/seg se tiene 90% de conversión en 20 hrs.	33-34
<u>E.coli</u>	Enlace covalente en polisocianato moldeado en barras de agitación magnéticas.	-	37°C	90%	=125 días	Las barras fueron usadas 82 veces x 15 min. durante un periodo de 118 días (cuando no se usaban se almacenaban en refrigeración; se perdió solo 35% de la actividad inicial.	12-13
<u>E.coli</u> (Worthington)	Atrapamiento en membranas de colodión (discos de 6 pulgadas de diámetro)	5 gal/día	3-5°C	85%	> 24 meses (3-5°C)	La configuración del sistema es susceptible de ser usado para sistemas multienzimáticos.	44
<u>E.coli</u>	Atrapamiento en polímeros celulósicos; reactor tubular	100 ml/hr	25°C	75%	=100 días (leche descremada)	La contaminación microbiana es removida fácilmente. Puede obtenerse una alta carga enzimática y eficiencia de enlace. Se continúa investigando los problemas difusionales e hidrodinámicos	32

III. OBJETIVOS

OBJETIVO.

Valorar, la potencialidad del sistema β -galactosidasa en células de Escherichia coli, inmovilizadas en carragenina, con objeto de hidrolizar la lactosa contenida en leche, para la obtención de leche con bajo contenido de lactosa.

OBJETIVOS PARCIALES.

- Identificar una cepa de E.coli que sea β -galactosidasa constitutiva.
- Caracterizar cinéticamente la enzima β -galactosidasa unida a células de E.coli.
- Inmovilizar células de E.coli con actividad β -galactosidasa usando carragenina como matriz.
- Caracterizar cinéticamente el biocatalizador.
- Valorar el sistema biocatalizador-leche.
- Lograr la hidrólisis de lactosa en leche con el catalizador obtenido.
- Demostrar parcialmente la inocuidad del mismo.

IV

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1 EQUIPO

- Balanza Analítica cap. 100 g (5200) Bosch
- Baño de agua con agitación rotatoria (Modelo G-76) New Brunswick Scientific Co.
- Centrífuga clínica 5000 rpm (Sol-Bat) Aparatos Científicos
- Centrífuga de alta velocidad con refrigeración (Sorvall RC-5B) Du Pont Instruments.
- Colorímetro (Spectronic 20) Bousch & Lomb.
- Spectrofotómetro (Modelo 35) Beckman
- Potenciómetro (pH meter 125) Corning.
- Homogenizador (Caframo) Equipar, S.A.

4.2 METODOS

Determinación de actividad β -galactosidasa de células libres usando O - nitrofenil β -D galactósido (ONPG) como sustrato.

4.2.1 Método O-nitrofenil β -D-galactósido para la determinación de actividad β -galactosidasa de E.coli (Lederberg et. al, 1950; Kuby et. al. 1953).

Fundamento.

Debido a que el cromógeno ONPG es hidrolizado por la misma enzima de E.coli que efectúa la hidrólisis de lactosa, éste es usado como sustrato de prueba en el ensayo de lactasa de coli. El método descrito es el elaborado por Lederberg, modificado ligeramente por Kuby y adaptado por nosotros para células libres con actividad β -galactosidasa.

El glicósido (ONPG) intacto a pH 7 y en buffer de fosfatos (0.1M) da soluciones incoloras, al ser hidrolizada una molécula de ONPG, esta rinde una de galactosa y una de O-nitrofenol (ONP).

El ONP libre es objeto de cambios tautoméricos, en solución alcalina, que originan una coloración amarilla, que puede ser medida colorimétricamente y dicha coloración es proporcional a la actividad enzimática y al tiempo. La absorbancia máxima de ésta coloración es a 410 nm.

Reactivos:

O-nitrofenil β -D-galactósido	Q.P.	(Sigma)
Carbonato de sodio	Q.P.	(Baker)
Cloruro de magnesio	Q.P.	(Baker)
β -Mercaptoetanol	Q.P.	(Merck)
Fosfato de sodio monobásico	Q.P.	(Baker)
Fosfato de sodio dibásico	Q.P.	(Baker)

Microorganismo: Escherichia coli CSH-36

Preparación:

- Solución ONPG (68mM).- Disolver 20.5 mg de ONPG por ml de buffer de fosfatos (0.1M) pH 7, calentar lentamente hasta disolución total.
- Solución de β -Mercaptoetanol (3.36M).- A 1 ml de β -Mercaptoetanol disolverlo en 3.26 ml de agua destilada.
- Solución de cloruro de magnesio (0.03M).- Pesar 61 mg de cloruro de magnesio, disolver en 3 ml de agua destilada y aforar a 10 ml con agua destilada.
- Solución de carbonato de sodio (0.05M).- En 5 ml de agua destilada disolver 530 mg de carbonato de sodio y aforar a 10 ml.
- Solución buffer de fosfatos (0.1M) pH 7.0.- Disolver 8.46 g de fosfato de sodio dibásico y 5.49 g. de fosfato de sodio monobásico en 250 ml de agua destilada y aforar a 1000 ml.

- Paquete celular y suspensión de células.- Tomar 10 ml de medio de cultivo con células y centrifugar a 3000 rpm durante 30 minutos, decantar y resuspender el paquete celular a 1 ml con buffer de fosfatos (0.1M) pH 7, determinar densidad óptica y extrapolar en la gráfica de peso seco vs. densidad óptica para conocer la cantidad de células en el ml.

* Procedimiento para determinar actividad enzimática β-galactosidasa en células libres.

- a) Mezclar
 - 26 ml de buffer de fosfatos (0.1M) pH 7,
 - 1 ml de β-mercaptoetanol (3.36 M)
 - 1 ml de cloruro de magnesio (0.03M)
 - 1 ml de suspensión de células de D.O. conocida.
- b) Incubar con agitación por 3 minutos a 37°C
- c) Adicionar a la mezcla anterior 1 ml de solución de ONPG (68 mM) a 37°C y mantener la agitación.
- d) Tomar alícuota de 1 ml cada 30 segundos
- e) Para parar la reacción adicionar la alícuota a 2 ml de solución de carbonato de sodio (0.5M), centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos.
- f) Leer la densidad óptica a 410 nm* contra blanco de reactivos.

$$\text{Unidades/mg células} = \frac{\text{Abs } 410 \text{ min}^{-1} \times 3.0^{\circ} \times 30^*}{3.5^{**} \times \text{mg de células}}$$

⊙ = volúmen de reacción

* = dilución con Na₂CO₃

** = coeficiente de extinción milimolar del ONP

* En las condiciones específicas la determinación de la densidad de color es hecha a pH > 10, intervalo en el cual el grupo fenólico del ONP es completamente dissociado (pK 7.3) y la densidad de color es máxima.

Procedimiento para medir actividad enzimática β -galactosidasa en células de E.coli inmovilizadas en carragenina usando ONPG como sustrato.

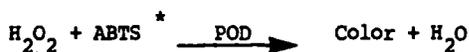
Se sigue el mismo procedimiento anterior, con la única salvedad de adicionar 1 gr de biocatalizador (peso húmedo) en sustitución del ml de suspensión de células libres a la mezcla de reacción.

* Determinación de actividad β -galactosidasa de células libres de E.coli usando lactosa como sustrato.

4.2.2 Método.

GOD-Perid (Werner et. al. 1970)

Fundamento:



* ABTS = 2,2'-azino-di-(3 etil benzotrazolina)-6 sulfonato

GOD = glucosa - oxidasa

POD = peroxidasa

Reactivos:

- Equipo Glucosa
- God Perid (Lakeside)
- Test-Combination

i) Solución estandar de glucosa (1 mg/ml)

ii) Amortiguador enzimas/cromógeno

- Ac. perclórico Q.P. (Baker)
- $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ Q.P. (Baker)
- Na_2HPO_4 Q.P. (Baker)

- Lactosa Q.P. (Merck)
- Suspensión de células de E.coli CSH-36

Preparación:

- Solución de enzimas amortiguador/cromógeno.- Disolver un vial conteniendo dichas sustancias, en 500 ml de agua destilada y aforar a 1000 ml. ✓
- Solución de ácido perclórico al 4.2%.- Aforar 7 ml de ácido perclórico al 60% a 100 ml con agua destilada.
- Solución de lactosa al 6.75%.- Pesar 6.75 g de lactosa y disolver en 50 ml de agua destilada, finalmente aforar a 100 ml.
- Suspensión de células.- Como se describe anteriormente.

Procedimiento:

a) Mezcla de reacción

Solución de lactosa (4.5% c. final)	40 ml
buffer de fosfatos (0.1M) pH 7	9 ml
suspensión de células de E.coli CSH-36 con D.O. conocida	1 ml



- b) Incubar a 37°C y tomar alícuota de 2.5 ml cada determinado tiempo
- c) Adicional la alícuota a 0.5 ml de ácido perclórico al 4.2% para parar la reacción.
- d) Centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos.
- e) Desarrollar color, 50 µl de sobrenadante adicionados en un tubo agregarles 5 ml de solución de enzimas.
- f) Incubar a 25°C durante 25-30 minutos, hacer las mismas operaciones con todas las alícuotas.

- g) Leer a 610 nm contra blanco de reactivos, extrapolar la D.O. en la gráfica de μg de glucosa v.s. D.O. para conocer los μg de glucosa producida.
- h) La curva estandar de prepara por dilución de la solución estandar de glucosa, en el intervalo de 0 a 1000 μg por ml y hacer el mismo procedimiento que para el sobrenadante (d).

$$\mu\text{M glucosa} / \text{min mg células} = \frac{\mu\text{g glucosa} \times \text{V. final}}{\text{minuto} \times \text{mg células} \times 180}$$

4.2.3 * Procedimiento para determinar la actividad β -galactosidasa en células de E.coli inmovilizadas en carragenina usando lactosa como sustrato.

Se mantienen las condiciones mencionadas anteriormente y se sustituye de la mezcla de reacción el mililitro de suspensión de células por 1 gr. de biocatalizador (peso húmedo) y se mantienen los mismos componentes de la mezcla, continuando con el mismo procedimiento anterior.

Procedimiento para medir actividad enzimática β -galactosidasa usando leche, en un reactor agitado con células de E.coli inmovilizadas en carragenina.

- a) Medir 60 ml de leche evaporada a la que previamente se le ha determinado el contenido de lactosa.
- b) Poner esta leche en contacto con 15 g de biocatalizador.
- c) Mantener en agitación y a 37°C
- d) Tomar alícuota de 1 ml y desproteinizar.
- e) Con el desproteinizado seguir el mismo procedimiento usado para la determinación de actividad β -galactosidasa usando lactosa como sustrato a partir del inciso e).

* Determinación de lactosa en leche,

4.2.4 Método

Acido Dinitrosalicílico, DNS (Summer et. al. 1935)

Fundamento:

Este método se basa en la reducción del ácido dinitrosalicílico por azúcares reductores, formando un compuesto nitroaminado colorido (amarillo), cuya densidad óptica es proporcional a la concentración de grupos reductores la densidad de color se mide espectrofotométricamente a 540 nm.

Reactivos:

Acido Dinitrosalicílico	Q.P.	(Baker)
Hidróxido de sodio	Q.P.	(baker)
Tartrato de sodio y potasio	Q.P.	(Baker)
Leche evaporada		(Carnation)
Hidróxido de bario	Q.P.	(Sigma)
Sulfato de zinc	Q.P.	(Sigma)

Preparación:

- Reactivo DNS.- Pesar 10 g de DNS, 16 g de hidróxido de sodio y 300 g. de tartrato de sodio y potasio, ya pesados se colocan en un matraz erlenmeyer de 1000 ml en el siguiente orden: hidróxido de sodio, tartrato de sodio y potasio, finalmente DNS, adicionar agua destilada suficiente para disolver estos reactivos, calentar para disolución total, aforar a 1000 ml y guardar en frasco ambar.
- Solución de hidróxido de bario (0.3N).- Pesar 2.565 g de hidróxido de bario, disolver y aforar a 100 ml con agua destilada.
- Solución de sulfato de zinc (0.3N).- Disolver 2.415 g de sulfato de zinc en 50 ml de agua destilada, finalmente aforar a 100 ml.

Procedimiento:

- Preparación de la muestra de leche (Desproteínización).
 - i) A 1 ml de leche adicionar 4 ml de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (0.3N) y mezclar durante 30 segundos.
 - ii) Adicionar a la mezcla anterior 4 ml de ZnSO_4 y mezclar
 - iii) Centrifugar a 3000 rpm, durante 15 minutos, el sobrenadante debe ser inocloro.

- Determinación de lactosa en leche.
 - a) Mezclar 1 ml de reactivo DNS, 0.1 ml de sobrenadante del desproteínizado y 0.9 ml de agua destilada.
 - b) Incubar durante 5 minutos en baño de agua hirviendo.
 - c) Enfriar en hielo y adicionar 10 ml de agua destilada
 - d) Mezclar y dejar reposar durante 15 minutos.
 - e) Leer a 540 nm contra blanco de reactivos y extrapolar en la curva de referencia.

La curva de referencia se elabora utilizando soluciones de lactosa en concentraciones de 0 a 3420 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (figura 16).

NOTA: Transcurrido el tiempo de reposo, la coloración amarilla es estable por aproximadamente 4 horas.

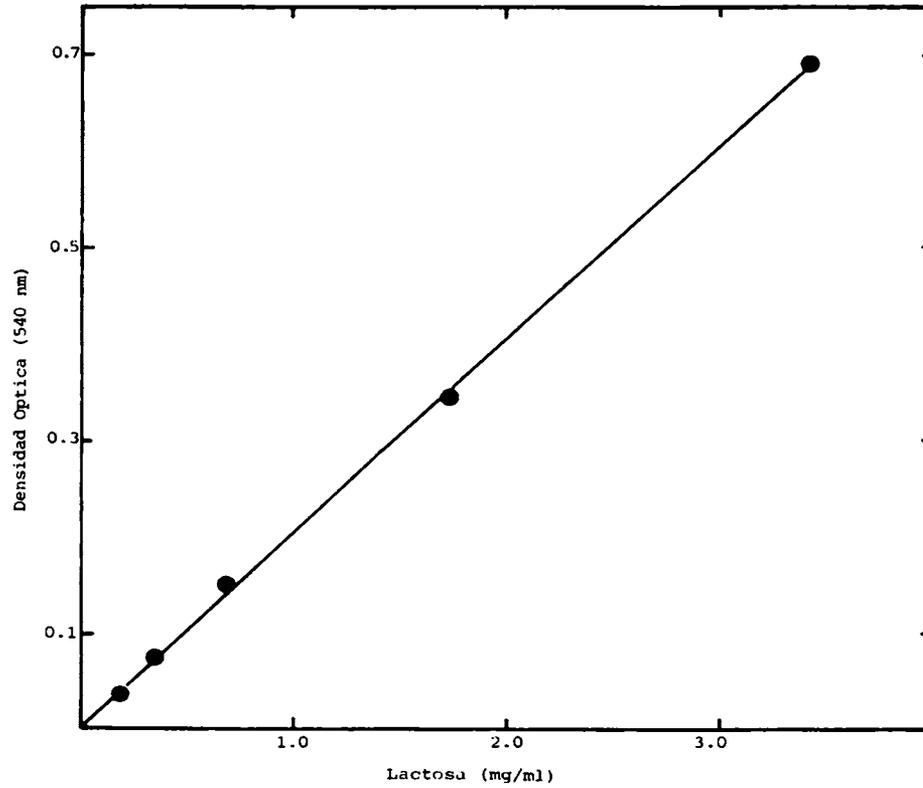
4.2.5 Producción de células

Crecimiento y cosecha de E.coli CSH-36 con actividad β -galactosidasa

1. El crecimiento de E.coli CSH-36, dependiendo de la cantidad que se necesitara se realizaba en matraces erlenmeyer de 250 ml y Fernbach de 2500 ml con la tercera parte de su volúmen, ó en un fermentador de 14 lts, New Brunswick Scientific Co., Modelo 9-1410.

FIGURA 16 .

CURVA PATRON DE LACTOSA DETERMINADA POR DNS



2. Parámetros.

Temperatura	37°C
Tiempo	24 horas
pH (antes de esterilizar)	7.3
Aereación	1 vvm
Agitación para matraces	250 rpm.
agitación para fermentador	300 rpm.

3. El medio utilizado siempre fué el medio Luria cuya composición era:

Extracto de levadura	5 g
Bacto triptona	10 g
Cloruro de sodio	10 g
pH	7.3
Vitamina B ₁ al 0.05%	10 ml

4. Esterilización del medio. Esta se llevó a cabo en una autoclave de Amsco de México a 15 lb. de presión y 121°C en un intervalo de 20 a 25 minutos.

5. Inóculo. El inóculo siempre correspondió al 2% en volúmen y provenía de un cultivo crecido durante 12 hrs., en medio Luria, con lactosa al 10%.

6. La cosecha de las células se hizo en una centrífuga Sorvall RC-5B refrigerada y en un rotor GSA con 6 compartimientos para botellas de 250 ml, a 10,000 rpm. durante 15 minutos. Se eliminaba el sobrenadante y el paquete celular se almacenaba a 4°C.

* Determinación de células de E.coli con β -galactosidasa constitutiva.

4.2.6 Método.

X-gal (Miller et. al. 1974)

Fundamento:

El compuesto 5 bromo, 4 cloro, 3 indolil β -D galactosido (X-gal) permite diferenciar cepas de E.coli β -galactosidasa constitutivas, de no consti-

tutivas. El X-gal no es inductor del operón lac, en solución es incoloro, pero al ser hidrolizado por la β -galactosidasa libera el compuesto 5 bromo-4 cloro indigo (azúl intenso), el cual nos indica cepas constitutivas de dicha enzima, en tanto que, las células que no son constitutivas de dicha enzima no son capaces de hidrolizar este compuesto.

Reactivos.

Dextrosa	Q.P.	(Baker)
Fosfato de potasio monobásico		(Baker)
Fosfato de sodio dibásico	Q.P.	(Baker)
Cloruro de amonio	Q.P.	(Baker)
Sulfato de magnesio	Q.P.	(Baker)
Dimetil sulfóxido	Q.P.	(Baker)
X-gal		(Sigma)
Agar		(Difco)
Medio de Mc Conkey		(Difco)
Cloruro de calcio		

Preparación.

- Medio mínimo.	g lt ⁻¹
NH ₄ Cl	1
KH ₂ PO ₄	3
Na ₂ HPO ₄	7
CaCl ₂	1.11 x 10 ⁻²
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.46 x 10 ⁻¹
Dextrosa	8
Agar	15
Agua	cbp 1000 ml

Disolver todas las sustancias, aforar y ajustar pH a 7.3

- X-gal.- Pesar 40 µg de X-gal en un vial, irradiar este compuesto antes de disolverlo, con luz ultravioleta durante 15 minutos. Disolver en 2 ml de dimetilsulfóxido y agregar al medio cuando este tenga una temperatura de 45 a 50°C y finalmente homogenizar.

- Cajas Petri.- Vertir 20 ml de medio X-gal en cada caja Petri.

Procedimiento.

- a) De un sland de E.coli CSH-36 tomar una asada y sembrar por estría en cajas Petri conteniendo medio McConkey.
- b) Incubar a 37°C en un período de 24 horas
- c) Las colonias aisladas que producen una coloración roja se siembran por picadura en cajas con medio mínimo X-gal.
- d) Incubar a 37°C durante 24 horas.
- e) Las colonias que producen coloración azul intensa son las cepas constitutivas.
- f) Conservar éstas cepas en glicerol.

Procedimiento para determinar que las células no se salen del soporte.

- a) Lavar el biocatalizador muy bien con buffer estéril y depositarlo en un matraz erlenmeyer de 250 ml con buffer estéril.
- b) Mantener en agitación 300 rpm y 37°C durante 48 horas
- c) Tomar alfcuotas de 100 µl cada determinado tiempo y platear en cajas de medio mínimo X-gal.
- d) Si las células se salen del soporte darán la clásica coloración azul si no no la producen.

Inmovilización de células completas de E.coli en carragenina.

4.2.7 Método.

Atrapamiento en carragenina (Tosa et. al., 1979).

Fundamento.

Se basa, ya sea en confinar enzimas o células en una matriz polimérica o en encapsular éstas en una membrana semipermeable. Al inmovilizar por éste método las enzimas o células no reaccionan con el soporte, pues solo quedan atrapadas. (Figura 4).

Reactivos:

Cloruro de sodio	Q.P.	(Baker)
Cloruro de potasio	Q.P.	(Baker)
Glicerol	Q.P.	(Baker)
Fosfato de potasio monobásico	Q.P.	(Baker)
Fosfato de potasio dibásico	Q.P.	(Baker)
Etilendiamina	Q.P.	(Baker)
Glutaraldehido	Q.P.	(Merck)
Kappa carragenina		(Proveedor Francés)
Células de <u>E.coli</u> CSH-36		

Preparación:

- Solución fisiológica
Disolver 9 g. de cloruro de sodio en 100 ml de agua destilada y aforar a 100 ml.
- Solución de KCl (0.3M) en glicerol al 50%
Pesar 22.2 g de cloruro de potasio, disolver en 300 ml de agua destilada, adicionar 500 ml de glicerol, mezclar y aforar a 1000 ml con agua destilada.
- Solución de curtido
Mezclar 26.248 g de fosfato de potasio monobásico, 53.406 g de fosfato de potasio dibásico, 22.2 g de cloruro de potasio y 0.085 M de etilendiamina, disolver y ajustar el pH a 7 y aforar a 1000 ml con agua destilada.

- Solución de curtido

Mezclar 26,248 g de fosfato de potasio monobásico, 53,406 g de fosfato de potasio dibásico, 22.2 g de cloruro de potasio y 0.085M de etilendiamina, disolver y ajustar el pH a 7 y aforar a 1000 ml con agua destilada.

Procedimiento para la inmovilización de células de E.coli en carragenina.

- a) Se disuelven 3,4 g de carragenina Kappa en 68 ml de solución fisiológica a 65°C
- b) Ya disuelta la carragenina se deja reposar y se espera a que la temperatura baje a 55°C
- c) Por otro lado, se suspenden las células microbianas en solución fisiológica a un volumen de 32 ml.
- d) Se mezclan la carragenina y la suspensión de células a 50°C \pm 2°C
- e) La mezcla se extruye por goteo.
- f) Recibir las gotas en solución de KCl 0.30M en glicerol al 50% a 10-4°C con agitación.

Procedimiento para cutir carragenina con células de E.coli

- i) Se pesan 100 g (peso húmedo) de biocatalizador (carragenina-células)
- ii) Suspender el biocatalizador en 250 ml, de la mezcla de buffer de fosfatos 0.5M, KCl 0.3M y etilendiamina 0.085M a 4°C
- iii) Mantener en agitación por 5 minutos
- iv) Añadir glutaraldehido hasta alcanzar una concentración final de 2.0% (p/v).

v) Dejar todo lo anterior en agitación durante 30 minutos.

vi) Lavar el biocatalizador con KCl 0.3M

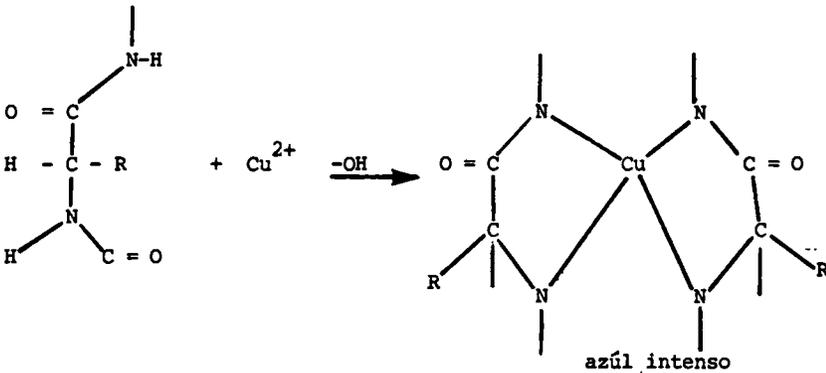
Determinación de Proteína.

4.2.8. Método Lowry (Lowry et.al. 1951).

Es uno de los métodos más sensibles (0-200 µg/ml de diproteína), siendo 10 veces mas sensible que el de Biuret.

Fundamento.

Método colorimétrico.- La coloración final es el resultado de una reacción de Biuret; de la proteína con el ión Cu^{2+} en medio alcalino y una reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotungstico por la tirosina y el triptofano de la proteína.



Reactivos.

Sulfato de cobre pentahidratado	Q.P.	(Baker)
Carbonato de sodio	Q.P.	(Baker)
Hidróxido de sodio	Q.P.	(Baker)
Tartrato de sodio y potasio	Q.P.	(Baker)
Folin	Q.P.	(Merck)

Preparación.

- Solución A.- Pesar 2 g de Na_2CO_3 y aforar a 100 ml con NaOH 0.1N
- Solución B.- Pesar 0.5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y aforar a 100 ml con agua destilada
- Solución C.- Pesar 1 g de tartrato de sodio y potasio, aforar a 100 ml con agua destilada.
- Solución D.- Mezclar partes iguales de solución C y solución B.
- Solución E.- Tomar 1 ml de la mezcla D y agregar a 50 ml de la solución. Desechar después de 24 horas.
- Reactivo de Folin: Diluir 1:2 con agua destilada antes de usar este reactivo.

Procedimiento.

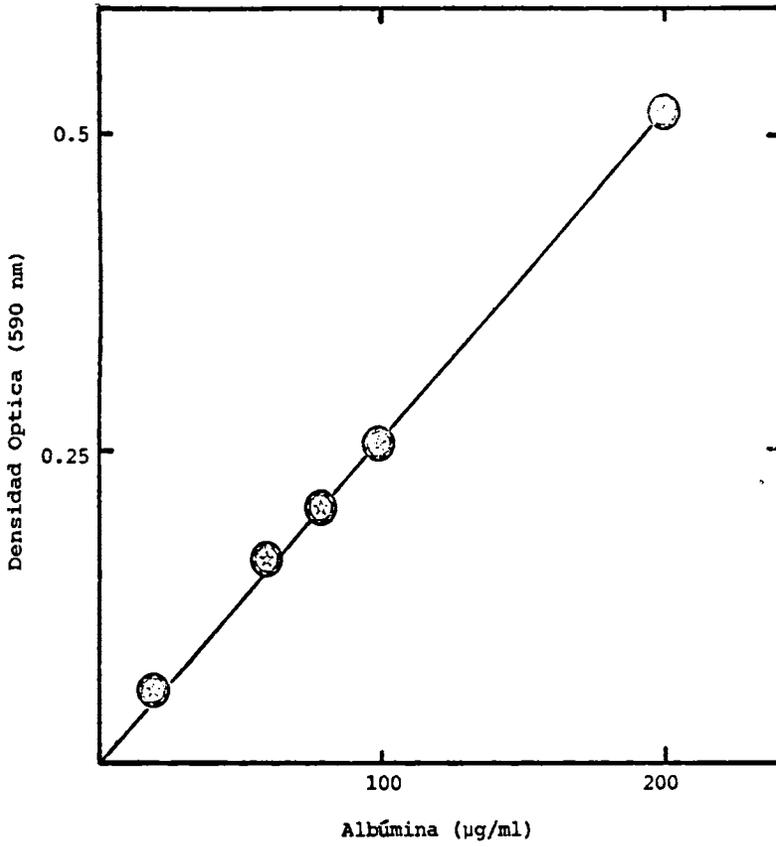
1. Tomar 1 ml de muestra y añadir 5 ml de la solución E, agitar y reposar 10 minutos.
2. Añadir 0.5 ml del reactivo de Folin, diluido, agitar y reposar 30 minutos.
3. Leer a 590 nm, extrapolar en la curva estándar la D.O.
4. La curva estándar se prepara a diferentes concentraciones de albúmina, 0-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Graficar D.O. v.s. μg de albúmina/ml.(figura 17).

Procedimiento para determinación de proteína en células de E.coli

Tomar 0.01 ml de la suspensión de células y aforar a 1 ml con agua destilada, seguir procedimiento anterior.

FIGURA 17 .

CURVA ESTANDAR DE PROTEINA



Procedimiento para determinar la posible actividad proteolítica de las células inmovilizadas.

- Lavar 10 g de biocatalizador por lo menos 10 veces con buffer estéril
- Adicionar a 100 ml de solución de albúmina al 10% los 10 g de biocatalizador manteniendo en condiciones de esterilidad la mezcla.
- Incubar con agitación a 37°C durante 24 horas
- Después de éste tiempo, separar el biocatalizador y precipitar la proteína con ácido tricloroacético.
- Centrifugar 10 ml y al sobrenadante determinarle proteína siguiendo el procedimiento anterior.

V. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.1 Caracterización parcial del microorganismo.

El primer punto a tratar, era el constatar que la cepa disponible de E. coli (CSH - 36) era β -galactosidasa constitutiva. Para ello se recurrió a la técnica de X-gal, descrita en metodología, la cual nos muestra la constitutividad de la cepa.

De las 100 colonias de esta cepa que fueron plateadas, las 100 resultaron ser β -galactosidasa constitutivas (fig. 18) con lo que se comprobó que la cepa de trabajo es en efecto constitutiva.

Una vez verificado este punto se procedió a caracterizar cinéticamente el crecimiento del microorganismo y a la vez a determinar la curva estándar de peso seco en función de la densidad óptica del cultivo para las células en cualquier fase del crecimiento. Estos aspectos se ilustran en las figuras 19 y 20.

Del análisis de los resultados obtenidos se dedujo una velocidad específica de crecimiento para la cepa de E. coli (CSH - 36) igual a $0,11 \text{ hr}^{-1}$, así como la siguiente ecuación:

$$\text{Peso seco (mg células/ml)} = \frac{D_{0,560 \text{ nm}} + 0,015}{188,68}$$

que se relaciona la concentración de células en suspensión, con el valor de la absorbancia que presenta la misma suspen-

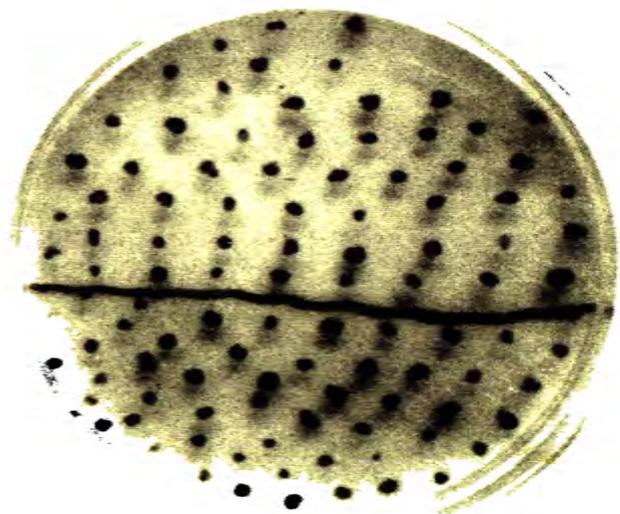


FIGURA 18. Células de E. coli - galactosidasa constitutivas, se sabe esto ya que todas las colonias plateadas, al crecer degradan el X-gal generando el color azul intenso indicador de células constitutivas de esta enzima.

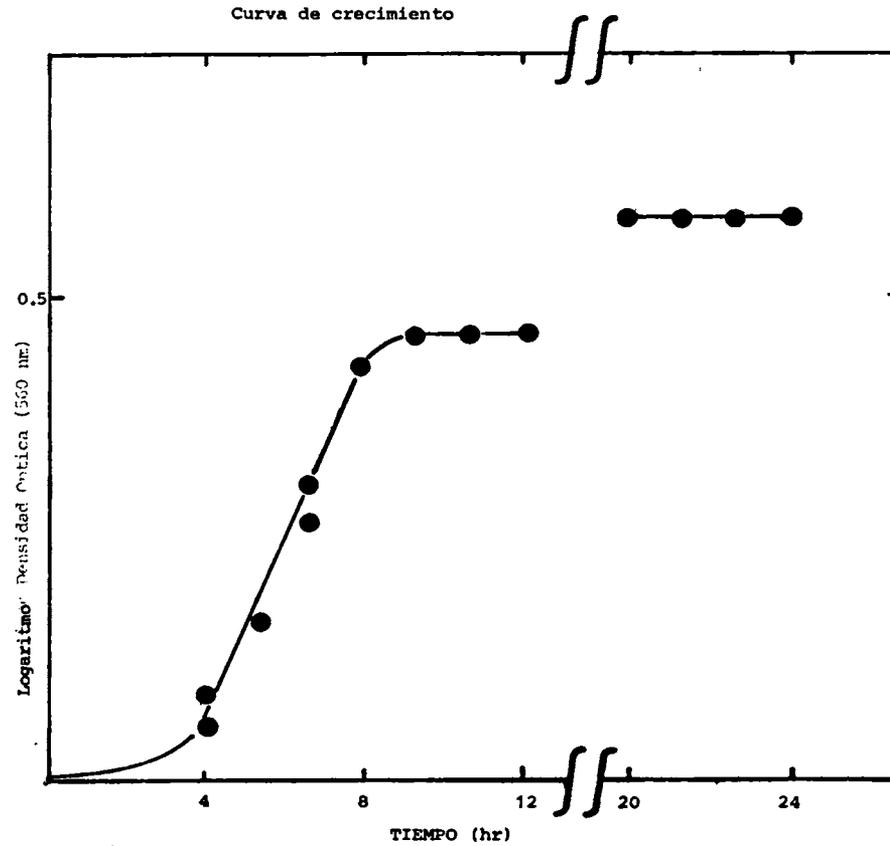


FIGURA 19. Crecimiento de células de *Escherichia coli* CSH-36 en medio Luria a 37°C y 200 rpm. La velocidad de crecimiento fue de 0.11 hrs.⁻¹

Curva estandar de Peso Seco de E.coli CSH-36

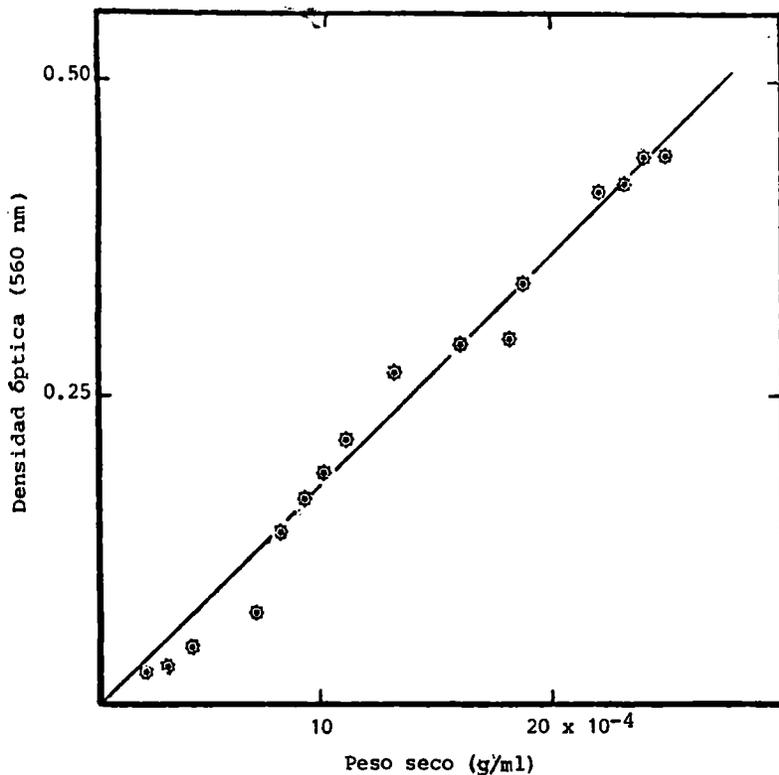


FIGURA 20. Esta gráfica se construyó con los datos obtenidos de la curva de crecimiento j , cada hora se tomaron muestras de 1 ml y se filtraron en membranas Millipore las cuales se pusieron previamente a peso constante y se pesan nuevamente hasta peso constante a $80^{\circ}C$.

sión a 560 nm.

Una vez cuantificados los parámetros anteriores, es posible iniciar la determinación de las variables necesarias para la caracterización de la enzima β -galactosidasa contenida en células completas de E. coli, actividad que será expresada en lo subsecuente en μM de producto producido por minuto por mg de células.

Prevía caracterización de la enzima, se procedió a determinar la actividad por mg de células usando lactosa como sustrato y observar el comportamiento seguido por la actividad en función de la concentración de la enzima. Para ello se creció el microorganismo hasta alcanzar una D.O. de 4.3 y se cosecharon las células. Teniendo el paquete celular se prepararon paquetes variando la concentración de células y se midió la actividad enzimática. Los resultados se presentan en la figura 21, de los cuales se deduce una actividad específica de 0.5515 μM de glucosa por minuto por mg de células a pH 7.0, 37°C y una concentración de lactosa inicial de 4.5%.

5.2 Caracterización cinética de la β -galactosidasa contenida en células de E. coli.

5.2.1 Perfil de pH

Dicha caracterización se inició determinando el perfil de pH. El intervalo de pH estudiado fue de 5 a 11. La figura 22 presenta el perfil de pH-actividad obtenido,

Curva de Actividad por mg de células de E.coli CSH-36

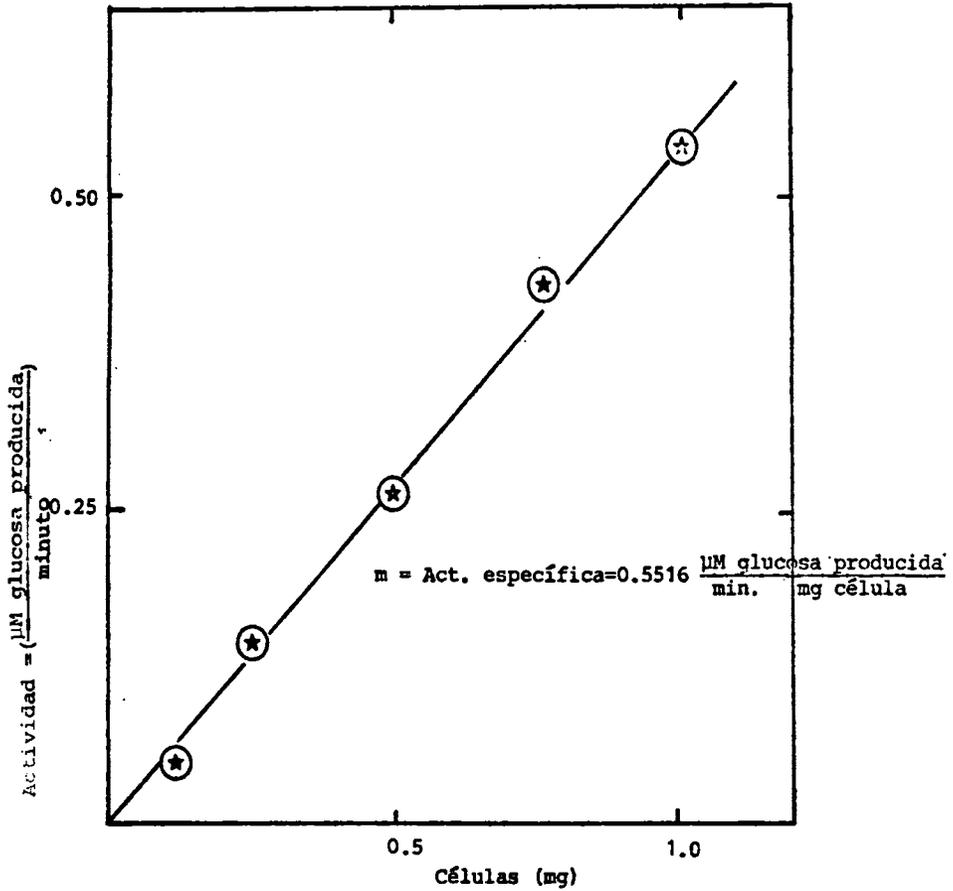


FIGURA 21. Para determinar la actividad específica $\left(\frac{\mu\text{M glucosa producida}}{\text{min. mg. células}}\right)$ de las células de E.coli CSH-36, se varió la cantidad de células en la mezcla de reacción a partir de 0.125 mg de células/ml hasta 1.016 mg células/ml, con una concentración de lactosa de 4.5% (concentración en la mezcla de reacción), pH 7.0, 37°C durante 15 minutos tomando alícuota cada 5 min.

PERFIL DE pH DE CELULAS LIBRES

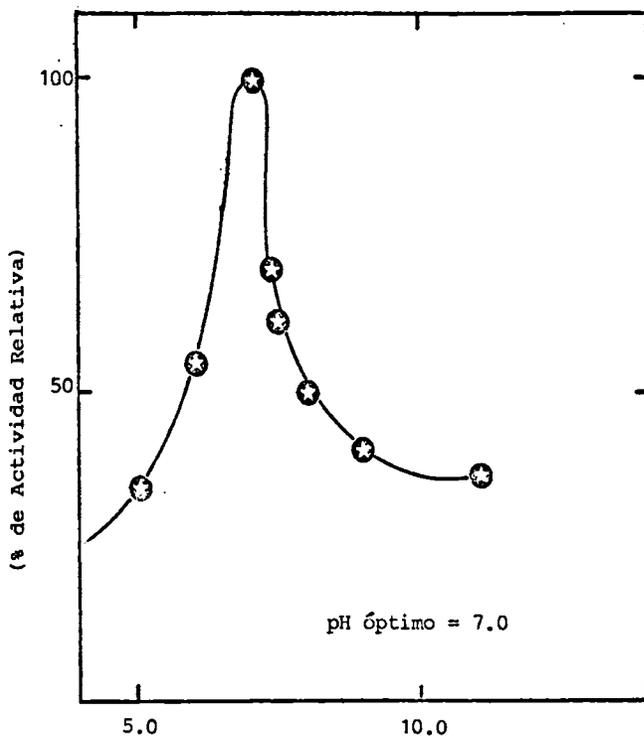


FIGURA 22. Efecto del pH en la actividad β -galactosidasa de células libres de *E.coli* usando ONPG como sustrato a 37°C en buffer de fosfatos 0.1M. La actividad máxima fue tomada como 100%.

que es comparable con los perfiles de actividad para la β -galactosidasa aislada de otras cepas de E. coli o bien con respecto a la actividad medida en células completas (tabla 5).

El pH óptimo de actividad β -galactosidasa de las células de E. coli (CSH - 36) resulta ser de 7.0.

5.2.2 Temperatura óptima y termoestabilidad.

Los siguientes estudios se encaminaron a determinar la temperatura óptima de actividad β -galactosidasa. En base a los resultados obtenidos se determinó la energía de activación y se efectuó un estudio de termoestabilidad durante el almacenamiento de la enzima en células completas.

El intervalo de temperatura que se usó para determinar el perfil de temperatura-actividad fue de 20° a 60°C y las temperaturas a las que se hizo la determinación de estabilidad de almacenamiento fueron 4°, 29° y 55°C.

El perfil de temperatura-actividad que sigue la β -galactosidasa se presenta en la figura 23 pudiendo observarse que la temperatura óptima de actividad es 55°C en buffer de fosfatos 0.1M pH 7.0. Este perfil es comparable al reportado para la enzima pura y para la enzima contenida en células con actividad β -galactosidasa de diferentes cepas de E. coli, así también como el valor de tempera-

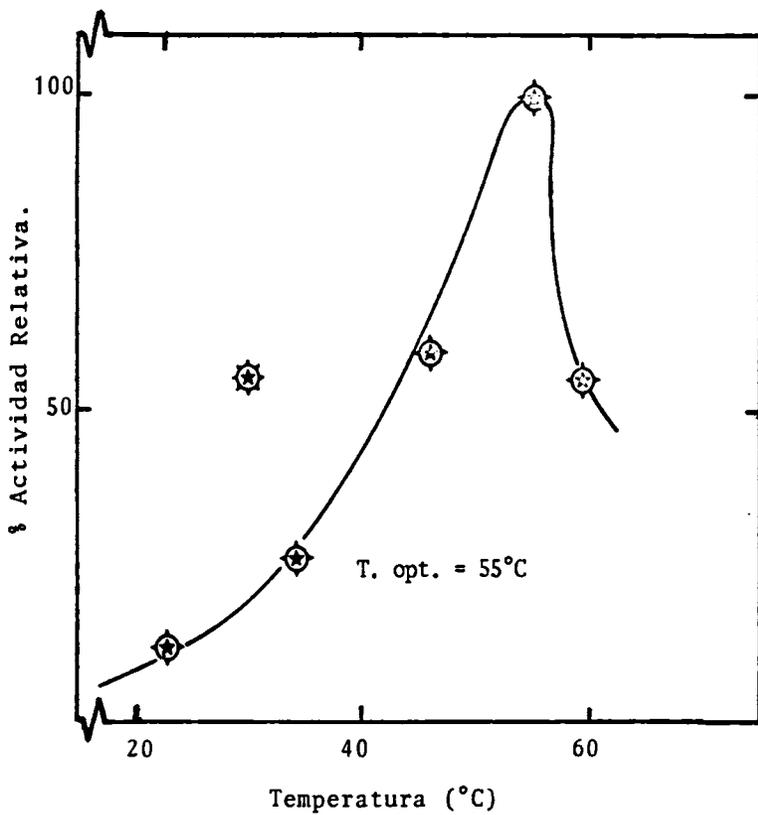


FIGURA 23. Efecto de la temperatura en la actividad β -galactosidasa de *E.coli* a pH 7.0 en buffer de fosfatos 0.1M, respecto a lactosa. La máxima actividad fue tomada como 100%.

tura óptimo encontrado (tabla 5).

Si comparamos este resultado con los perfiles de temperatura de la enzima proveniente de levadura, vemos que la enzima de E. coli presenta actividad a temperaturas superiores que la enzima de levadura, lo que probablemente resulte en una mayor estabilidad (32, 35).

En lo referente a estabilidad de almacenamiento, se observó que la enzima en las células libres no pierde actividad, sino hasta después de 90 días, almacenando el paquete celular a 29°C, en tanto que almacenando el paquete celular a 55°C se encontró una vida media, para la enzima de 24 horas, estos resultados se presentan en las figuras 24 y 25.

Un resultado sorprendente fue el que se obtuvo en el almacenamiento a 4°C (figura 25), pues conforme transcurría el tiempo, la actividad se incrementaba, así entonces al final de 120 días de almacenamiento a esta temperatura, se encontró 163% de actividad con respecto a la original. Es probable que esto se deba a que al determinar actividad específica referida a mg de células no se mide la expresión total de la actividad enzimática debido a que el sustrato ve limitado su transporte por la presencia de una barrera difusional creada por la existencia de la pared celular y la membrana citoplásmica intactas. Por otro lado, durante el almacenamiento

Termoestabilidad en almacenamiento de células libres de
E.coli CSH - 36.

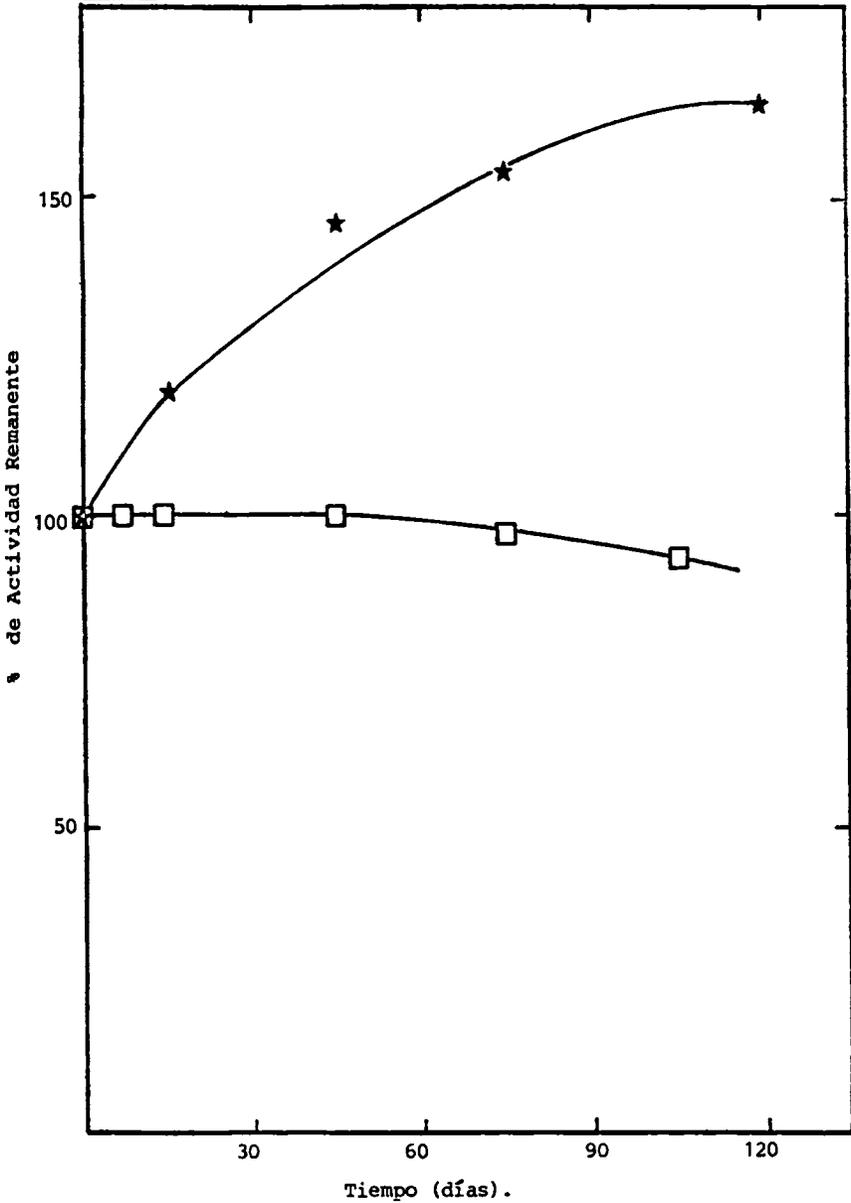


FIGURA 24. La termoestabilidad en almacenamiento fue determinada a paquetes celulares a (★)4°C y (□)29°C, a diferentes intervalos de tiempo se tomaban dos muestras y se resuspendieron en buffer de fosfatos 0.1M pH y se les determinaba actividad a 37°C usando ONPG como sustrato.

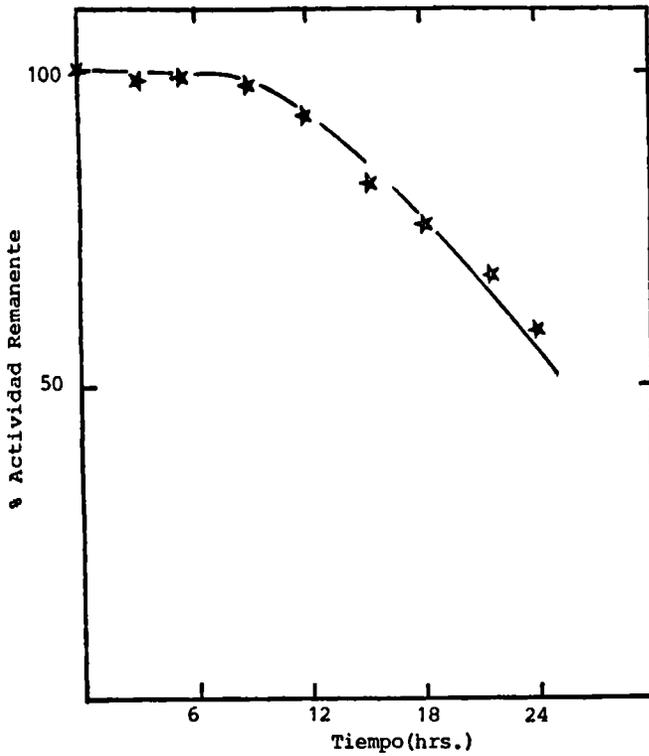


FIGURA 25. Termoestabilidad a 55°C de β -galactosidasa contenida en células de *E.coli* a pH 7. en buffer de fosfatos 0.1M, las células se mantuvieron a 55°C y cada hora se tomó alícuota y se determinó la actividad usando ONPG como sustrato, a 37°C y buffer de fosfatos pH 7.

a esta temperatura, es posible una ruptura paulatina debida a la formación de cristales en su estructura interna.

El efecto de esta barrera difusional puede ser cuantificado por el incremento en actividad después de lisar las células. Los resultados de este experimento se presentan más adelante.

Si la hipótesis anterior se cumple, no sería conveniente inmovilizar las células después de un largo período de almacenamiento a 4°C, ya que en nuestro paquete celular la enzima estaría expuesta de tal forma que no se lograría retener con este tipo de inmovilización, y así inmovilizaríamos células con menor actividad, perdiéndose los objetivos originales de inmovilizar células y no enzimas. Por otro lado, es evidente que el sistema de células inmovilizadas presentará severas limitaciones difusionales que deberán ser tomadas en cuenta en el diseño del sistema de reacción.

Para la determinación de la energía aparente de activación se graficaron los resultados del perfil de temperatura-actividad en una relación de acuerdo a la ecuación de Arrhenius ($\log V_i$ vs $1/T$; V_i = velocidad inicial, T = temperatura en °K) estos resultados son presentados en la figura 26.

Energía de activación para la hidrólisis de lactosa por células libres de E.coli.

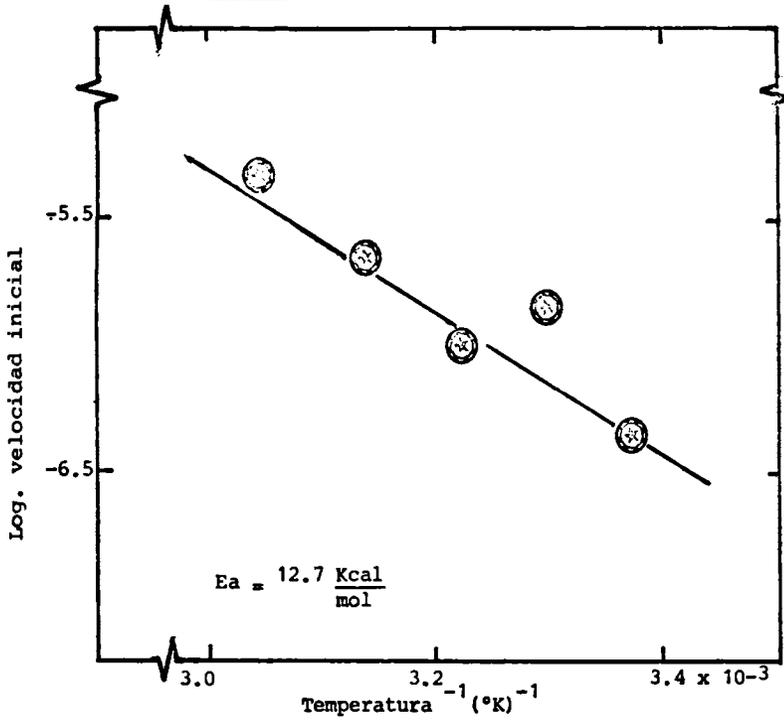


FIGURA 26. Energía de activación para la hidrólisis de lactosa por células libres de E.coli. La reacción se realizó en buffer de fosfatos 0.1M. pH 7.0 a diversas temperaturas. La pendiente de la recta es igual a $-E_a/Rt$, de donde se despeja E_a para obtener su valor.

La energía aparente de activación (E_a) para la reacción de hidrólisis de la β -galactosidasa de E. coli fue calculada a partir de la pendiente de la línea de la figura 26, la E_a obtenida para la hidrólisis de lactosa fue de 12.7 Kcal/mol. Sharp et al., reportan un valor de 15.2 Kcal/mol para la β -galactosidasa pura de E. coli (K-12). La diferencia que se presenta entre el sistema de células completas con respecto a la enzima pura puede ser debido a restricciones difusionales internas que se manifiestan por una disminución en la energía de activación aparente para la reacción y se espera una mayor influencia en la actividad de las células inmovilizadas (61).

5.2.3 Efecto de diversos iones en la actividad

β -galactosidasa de células completas de E. coli,

Con el fin de detectar el efecto que podrían tener sobre la actividad enzimática los iones contenidos en mayor concentración, en la leche, se probaron diferentes concentraciones de Na^+ , K^+ , Mg^{++} y Ca^{++} , así como una mezcla de ellos con una concentración superior a la que se encuentra en la leche. Estos resultados son presentados en la Tabla 14. Comparando estos resultados con lo reportado en la literatura (12, 62) se puede concluir que estos resultados son diferentes a lo establecido para la β -galactosidasa de diferentes cepas de E. coli en la presencia de los iones Na, K y Mg, ya que se ha reporta-

TABLA 14. Efecto de varias sales en la Actividad Galactosidasa de células completas de E.coli CSH-36 libres.

SAL	mM	ACTIVIDAD RELATIVA
		ONPG
0	0	1
Mg Cl ₂	5	1
	10	1
	30	1
	100	1
	100	1
Ca Cl ₂	10	0.92
	30	0.84
Na Cl	10	1
	30	1
	100	1
K Cl	10	1
	40	1
	100	1
MEZCLA DE IONES		
Mg Cl ₂	30	
Ca Cl ₂	30	
Na Cl	30	0.96
K Cl	40	

ACTIVIDAD COMPARADA EN BUFFER DE FOSFATO DE SODIO 0,1M, pH7,3 y 37°C

do que funcionan como potenciadores de la actividad enzimática; en el presente trabajo no se observa tal efecto. Por otro lado, el ión Ca tiene un efecto inhibitorio que concuerda con los resultados reportados por otros investigadores.

5.2.4 Determinación de las constantes cinéticas.

Con la información obtenida es posible iniciar la determinación de las constantes cinéticas de la enzima. Para ello se usaron tanto el sustrato sintético (ONPG) como el natural (Lactosa). Es necesario redefinir la actividad enzimática como μM de ONPG o lactosa hidrolizados a ONP y galactosa o glucosa y galactosa respectivamente por minuto por mg de células a pH 7.0 y 37°C.

La determinación de K_m y V_{max} (parámetros del modelo de Michaelis-Menten) se efectuó aplicando la representación de Lineaweaver-Burk para ambos sustratos.

Se encontró que la enzima obedece una cinética simple de Michaelis-Menten respecto a ambos sustratos, como se demuestra por las rectas obtenidas de las gráficas de doble recíproco (figs. 27 y 28). Un K_m de 1.822 mM y una V_{max} igual a 1.061 μM por minuto por mg de células son obtenidos usando ONPG como sustrato en concentraciones de 0.5 mM a 2.25 mM a pH 7.0 y 37°C. Al comparar estos resultados con los reportados en la literatura y resumidos en la tabla 7, se puede observar que el K_m

Efecto de la concentración de sustrato en la actividad β -galactosidasa de células libres de E.coli CSH-36 usando sustrato sintético.

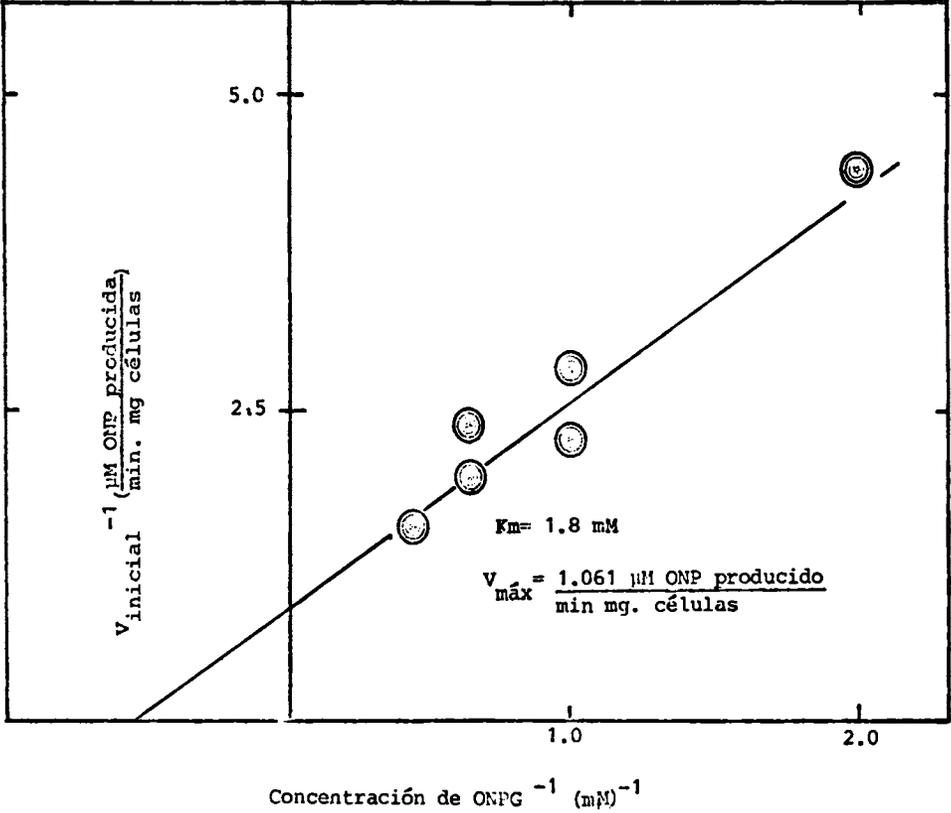


FIGURA 27. Gráfica de Lineaweaver-Burk para β -galactosidasa de células de E.coli libres, actividad medida en buffer de fosfatos 0.1M, pH 7 y 37°C.

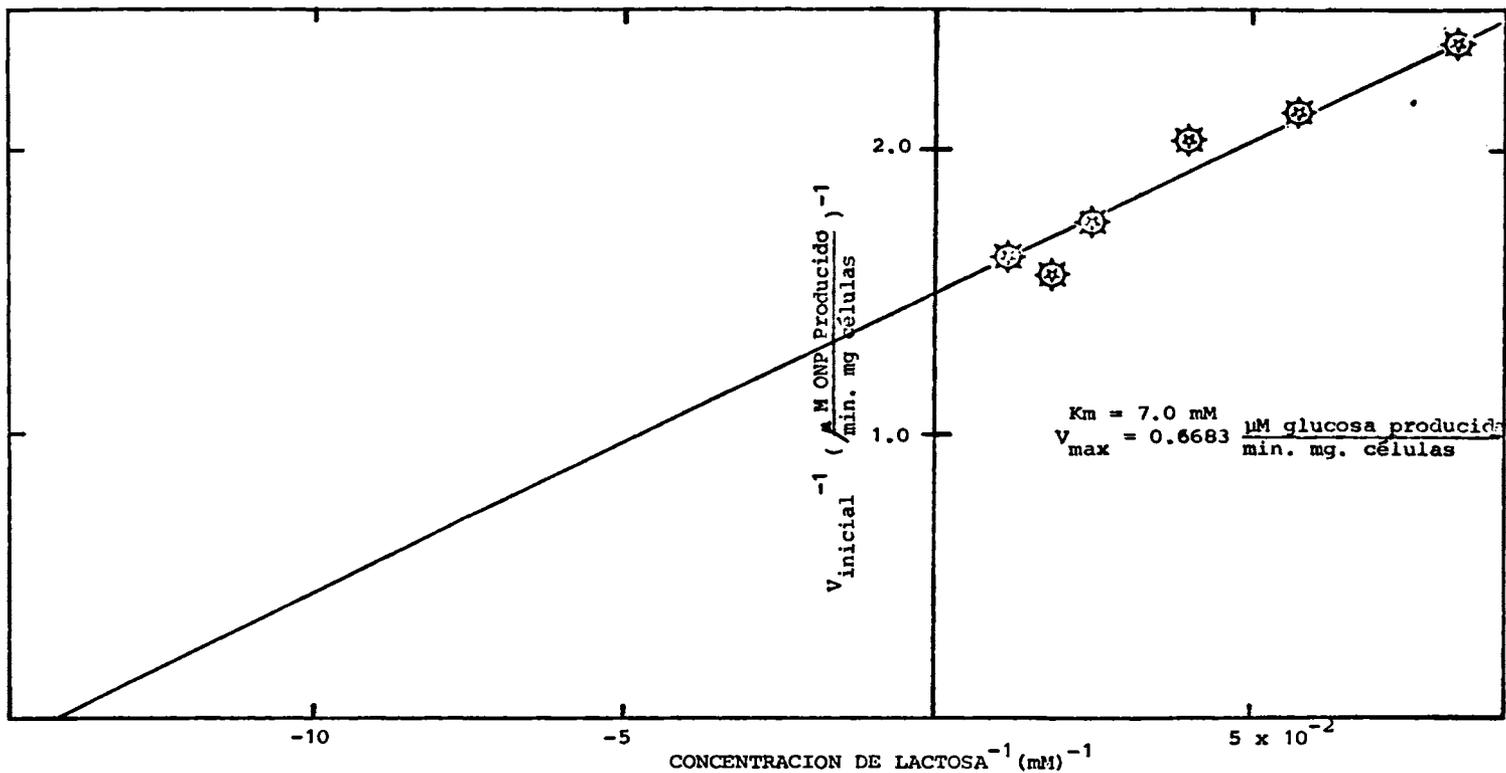


FIGURA 28. Efecto de la concentración de sustrato en la actividad β -galactosidasa de células libres de E.coli usando soluciones de lactosa como sustrato, en buffer de fosfatos 0.1M, pH 7.0 y 37°C.

obtenido para las células completas con actividad β -galactosidasa es un orden de magnitud mayor al reportado en esta tabla. La explicación más lógica es que el medido es un K_m aparente de la enzima, pues aquí nuevamente intervienen efectos difusionales intrínsecos de las células, siendo por ello que el K_m es mayor con respecto al K_m de la enzima pura. En cuanto al K_m de células en ONPG reportado por Pêtre et al., (2.7 mM) observamos que el obtenido en este trabajo es del mismo orden de magnitud. Esto confirma que para poder comparar con la enzima pura se debe considerar que la cinética de las células es más compleja que la correspondiente a la enzima pura, debido a los efectos difusionales que entran en juego.

Por otro lado, en el caso de lactosa, en concentraciones que oscilan entre 15 y 80 mM se obtuvo un K_m y V_{max} de 7.0 mM y 0.6684 μM glucosa producida minuto^{-1} , mg células^{-1} . Estos resultados al ser comparados con los reportados en la tabla 15, específicamente con los de Ohmiya et. al., que emplea igualmente células completas, resultan ser del mismo orden de magnitud, sin embargo si los comparamos con los encontrados para la enzima libre se encuentra que esta última es más afin que la enzima contenida en células completas, por las razones antes expuestas.

TABLA 15. Comparación del Km y Vmax obtenido experimentalmente tanto en sistema soluble como inmovilizado con los encontrados en la literatura respecto a lactosa.

Fuente de la enzima	V máx ⁻¹ mM min ⁻¹ mg enz ⁻¹ δ biocat.	Km(mM lact)	pH	T°C	Ref.
<u>E.coli E 106</u>					
Cél. inmovilizadas	7.5 x 10 ⁻⁷	5.4	6.5	30°	Ohmiga <u>et.al.</u>
Cél. libres	1.1 x 10 ⁻³	5.4			
<u>L.bulgaricus</u>					
Cél. inmovilizadas	0.29 x 10 ⁻²	4.2	6.5	30°	Ohmiga <u>et.al.</u>
Cél. libres	1.3 x 10 ⁻²	4.2			
<u>K. lactis</u>					
Cél. inmovilizadas	0.83 x 10 ⁻³	30	6.5	30°	Ohmiga <u>et.al.</u>
Cél. libres	0.33 x 10 ⁻³	30			
<u>E.coli ATCC 26</u>					
Enz. inmovilizadas	0.24 x 10 ⁻³	4.1	6.8	37	Wondolowski <u>et.al.</u>
Enz. libres	0.26 x 10 ⁻³	4.5			
<u>E.coli</u>					
Enz. libre	-	4.7	7	20	Morisi <u>et.al.</u>
<u>E.coli ML-308</u>					
Enzima libre	0.59 x 10 ⁻³	0.625	-	25	Sharp <u>et.al.</u>
Enz. inmovilizada	0.045 x 10 ⁻³	1.2			
<u>E.coli</u>					
Cél. inmovilizadas	3.1 x 10 ⁻³	2.9	-	-	Toda K.
<u>E.coli CSH-36</u>					
Cél. libres	0.6683 x 10 ⁻³	7.0	7	37°	Canales <u>et.al.</u>
Cél. inmovilizadas	0.043 x 10 ⁻³	37.63			

5.2.5 Efecto de los productos de hidrólisis en la velocidad de reacción de la β -galactosidasa.

El posible efecto inhibitorio de la glucosa y la galactosa en la actividad β -galactosidasa en células libres de E. coli fue estudiado, usando ONPG como sustrato y con dos diferentes concentraciones de cada uno de estos compuestos (1.66 y 3.33 mM).

El efecto inhibitorio con el incremento en la concentración de inhibidor fue examinado a diferentes concentraciones de ONPG; v.g. la velocidad de reacción fue medida en presencia de una concentración de inhibidor variando la concentración de ONPG y graficando los recíprocos de la velocidad de reacción y de la concentración de sustrato.

La velocidad inicial de hidrólisis de ONPG por células de E. coli se ve disminuida con el incremento en la concentración de galactosa; al obtener los patrones de Lineaweaver-Burk (fig. 29), se puede apreciar una clara inhibición competitiva por la galactosa, siendo el valor de K_i estimado de 1.7 mM.

Los resultados obtenidos en la determinación del efecto de la glucosa en la actividad β -galactosidasa de este microorganismo revelan una inhibición acompetitiva, lo cual se deduce en la figura 30, a partir de la cual se

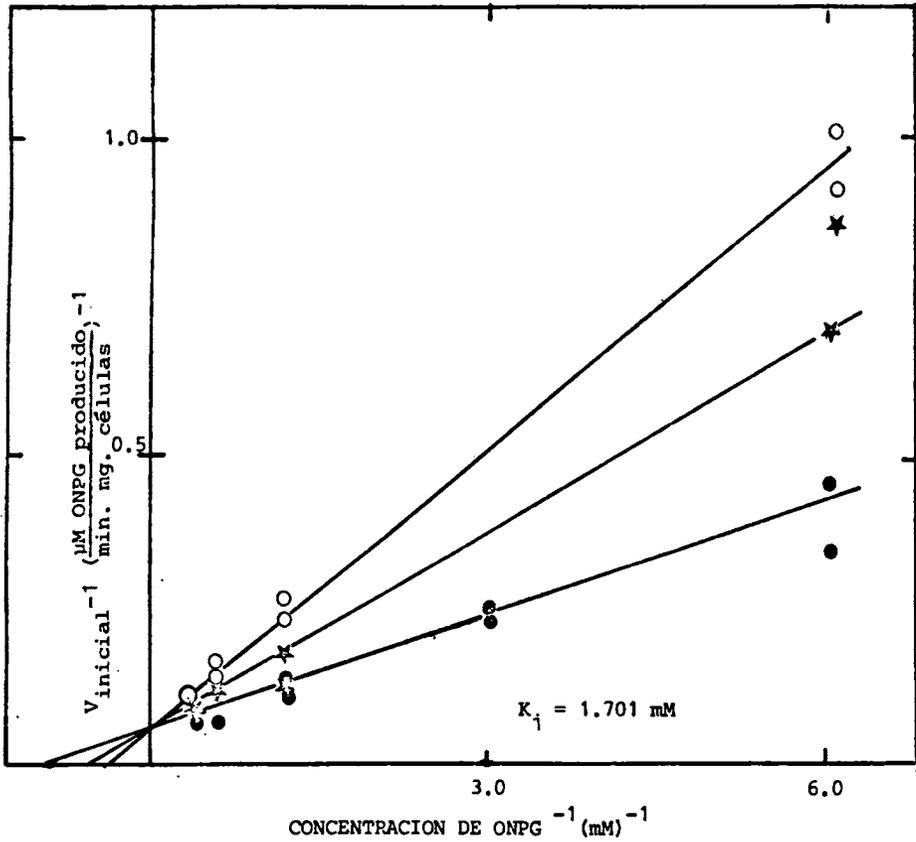


FIGURA 29. Gráfica de Lineaweaver-Burk para demostrar el efecto de la galactosa en la velocidad de hidrólisis de ONPG por células completas de *E.coli* con actividad β -galactosidasa, en buffer de fosfatos 0.1M, pH 7.0 y 37°C. Las concentraciones de galactosa fueron (mM por litro de mezcla de reacción): (●) 0 (★) 1.66 (○) 3.33, como se ve hay inhibición competitiva por galactosa.

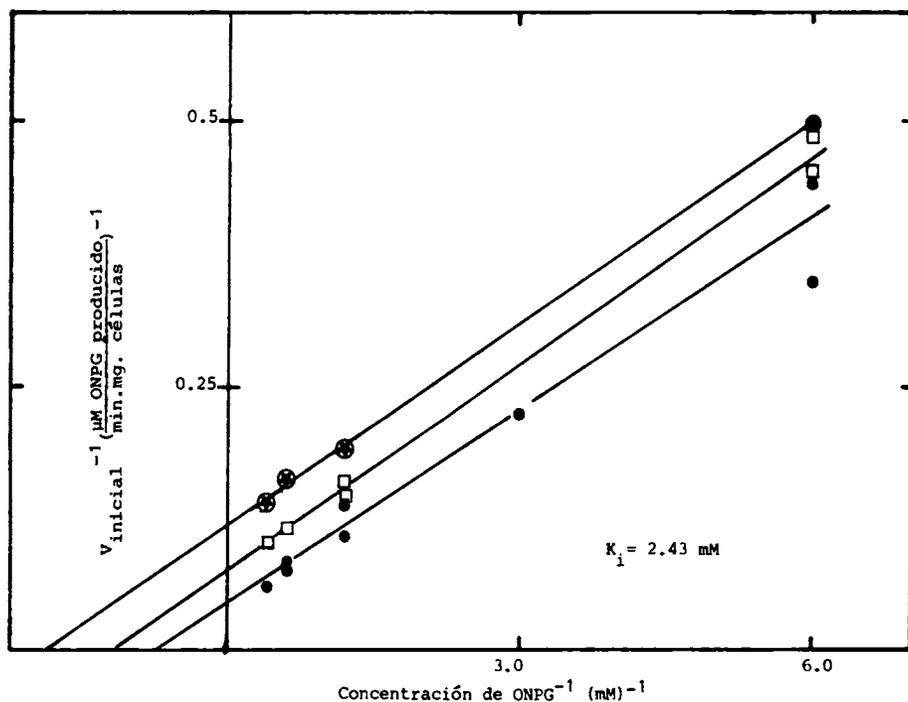


FIGURA 30. Gráfica de Lineaweaver-Burk para demostrar el efecto de la glucosa en la hidrólisis de ONPG por células completas de *E. coli*, con actividad β -galactosidasa, en buffer de fosfatos 0.1M, pH 7 t 37°C. Las concentraciones de glucosa fueron (mM por litro de mezcla de reacción): (●) 3.33; (□) 1.66; (○) 0. El patrón de inhibición seguido es el de una inhibición acompetitiva por glucosa.

obtienen los datos necesarios para el K_i que resulta de 2.43 mM.

Los resultados en la literatura a este respecto, son bastante contradictorios, situación que se ejemplifica en la tabla 9.

Una vez determinadas las constantes cinéticas que rigen la reacción de hidrólisis por la enzima contenida en las células de E. coli se procedió a seguir la evolución de la reacción de hidrólisis en una solución de lactosa al 4.5%, en donde con 14 mg de células (peso seco) se obtuvo una conversión del 60% a los 300 minutos de hidrólisis (fig. 31), siendo uno de los objetivos de este experimento el de encontrar un modelo de cinética enzimática que se ajustase a los resultados obtenidos.

Considerando que se operaba un reactor batch o intermitente, las ecuaciones de velocidad que gobiernan el comportamiento cinético de este sistema se obtienen de la integración de la ecuación de velocidad. Se probaron los siguientes modelos:

a) Michaelis-Menten

$$\frac{YmT}{Vs} = S_0X - K_m \ln (1-X)$$

que proviene de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_m + S} = -V_s \frac{ds}{dt}$$

donde la conversión (X), está definida como

$$X = \frac{S_0 - S}{S_0}$$

b) Inhibición competitiva por galactosa

$$\frac{V_{\max} t}{V_s} = S_t \left(1 - \frac{K_m}{aK_i} \right) (X_t - X_i) - K_m \left(1 + \frac{S_0}{aK_i} \right) \ln \left(\frac{1 - X_t}{1 - X_i} \right)$$

que resulta de la ecuación:

$$V = \frac{V_{\max} S}{S + K_m(1 + P/K_i)}$$

donde se define

$$X_t = \frac{S_t - S}{S_t}$$

S_t = concentración de sustrato equivalente a todo el producto que puede ser obtenido,

$$X_i = \frac{S_0 - S}{S_0}$$

$S_t = S_0 - S_{\text{final}}$

S_0 = Concentración inicial de sustrato

$$X_t = \frac{S_t - S_0(1 - X)}{S_t}$$

$$X_i = \frac{S_0 - S_t(1 - X_t)}{S_0}$$

inicial

$$X = 0$$

$$X_t = \frac{S_t - S_0}{S_t} = X_i$$

final

$$S = S_{eq} \quad X = \frac{S_0 - S_{eq}}{S_0} \quad x_t = \frac{S_t - S_{eq}}{S_t}$$

$$\frac{dS}{dt} = -S_0 \frac{dX}{dt} = S_t \frac{dx_t}{dt}$$

equivalencias:

$$S = S_0 (1-X) \quad S = S_t (1 - X_t) \quad a = 1.9$$

c). Modelo reversible



$$\frac{V_{max,t}}{V_s} = X_e S_t \left\{ \frac{K_m}{S_t} + (1-X_e) \right\} + \frac{K_m}{a K_r} X_e \ln \frac{X_e - X_i}{X_e - X_t} + \left\{ 1 + \frac{K_m}{a K_r} (X_t - X_i) \right\}$$

X_e - equilibrio

$$K_r = \frac{k_2 + k_3}{k_4} \quad K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad K_{eq} = \frac{k_1 k_3}{k_2 k_4} = \frac{[P]_{eq}}{[S]_{eq}}$$

Puesto que no se determinaron todas las constantes que aparecen en estos modelos, se realizó una investigación bibliográfica en cuanto a modelos, encontrándose la siguiente relación de constantes:



$$V_1 = k_3 E_t \quad V_2 = k_2 E_t$$

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad K_r = \frac{k_2 + k_3}{k_4} \quad K_{eq} = \frac{k_1 k_3}{k_2 k_4}$$

Modelo reversible	Woychik y Wondolosky	Este trabajo
Km (10.41)	0.03054	(6.156) 0.018 (2.394) 0.07 Moles/l
Kr (0.2875)	0.00084	(0.29) 0.00085 - (g/l ó mg/ml)
* Km	0.0305	0.1908
* Kr	0.00084	0.009015
* Keq	48.33	15.44

* de acuerdo a las definiciones de Km y Kr.

Contando con la relación de constantes se probaron cada uno de los modelos con los datos cinéticos obtenidos en esta tesis y se encontró que el modelo que mejor describía el comportamiento de nuestra enzima era el modelo reversible (fig. 31). Se puede apreciar que hay una ligera desviación pero esto sea debido a que se usaron los datos de la literatura en cuanto a valores de algunas constantes que no fueron determinadas en este trabajo. Un ajuste final de las constantes permitirá la descripción adecuada de los datos experimentales por este modelo.

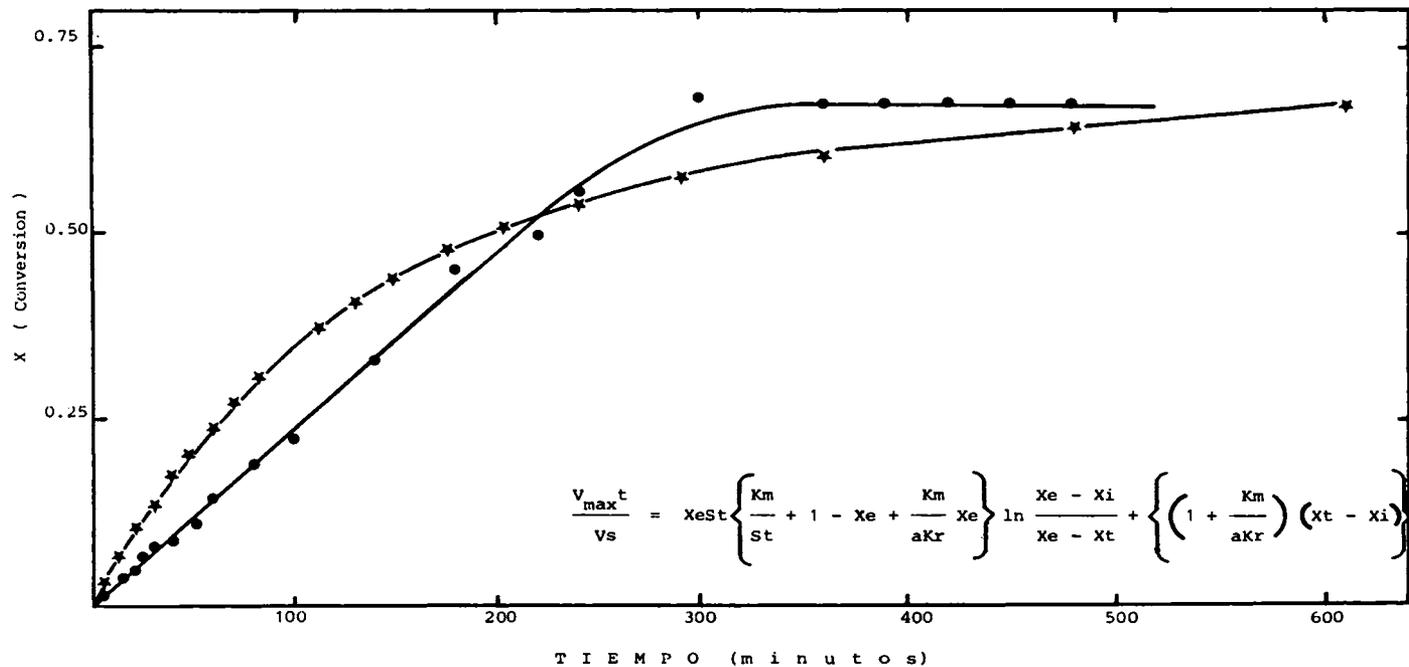


FIGURA 31. Aquí se presenta la cinética experimental de hidrólisis de lactosa por células libres (●) y la cinética teórica (*) hecha usando el modelo de cinética enzimática que más se ajusta a los resultados experimentales.

La reacción se llevó a cabo con una solución de lactosa cuya concentración por litro de mezcla de reacción era al 4.5%, a pH 7.0 en buffer de fosfatos 0.1 M y 37°C, la concentración de células fue de 0.28 mg/ml de mezcla de reacción.

En cuanto a los problemas difusionales en las células de E. coli se realizaron los siguientes experimentos para su cuantificación:

- a) Medición de la actividad a una suspensión de células.
- b) Sonicado de la suspensión de células y medición de la actividad del sonicado.

El resultado obtenido fue:

- Actividad en células completas = 0,822 U mg células⁻¹
- Actividad células sonicadas = 1,86 U mg células⁻¹

lo que se traduce en un factor de efectividad de:

$$\eta = \frac{\text{Actividad células completas}}{\text{Actividad células sonicadas}} = 0,4419$$

Esto demuestra que la velocidad de reacción en presencia de células completas es inferior a la velocidad de reacción que se observaría con la enzima contenida en las mismas, una vez liberada. Además con este resultado se explica el aumento de actividad en el almacenamiento a 4°C. Aún más, se demuestra que hay limitación en el transporte de sustrato a través de la membrana y pared celulares que modifican los resultados con respecto a la β -galactosidasa de E. coli de diferentes cepas, tanto en forma libre

como inmovilizada.

5.3 Inmovilización en carragenina

Antes de plantear los resultados en la parte de inmovilización, cabe mencionar que siendo el objetivo, obtener un biocatalizador en forma de perlas, se implemento un sistema de extrusión (fig. 32) con el cual se lograba obtener un producto semejante a una perla sin que ocurriese la gelificación de la carragenina en el interior del extrusor durante la elaboración del biocatalizador. Con este sistema se probaron diferentes diámetros a la salida de la cámara de extrusión (0.35 mm a 4.5 mm) encontrándose que conforme se reducía el diámetro, la forma que se obtenía, variaba desde fibras gruesas e inconsistentes hasta pequeñas gotas deformes, por lo que se decidió usar el menor diámetro.

Para resolver el problema de formación de perlas deformes al caer las gotas en solución de cloruro de potasio, se decidió gotear el gel en una solución de KCl-Glicerol, probando de este último diferentes concentraciones (10-60%). Esto es debido a que el glicerol al disminuir la tensión superficial del agua, permite que la gota al caer en la solución de KCl-Glicerol, gelifique uniformemente.

El resultado de este experimento fue la formación de perlas de forma adecuada hasta concentraciones de glicerol del 50%. A



FIGURA 32. Sistemas de extrusión empleados para elaborar el biocatalizador.

concentraciones mayores las gotas volvían a deformarse.

Una vez obtenidas las perlas se procedió a aplicar un proceso de curtido. Para este proceso se encontró que conforme se incrementa la concentración de glicerol de dureza de las perlas se incrementa proporcionalmente, fenómeno por el cual se decidió recibir el gel en KCl 0.3M-Glicerol al 50%. El diámetro promedio que se obtuvo en las perlas fue de 3mm tanto en el gel de carragenina como en el gel carragenina-células.

La inmovilización de las células se llevó a cabo por el método descrito por Tosa et. al. variándose en éste la concentración de glutaraldehído utilizada en el curtido según lo reportado por Casas T. con el fin de obtener una actividad enzimática adecuada, así como una buena estabilidad en el catalizador. Así se curtió con 0.085M de etilendiamina y una concentración de 2% (p/v) de glutaraldehído.

Por otra parte Tosa et. al., reporta que es posible inmovilizar 16 g de células (p.seco) en 3,4 g (p. seco). Con objeto de verificar esta capacidad de atrapamiento de la carragenina en nuestro sistema y probar su resistencia a la compresión, se inmovilizó la β -galactosidasa contenida en células de E. coli, variando la relación carragenina-células 1:1, 1:2, 1:2,5 y 1:5. Se curtieron y almacenaron en solución de KCl en refrigeración.

A cada relación se le determinó cualitativamente la resisten-

cia a la compresión, obteniendo los resultados que se presentan en la tabla 16.

TABLA 16.

DUREZA Y ELASTICIDAD DE DIFERENTES RELACIONES
DE CARRAGENINA - CELULAS

<u>RELACION</u>	<u>DUREZA</u>	<u>ELASTICIDAD</u>
1 : 1	++++	++++
1 : 2	+++	+++
1 : 2,5	+++	+++
1 : 5	++	-

++++ muy bueno

+++ bueno

++ regular

- malo

En base a estos resultados se decidió usar para la inmovilización de células la relación 1 : 1 de carragenina-células.

El paso subsecuente consistió en determinar la resistencia del biocatalizador a la agitación, para ello se colocó el biocatalizador en solución fisiológica a 37°C con agitación rotatoria de 350 rpm durante 13 días, al cabo de los cuales se observó el biocatalizador sin abrasión alguna (fig. 33),

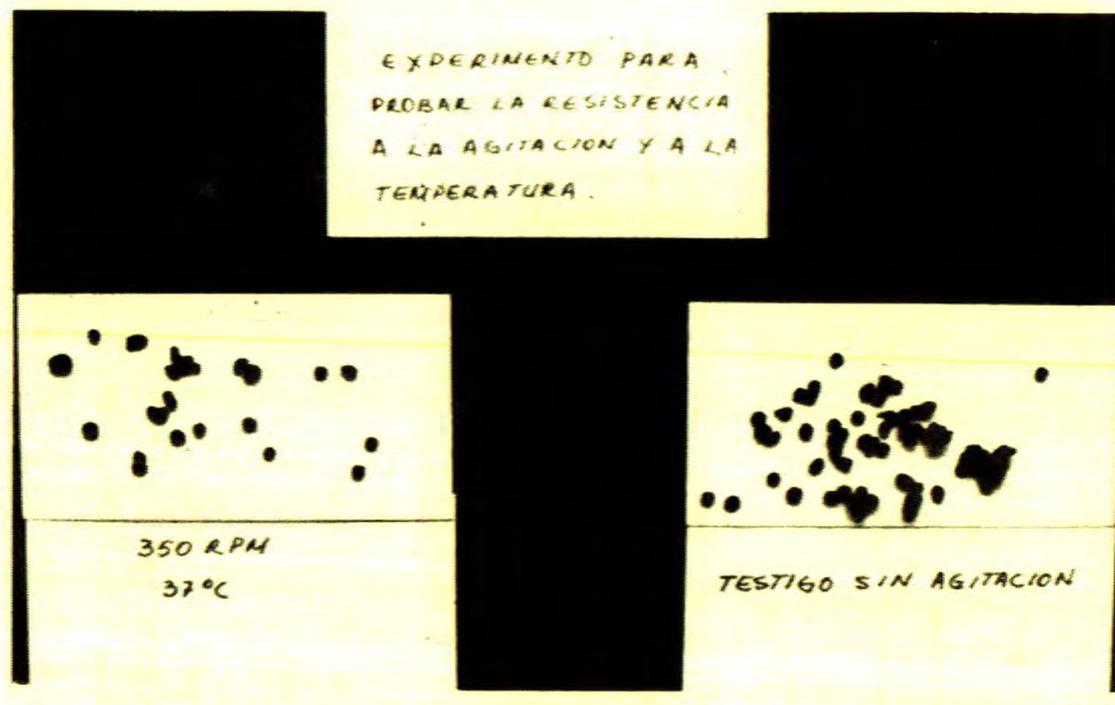


FIGURA 33. Resultado de la prueba a la agitación del biocatalizador, como se aprecia en la figura, al comparar con el control no se nota diferencia alguna entre ambos.

Paralelo a este experimento era necesario probar que las células no se salían del soporte, después del curtido. Para esto se siguió la técnica modificada del X-gal. Como puede apreciarse en los resultados expuestos en la figura 34, las células no se salen del soporte, lo que es muy importante, ya que de lo contrario no podría ser usado el biocatalizador en la leche, además de que habría una constante pérdida de actividad.

Por otro lado, los resultados en cuanto a la relación carragenina-células y la resistencia a la agitación, concuerda con lo informado por Casas, T., que emplea el mismo sistema para inmovilizar penicilinoamidasas unidas a células de E. coli. En cuanto al resto de los resultados sobre inmovilización presentados aquí, no hay posibilidad de comparación con la literatura, ya que para el sistema de células inmovilizadas con actividad β -galactosidasa, los reportes son casi nulos y los que existen carecen de esta información.

Dentro de estos resultados se ha de mencionar que alternativamente se determinó la densidad aparente del biocatalizador, siendo esta igual a 0.4432 g/cm^3 .

Ante el panorama optimista de los resultados anteriores, se decidió preparar un lote considerable de biocatalizador bajo las condiciones anteriormente descritas.

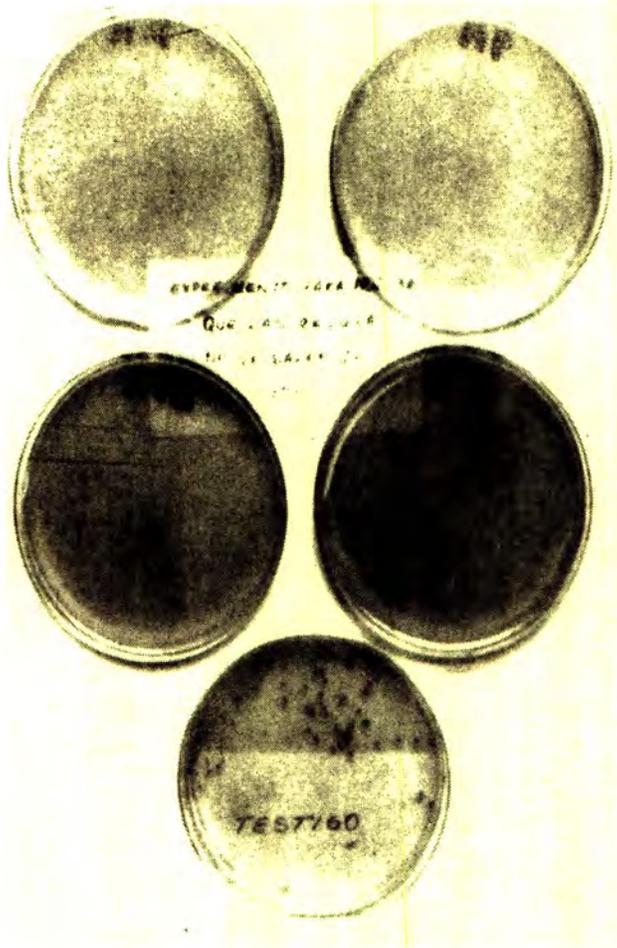


FIGURA 34. Resultado de la prueba para determinar que las células no se salen del soporte, lo cual queda demostrado al no dar positivo el crecimiento en X-gal con coloración azul intenso

5.4 Caracterización cinética del biocatalizador

5.4.1 Perfil de pH

El perfil de pH para las células inmovilizadas es presentado en la figura 35, donde podemos observar que la inmovilización no resulta en una variación del pH óptimo obtenido para las células libres (7.0). Sin embargo, se observa una variación del perfil de pH, presentándose una menor variación de actividad conforme se incrementa el pH. Ambos resultados son lógicos debido a que el microambiente de la enzima no varía grandemente al ser inmovilizadas las células y en consecuencia no hay una interacción directa con el soporte. Estos resultados son comparables con los descritos por Petre *et. al.* para células completas inmovilizadas, donde el pH óptimo tanto en el sistema soluble como inmovilizado presentan una dependencia muy similar, además de que el valor de pH no sufre cambio alguno.

5.4.2 Temperatura óptima y energía de activación del sistema inmovilizado

La temperatura óptima de actividad de las células al igual que en el sistema soluble resultó ser de 55°C (fig. 36).

De éstos resultados además se desprende que la termoestabilidad se incrementa al inmovilizar la β -galactosidasa. Es decir, el tiempo de exposición máximo fue de 15 minutos

PERFIL DE pH PARA CELULAS INMOVILIZADAS.

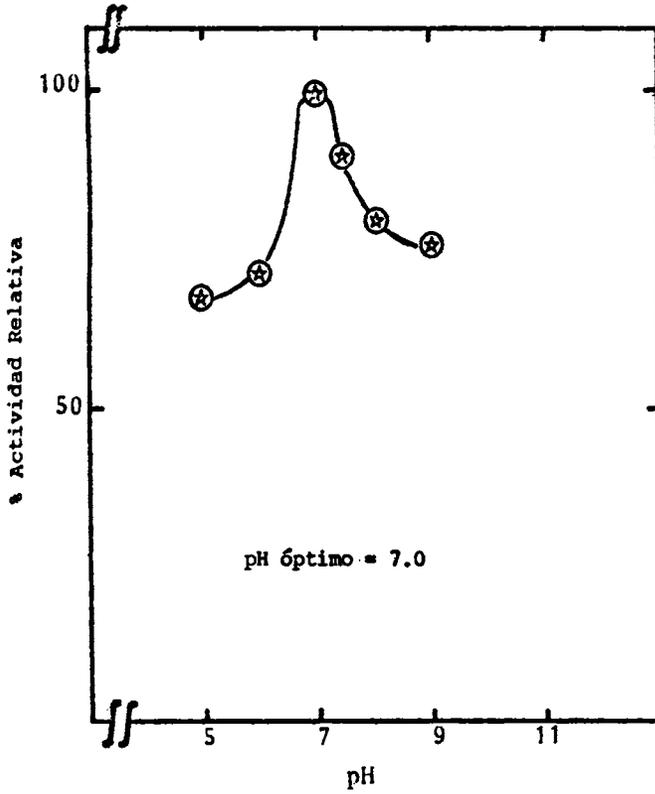


FIGURA 35. Relación de actividad-pH para las células de *E.coli* con actividad β -galactosidasa inmovilizadas en carragenina. El experimento se realizó en buffer de fosfatos 0.1M usando ONPG como sustrato y 37°C. La máxima actividad fue tomada como 100%.

PERFIL DE TEMPERATURA DE CELULAS DE E.coli INMOVILIZADAS
EN CARRAGENINA

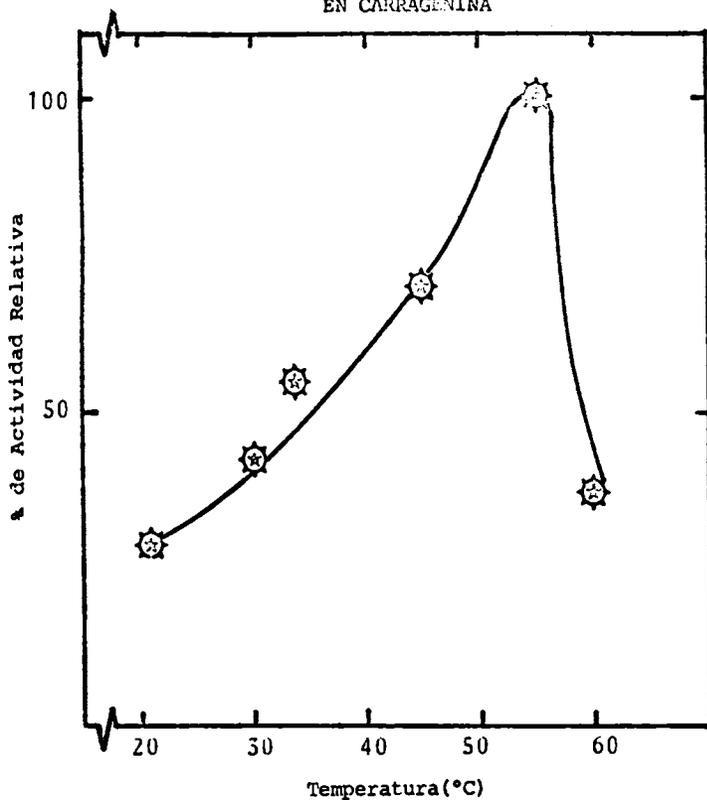


FIGURA 36. Efecto de la temperatura en la actividad β -galactosidasa de células de E.coli inmovilizadas en carragenina. Este efecto fue medido a pH 7.0 en buffer de fosfatos 0.1M.

y la pérdida fue 65% en tanto que en las células libres a este tiempo ya no había actividad. De los resultados a que hace mención la literatura, se puede decir, con respecto al trabajo de Morisi et. al. que son acordes con los resultados obtenidos en esta tesis, ya que la temperatura óptima de la β -galactosidasa de E. coli tanto en forma soluble como inmovilizada es de 55°C. Esta comparación es posible ya que la inmovilización también está efectuada por atrapamiento, con la salvedad de que es enzima pura.

En cuanto al perfil de temperatura de las células inmovilizadas resulta muy similar al de células libres (fig. 23). Ohmiya et. al. inmoviliza células de E. coli con actividad β -galactosidasa y obtiene un resultado muy similar al de este trabajo en lo que a temperatura óptima se refiere.

Usando los resultados obtenidos en el perfil de temperatura, se calculó la energía de activación para el sistema inmovilizado (fig. 37) encontrando que la energía de activación se redujo a 7.0 Kcal/mol. Este tipo de comportamiento es característico de restricciones difusionales.

Estas restricciones, pueden ser minimizadas usando partículas de soporte irregular con una alta relación de área superficial/volumen pero por supuesto esto nos lleva a un rápido desgaste en un reactor agitado y causa flujo irregular, así como compresión en una columna empacada. Tamaños de partículas pequeños, tienden igualmente a incremen-

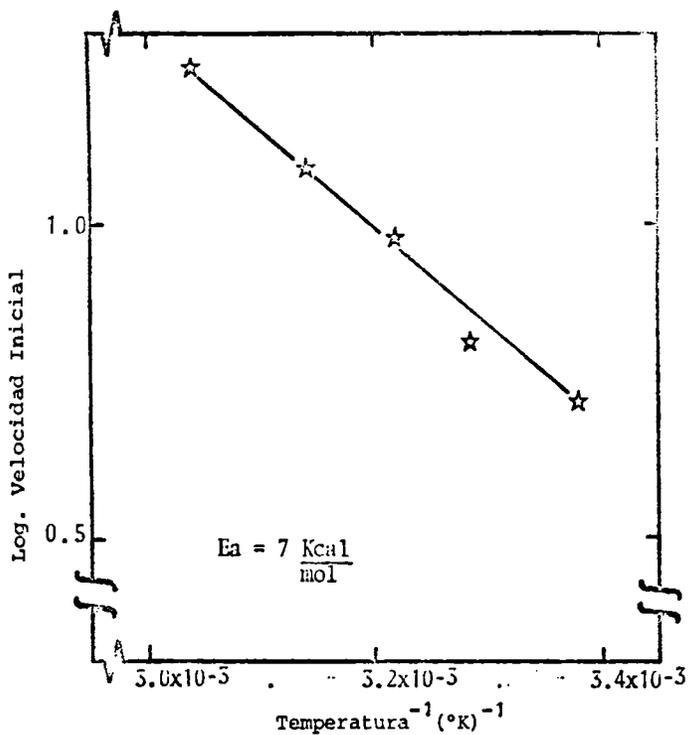


FIGURA 37. Energía de activación para la reacción de hidrólisis de lactosa por células inmovilizadas de *E. coli* CSH-36 con actividad β -galactosidasa. La reacción se hizo a pH 7, en buffer de fosfatos 0.1M.

tar la caída de presión en columnas,

5.4.3 Constantes cinéticas del sistema inmovilizado

El K_m y V_{max} para la β -galactosidasa en células de E. coli inmovilizadas fue determinado al igual que para las células libres, por el método de Lineaweaver-Burk usando lactosa como sustrato (fig. 38). Un K_m de 37,63 mM y una V_{max} de 0.049 μ M de glucosa producida $\text{minuto}^{-1} \text{mg células}^{-1}$ fueron encontrados. Comparando estos resultados con los obtenidos para células libres se puede apreciar que el K_m se incrementa aproximadamente 5 veces en tanto que la V_{max} se reduce aproximadamente 13,6 veces (tabla 8). Haciendo una analogía con los datos reportados en la literatura podemos observar que:

- a) En los estudios realizados por Ohmiya et. al. donde inmovilizan en gel de poliacrilamida e informan que los problemas de transferencia de masa son insignificantes, el resultado de K_m es el mismo para el sistema soluble como para el inmovilizado en los tres tipos de células que inmovilizan, variando sólo en cada caso la V_{max} .

-) En cuanto a la investigación hecha por Sharp et. al. el K_m para la enzima es menor que el de la enzima inmovilizada, en tanto que la V_{max} se ve reducida de 0.59 a 0.045 μ M por minuto por mg de células.

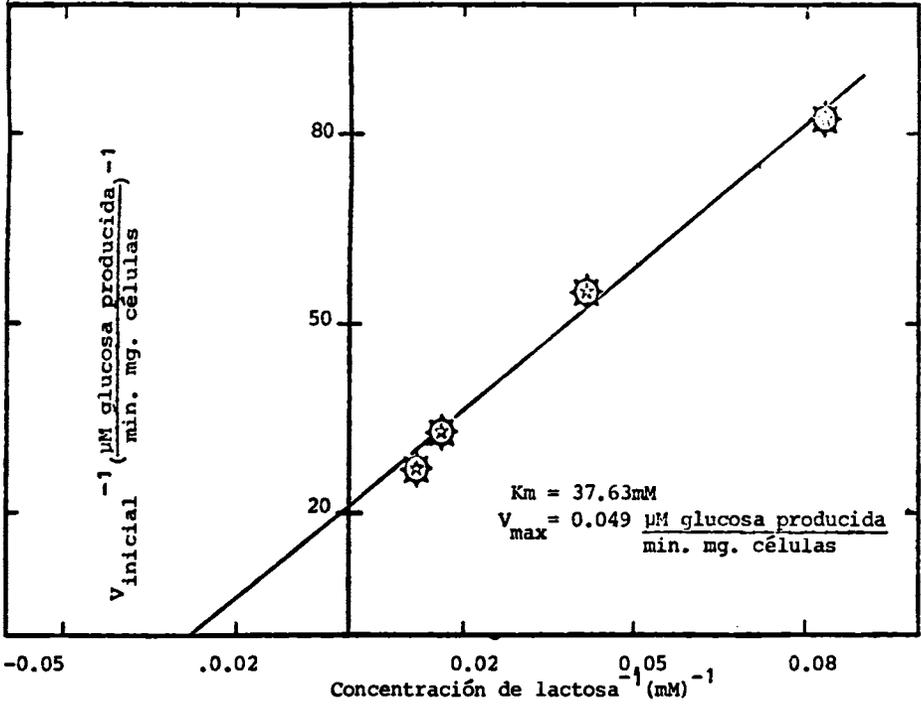


FIGURA 38. Efecto de la concentración de lactosa en la actividad β -galactosidasa de células de *E.coli* inmovilizadas en carragenina. La determinación fue hecha a pH 7.0 en buffer de fosfatos 0.1M, usando lactosa como sustrato y a 37°C y agitación rotatoria.

En cuanto a comparación de valores de K_m y V_{max} , se constata que los resultados de este trabajo de tesis se encuentran dentro del mismo orden de magnitud que los reportados en los trabajos para la β -galactosidasa de otras cepas de E. coli (tabla 15).

Teniendo conciencia de los fenómenos antes mencionados y analizando los resultados obtenidos, se sabe ya que hay limitaciones difusionales en este sistema de trabajo por la gran variación en la energía de activación de la hidrólisis, pero no se sabe aún si la disminución de actividad podía igualmente ser ocasionada por los agentes bifuncionales que se usan en el curtido. Para contestar esta interrogante se plantearon una serie de experimentos que permitiesen saber si existía un efecto de la etilendiamina y el glutaraldehído sobre la actividad enzimática.

Para ello se inmovilizaron células y se curtieron con diferentes concentraciones de los agentes bifuncionales. Se pudo apreciar que por el hecho de inmovilizar, el factor de efectividad se reduce a 0.22 lo cual es evidencia de drásticas limitaciones difusionales. La evidencia de que la enzima no se pierde, la constituye el hecho de que al redissolver el catalizador la actividad que se expresa es equivalente a la original.

En cuanto al proceso de curtido, se observa un incremento en la pérdida de actividad del biocatalizador, lo cual

puede ser debido a dos causas:

- Incremento de los problemas de transferencia de masa por el curtido.
- Problemas de inactivación de la enzima.

Para diferenciar estos efectos se fraccionó el biocatalizador curtido y se le determinó actividad. Analizando los resultados que se obtuvieron aquí, se puede observar que la diferencia entre el biocatalizador íntegro y el biocatalizador fraccionado, a las diferentes concentraciones de curtido es aproximadamente la misma (2%), por lo que se puede concluir que el incremento en los problemas difusionales se presentan en igual proporción. El segundo efecto, se constata en la caída de actividad del catalizador fraccionado, en las diferentes concentraciones de los agentes bifuncionales, con respecto al biocatalizador sin curtir. Se constata que conforme se incrementa la concentración de agentes bifuncionales, se presenta mayor inactivación de la enzima en el proceso de curtido.

Una vez caracterizado el biocatalizador, se procedió a sustituir las constantes cinéticas de éste, en el modelo que describe el comportamiento de la β -galactosidasa contenida en células libres de E. coli, con la finalidad de probar el modelo en las células inmovilizadas; para este efecto se realizó la hidrólisis de una solución con 4,5% de lactosa pura (fig. 39). Se probó para estos datos

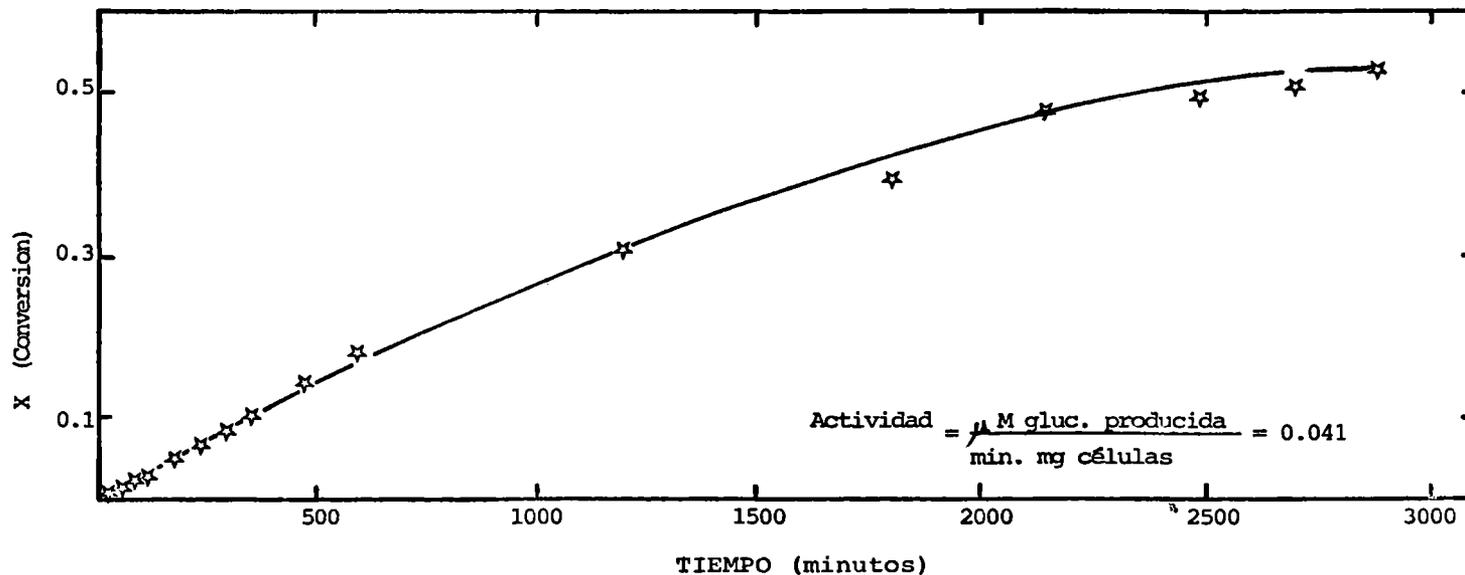


FIGURA 39. Este experimento se realizó con 1 g de biocatalizador y un volumen de reacción de 50 ml, la solución de lactosa tenía una concentración de 4.5 % (litro de mezcla de reacción), la reacción se hizo a pH 7.0 en buffer de fosfatos 0.1 M a 37°C, la reacción fue seguida hasta que no se ve una variación apreciable en la conversión de lactosa, las muestras se tomaban dependiendo de la velocidad de hidrólisis del biocatalizador.

junto con las constantes del biocatalizador, encontrándose que muy posiblemente lo que gobierna el sistema es el fenómeno de transferencia de masa y no la cinética de la reacción, lo que era de esperarse, pues como sabemos, los efectos difusionales son los más importantes modificadores de los sistemas enzimáticos.

5.5 Caracterización del biocatalizador en leche ↓

Antes de usar el biocatalizador en leche como paso final de este trabajo, para demostrar la aplicación de este trabajo y así además cumplir con uno de los principales objetivos de esta tesis, era necesario probar que el biocatalizador es inócuo y no desestabiliza las proteínas de la leche causando con ello su precipitación. Ya con anterioridad se ha comprobado que las células inmovilizadas no salen del soporte, aspecto que sería la primera parte de la demostración parcial de inocuidad.

Adicionalmente, era necesario probar que el biocatalizador no presenta actividad proteolítica para ello se recurrió al método de Lowry modificado y presentado en la figura 40.

Esta experimentación arrojó, como resultado que el biocatalizador no altera la estabilidad de la leche tratada y en consecuencia no expresa actividad proteolítica. La leche después de ser tratada, se almacenó en congelación

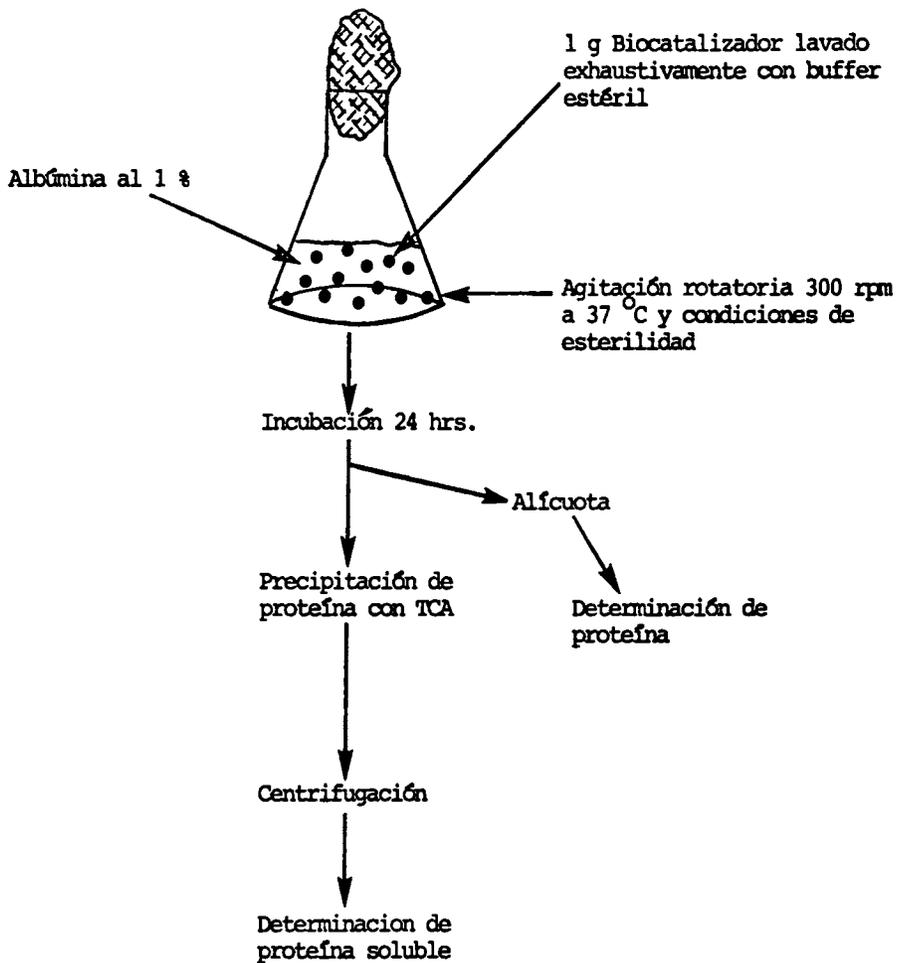


FIGURA 40. Determinación de la posible actividad proteolítica del biocatalizador. A partir de los resultados obtenidos en este experimento se pudo ver que no existía una actividad proteolítica que se expresara en el biocatalizador, con lo que se puede hacer uso del biocatalizador en leche.

durante 5 meses, después de los cuales se pudo observar que ésta se encontraba en buen estado y retenía sus propiedades organolépticas. Con estos resultados quedó probado parcialmente que el biocatalizador es inócuo, por lo que en consecuencia se procedió a operar un reactor para llevar a efecto la hidrólisis de la lactosa en leche; el modelo del reactor se presenta en la figura 41.

Para estos experimentos se usaron 15 g de biocatalizador (peso húmedo), además de 100 ml de leche concentrada que contenían 105.5 g de lactosa/lit, el pH siendo de 6.4, así también la temperatura de trabajo fue de 37°C y la agitación de 300 rpm. El grado de hidrólisis fue determinado durante cada hora durante 24 horas (fig. 42), los resultados a los que se llegó fueron los siguientes:

El máximo grado de hidrólisis se logró a las 15 horas, siendo éste de 52%; después de este tiempo parece ya no haber más hidrólisis. Este comportamiento se compara con el modelo reversible que nos describe el comportamiento de nuestra enzima contenida en células de E. coli libres, y se aprecia que es muy similar el comportamiento del biocatalizador, con la diferencia que en las células libres se obtiene a pH 7.0 y 37°C, 60-62% de hidrólisis. Por otra parte, al ser usado en soluciones de lactosa pura al 4.5% se alcanza un 55% de hidrólisis como máximo. Comparando el biocatalizador con las células libres se puede detectar que hay un decremento en el grado de hidrólisis.

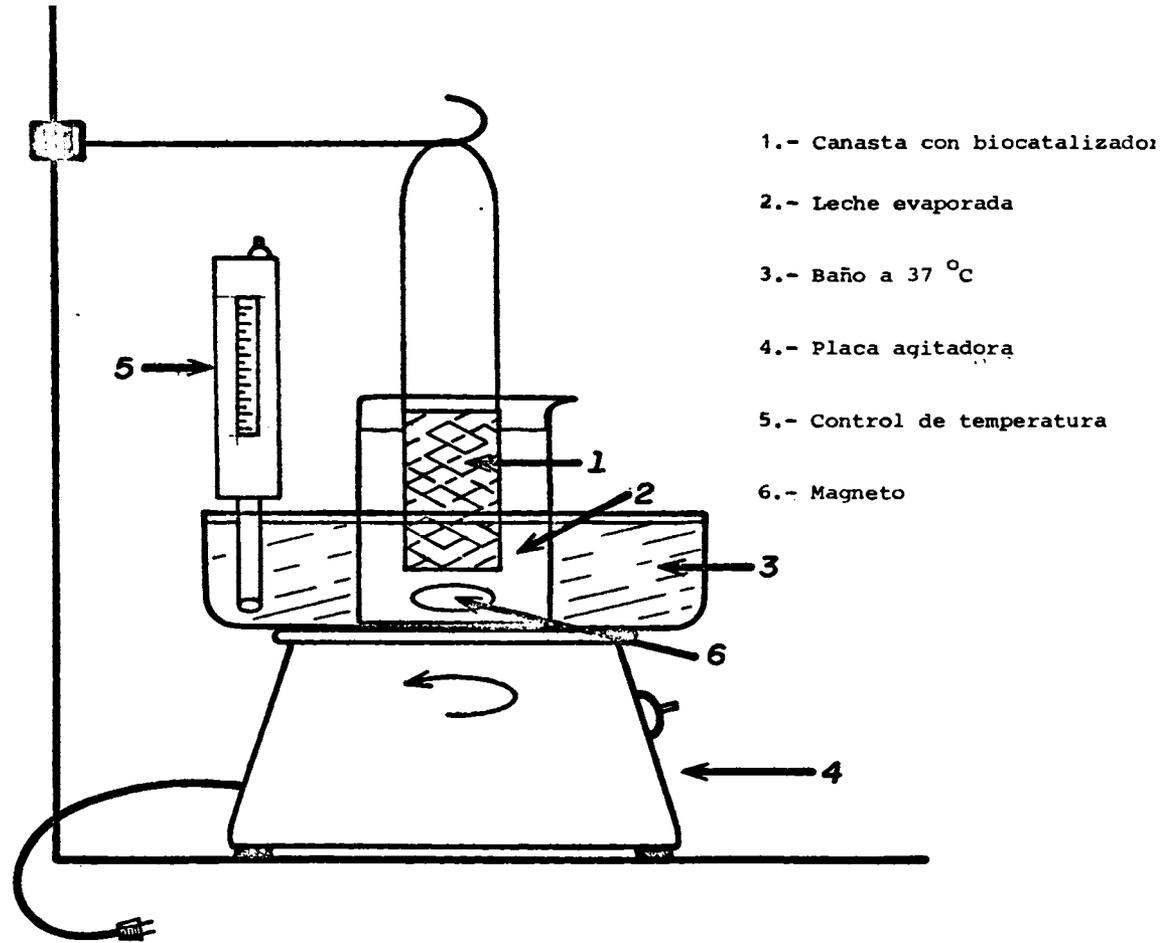


FIGURA 41. Diagrama esquemático del reactor enzimático usado.

Cinetica de hidrólisis de lactosa, contenida en leche evaporada, por células inmovilizadas con actividad β -galactosidasa

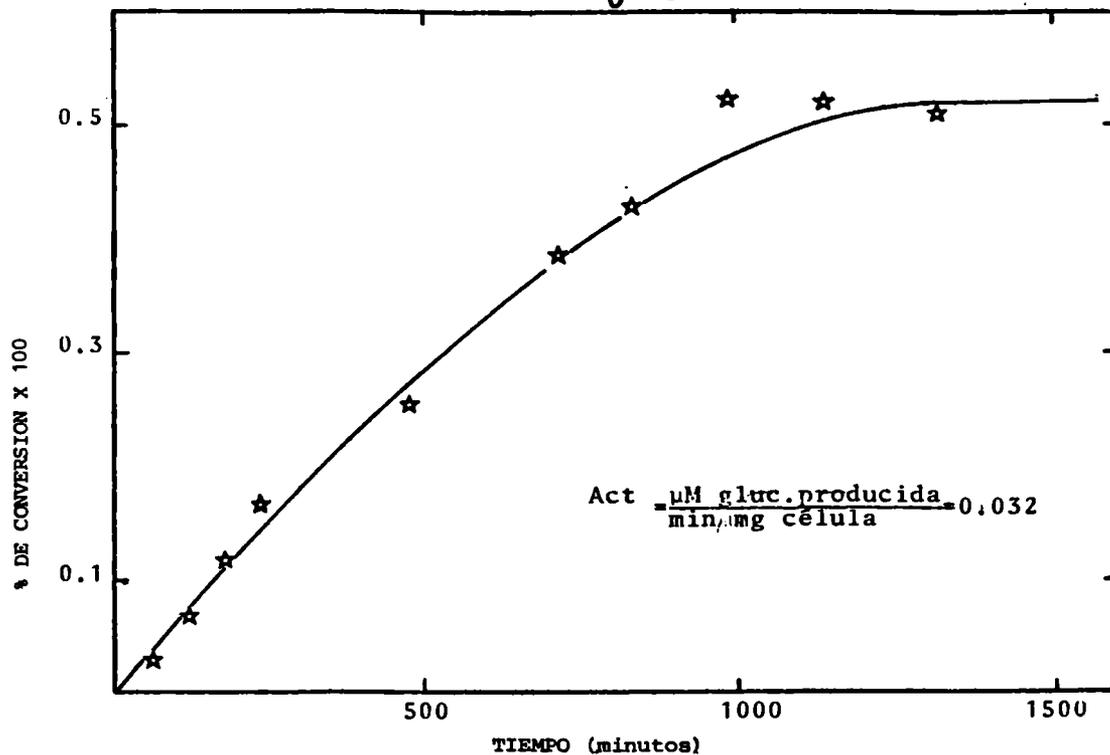


FIGURA 42. El presente experimento se llevó a cabo a una temperatura de 37 °C, agitación de 300 rpm usando magneto, 15 g de biocatalizador y 100 ml de leche evaporada con una concentración de lactosa de 10.5 %. La determinación del grado de hidrólisis se hizo por el método de GOD-Perid.

Otro resultado importante que arroja esta investigación es el que resulta al comparar la actividad β -galactosidasa del biocatalizador frente a soluciones de lactosa pura y leche (0,041 y 0,032 M minuto^{-1} mg de células⁻¹ inmovilizadas respectivamente), en donde vemos que la β -galactosidasa contenida en células de E. coli inmovilizadas en carragenina, no reduce su actividad en leche como se reporta en la literatura (réf. 32). En nuestro caso, la actividad disminuye 20%, con respecto a las soluciones de lactosa pura, el cual puede ser debido al cambio en el pH del sistema y no a la inhibición por algún componente de la leche.

Finalmente, y partiendo de los resultados anteriores, se procedió a la determinación parcial de la estabilidad operacional del biocatalizador, para lo cual se usó el mismo sistema que en la hidrólisis de lactosa en leche, con la variación de usar 60 ml de leche. Una vez tratado con el biocatalizador, cada lote de leche se pasteurizaba y congelaba para posteriormente determinar sus propiedades organolépticas. Antes de pasteurizar se determinaba la actividad que presentaba el biocatalizador en cada lote.

Los resultados obtenidos en la estabilidad operacional se muestran en la figura 43, en la que se puede apreciar que después de 60 lotes, la actividad del biocatalizador no sufre decremento alguno. Es necesario aclarar que los puntos que presentaban actividad superior al 100% son el

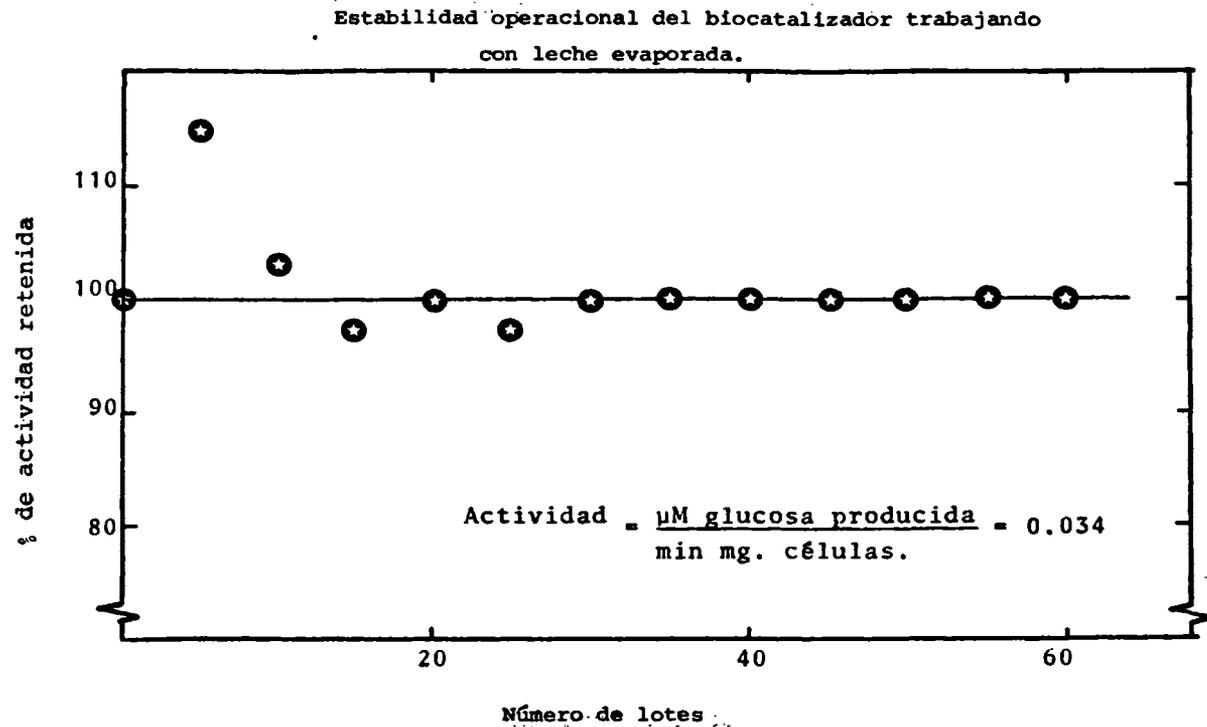


FIGURA 43. La estabilidad operacional presentada en esta gráfica fue realizada con 15 g de biocatalizador (peso humedo) y 60 ml de leche evaporada, se permitía la interacción del biocatalizador con la leche durante 1 hora y a continuación se lavaba este exhaustivamente, y determinaba actividad lactasa en leche.

resultado de que el biocatalizador no se lavó antes de su uso en estos lotes (cierta cantidad de producto puede quedar incluida dentro del catalizador). Comparando el resultado en general con los resultados presentados en la Tabla 13, se puede apreciar que en general la β -galactosidasa de E. coli es bastante estable con respecto a la de otras fuentes sin importar el tipo de inmovilización, si es pura o se encuentra contenida en células.

Por otro lado, comparando la estabilidad operacional en función de la forma en que se inmoviliza y el soporte usado, con lo reportado por Casas et. al., que inmoviliza células completas de E. coli con actividad penicilinoamida en carragenina y en cuyo trabajo se reporta una pérdida de actividad cercana al 20% después de 30 lotes, se puede argumentar que la estabilidad de ambas enzimas puede ser debida a que en la inmovilización no hay una interacción directa entre la enzima y el soporte. Aunado a esto podemos decir que la célula protege a la enzima y le brinda en lo posible el medio óptimo a la leche para que actúe, causas por las cuales se aprecia una alta estabilidad.

En lo que respecta a las propiedades organolépticas de la leche, los 60 lotes tratados fueron analizados, comparados con un patrón sin hidrolizar dado que en general los 60 lotes presentaron las mismas características, los resultados se resumen en la siguiente tabla 17:

TABLA 17,

PROPIEDADES ORGANOLEPTICAS DE LECHE TRATADA*

	CONTROL	LECHE TRATADA
Color	Caracterfstico	Acremado.
Olor	Natural	Leche bronca, ligeramente más dulce que el patrón.
Sabor	Caracterfstico	Cajeta.

* Leche concentrada,

El color y olor generados en la leche tratada deben provenir de las reacciones de Maillard que ocurrieron durante la pasteurización de la leche y el sabor más dulce, ya que la lactosa al ser hidrolizada produce glucosa y galactosa que en conjunto son más dulces que la lactosa en solución.

VI. CONCLUSIONES

Conclusiones

En el presente trabajo se efectuó la caracterización cinética de un sistema catalítico diferente, propuesto para la producción de leches deslactosadas. La caracterización se efectuó tanto en el catalizador original (células de E. coli), así como en el sistema desarrollado (células atrapadas en carragenina).

Se demostró que la β -galactosidasa contenida en las células de E. coli CSH - 36 es constitutiva a diferencia de la mayor parte de cepas de esta especie, lo que constituye una ventaja al no requerir de inductor para su producción.

Al comparar los perfiles de pH de ambos sistemas, se colige que este tipo de inmovilización no afecta el pH óptimo de actividad de la enzima. Además al analizar el perfil de actividad-pH se aprecia una menor susceptibilidad del sistema con la enzima inmovilizada a fluctuaciones de pH.

En lo correspondiente al efecto de la temperatura, como en el caso del pH al efectuarse la inmovilización ésta hace más termoestable a la enzima soportando muy bien cambios bruscos en el medio ambiente.

De los experimentos de estabilidad de almacenamiento se concluye que no es conveniente inmovilizar células almacenadas a 4°C por períodos superiores a 30 días, así como el que la tem-

peratura ideal de almacenamiento es 29°C, si posteriormente van a ser inmovilizadas, con el fin de evitar la lisis celular.

Otra conclusión importante es el haber hecho evidente la existencia de problemas difusionales intrínsecos al uso de células.

La β -galactosidasa contenida en células completas de E.coli obedece una cinética de Michaelis-Menten respecto a lactosa y ONPG usados como sustratos, tanto en el sistema soluble como en el inmovilizado, sólo cuando se miden velocidades iniciales, por otra parte se demostró que esta enzima presenta inhibición acompetitiva por glucosa y competitiva por galactosa en la forma soluble.

Así también se demostró que el modelo enzimático que más se acerca al comportamiento de esta enzima en su forma soluble es el modelo reversible; aunado a esto se constató que lo que rige la reacción de hidrólisis en la forma inmovilizada es la transferencia de masa y no la cinética de la reacción,

En lo que corresponde a la capacidad máxima de atrapamiento expresada como relación carragenina-células se obtuvo que esta relación máxima era 4:1, aunque la relación usada en este trabajo fue 1:1 debido a las necesidades de flexibilidad y dureza. Dentro de esta parte, también se puede afirmar que las células no se salen del soporte y el biocatalizador resiste

la agitación, no presentando además actividad proteolítica, lo que permite afirmar que este sistema puede ser aplicado sin riesgo en la leche.

En lo que al proceso de curtido se refiere, se encontró que el proceso en sí, no incrementa los problemas de transferencia de masa existentes, debidos al proceso de inmovilización, pero sí se pudo demostrar que la concentración de uno o de ambos agentes bifuncionales usados (glutaraldehído y etilendiamina) afectan negativamente la actividad enzimática,

Por otra parte, se demostró parcialmente que el biocatalizador es inócuo y por tanto factible de ser usado en el sistema leche, así como también quedó demostrado que la enzima no baja bruscamente su actividad al ser usada en leche, según lo reportado, como se esperaba, alcanzándose un máximo de hidrólisis de 50 a 55% en leche condensada y una alta estabilidad operacional.

Quizá la conclusión final referente a la calidad de la leche tratada, sea una de los más importantes,

Toda la atención finalmente se dirigió a las propiedades organolépticas del producto de la hidrólisis, con lo que podemos concluir que la leche tratada retiene sus propiedades organolépticas exhibiendo solo cambios muy ligeros en cuanto a dulzura, lo que por otra parte es inevitable si el método de eliminación de lactosa es por hidrólisis.

Finalmente a la conclusión general a la que se llegó, fue que este tipo de inmovilización lleva inherente limitaciones de tipo difusional. Así mismo, se logra una alta protección al sistema enzimático, como consecuencia de que la enzima casi no interacciona con el medio ambiente de reacción y por ende se obtuvo una alta estabilidad operacional que permite emplear el catalizador por periodos de tiempo superiores a los tres meses.

VII, SUGERENCIAS

Sugerencias

Desarrollar un sistema de extrusión que lleve a un menor tamaño de partícula con el fin de aminorar los problemas difusionales, así como también hacer un estudio de otros agentes bifuncionales que sean efectivos y no afecten a la enzima con el fin de conservar una alta actividad en el biocatalizador sin dañar además la estabilidad operacional.

Continuar haciendo estudios toxicológicos del biocatalizador con la finalidad de establecer totalmente la inocuidad del sistema para levantar el veto que existe con respecto al microorganismo en uso.

Así también continuar buscando la forma de incrementar la relación células-carragenina para obtener una mayor actividad enzimática por gramo de biocatalizador, ya sea mediante el uso de aditivos o usando una cepa hiperproductora de la enzima.

Ya con el biocatalizador optimizado y con la completa demostración de la inocuidad del sistema y dado que la enzima es constitutiva, llevar a cabo estudios experimentales a nivel planta piloto, estudiándose las variables del proceso y establecer con ello los costos de producción tanto del biocatalizador como del producto de hidrólisis.

VIII. BIBLIOGRAFIA

B I B L I O G R A F I A

1. Bayles, T.M., and N.S. Rosenmeig; Milk Intolerance and Lactose Tolerance Test, *Gastroenterology*, 54: 475 - 477 (1968).
2. Beaufrand, M.J., and Pullain; *Le Lait*, 568: 501 - 8 (1977).
3. Beddows, C.C., R.A., Mirayer and J.T. Authrie; Immobilization of β -galactosidase and other Enzymes onto p-Amino Carbonilated Celulose Derivates, *Biotech, and Bioeng.* 22: 311 - 21 (1980).
4. Birch, C.G., N. Blackbrough and K.J. Parker; Enzymes and Food Processing Applied Asci. Publishers LTD, London (1981) Cap. 5.
5. Casas, T.L., Producción del ácido 6-aminopenicilánico por Hidrólisis Enzimática de la Penicilina G, Tesis para obtener el grado de Maestría IBM, (1981).
6. Craven, G.R., W. Steers, Jr., and C.B. Anfinsen; Purification, Composition and Molecular Weight of the β -galactosidase of *E. coli* K-12, *J. Biol. Chem.* 240: 2468 - 76 (1965).
7. Chibata, I. Immobilized enzymes research and development, Halsted Press New York (1978).
8. Colowick, S.P. and N.O. Kaplan, Methods in Enzymology. Vol. Academic Press Inc. N.Y., (1955).
9. Finnochiaro, T., T. Richardson and N.F. Olson; Lactose Immobilized on Alumina *J. Dairy Sci.* 63: 215 - 22 (1980).
10. Harju, M. and M. Heikonen. Microbial problems in Continuous Processing with Immobilized Lactase. *Sumposium Bioconversion in Food Technology.* Helsinki (1978).
11. Keidekatsen, M. Preparation of Immobilized β -galactosidase by Poly (vinylpyrrolidone) and the Continuous Hydrolysis of Lactose in Acid Whey. *Biotechn. and Bioeng.* 17: 159 - 82 (1978).
12. Higgins, J.J., D.J. Lewis, W.H. Do-ly, F.G., Mosequeira, P. Dunill and M.D. Lilly; Investigation of the Unit Operation Involved in the Continuous Flow Isolation of β -galactosidase from *Escherichia coli*. *Biotech, and Bioeng.* 20: 159 - 82 (1978).

13. Hustad, G.O., T. Richardson and N.F. Olson: Immobilization of β -galactosidase on an Insoluble Carrier with a Polyisocyanate Polymer I. Preparation and Properties. *J. Dairy Sci.* 56 (9): 1111 - 17 (1973).
14. Hustad, G.O., T. Richardson and N.F. Olson: Idem II. Kinetics and Stability *J. Dairy Sci.* 56 (9): 1118 - 22 (1973).
15. Ioth, T., M. Suzuki and S. Adachi: Production and Characterization of β -galactosidase from Lactose-fermentin Yeast. *Agri. Biol. Chem.* 46 (4): 899 - 908 (1982).
16. Jones, D.F., F.V., Kosikowski. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 29: 638 - 38 (1976).
17. Kretchmer, N. Lactose and Lactase. *Scientific American* 227 (5): 71 - 81 (1972).
18. Kuby, S.A., and H.A., Lardy. Purification and Kinetics of β -galactosidase from *Escherichia coli*, strain K-12. *J. Amer. Chem. Soc.* 75: 890 - 96 (1953).
19. Lehninger, G.L., Bioquímica. 2a. edición Ediciones Omega. Barcelona, España, 1979.
20. Linko, P. and J. Larinkari: Food Process Engineering Vol. II. Enzyme Engineering in Food Processing. Applied Sci. Publishers LTD. London (1980).
21. Lisker, R., G. López-Habib, M. Daltabuit, L. Rosenberg and P. Arroyo. Lactose Deficiency in Rural Area of Mexico. *Amer. J. Clin. Nutr.* 27: 756 - 59 (1974).
22. Lisker, R., B. González and M. Daltabuit. Recessive Inheritance of Adult Type of Intestinal Lactase Deficiency. *Amer. J. Human Genetics.* 27 (5): 662 - 64 (1975).
23. Lisker, R. and L. Aguilar, *Gastroenterology*, 75: 1283 - 85 (1978).
24. Lisker, R., and O. Moreno-Terrazas. Estudio Doble Ciego sobre la Tolerancia a la Lactosa de la Leche en un Grupo de Niños Rurales. *Rev. Invest. Clin. (México)* 32: 363 - 68 (1980).
25. Lowry, O.H., J.N. Rosebrough, L.A. Farr and J.R., Randall, Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265 - 72 (1951).
26. Meacleod, C.J.L., P. Dunill and M.D. Lilly. The Synthesis of β -galactosidase by constitutive and other Regulatory Mutants of *Escherichia coli* in Chemostat Culture. *J.*

- of General Microb, 89: 221 - 28 (1975),
27. Macris, B.J., Production of Extracellular Lactase from Fusarium moniliforme European J. of Appl. Microb. and Biotech, 13: 161 - 64 (1981),
 28. Mahoney, R.R., and J.R., Whitaker, Purification and Physico-Chemical Properties of β -galactosidase from Kluyveromyces fragilis. J. Food Sci. 43: 584 - 90 (1978)
 29. Miller, G.L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem. 31 (3): 426 - 28 (1959).
 30. Miller, J.H., Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory. Second Printing, U.S.A. 1974.
 31. Mitchell, K.J., and T.M. Bayless. Pediatric 56: 18 - 21 (1975).
 32. Morisi, F., M. Pastore, and A. Viglia. Reduction of Lactose Content of Milk by Entrapped β -galactosidase from Yeast and Escherichia coli J. Dairy Sci. 56: 1123 - 27 (1973).
 33. Navinesingh, D., T.T. Ngo. and K.J. Laidler Flow Kinetics of β -galactosidase Chemically Attached to Nylon Tubing. Can. J. Biochem. 53: 1061 - 69 (1975).
 34. Ngo, T.T., D. Narinesingh and K.J. Laidler. Hydrolysis of β -galactosidase in an Open Tubular Lactose Reactor. Biotech. and Bioeng. 18: 119 - 127 (1976).
 35. Ohmiga, K.H., Ohashi, T. Kobayashi and S. Shimizu. Hydrolysis of Lactose by Immobilized Microorganisms. Applied and Env. Microb. 33: 137 - 46 (1977).
 36. Okos, E.S., and Harper, W.J., Activity and Stability of β -galactosidase Immobilized on Porous Glass, J. Food Sci. 39: 88 - 92, 1974.
 37. Olson, A.C., and Cooney, C.L., Immobilized Enzymes in Food and Microbial Processes. Edo. Plenum Press, New York, 1974, 157.
 38. Olson, A.C. and W.L. Stanley, Lactose and other Enzymes Bound to a Phenol-formaldehyde Resin with Glutaraldehyde. J. Agric. Food. Chem. 21: 440 - 45 (1973).
 39. Ostergaard, J.C.W. and S.C. Marting. The Immobilization of β -galactosidase through Encapsulation in Water-insoluble microcapsules. Biotech. and Bioeng. 15: 561 - 62 (1973).

40. Pastore, G.M., F. Morisi and A. Yiglia, Reduction of Lactose of Milk by Entrapped β -galactosidase II, Conditions for an Industrial Continuous Process, *J. Dairy Sci.* 57 (3): 269 - 72 (1973).
41. Pastore, G.M., and F. Morisi, Lactose Reduction of Milk by Fiber-Entrapped β -galactosidase. Pilot Plant Experiments. *Methods in Enzymology* 44: 822 - 830 (1976).
42. Pastore, G.M., and Y.K. Park, Screening of High β -galactosidase Producing Fungi and Characterizing the Hydrolysis Properties of a Selected Strain. *J. Food, Sci.* 44: 1577 - 80 (1979).
43. Park, Y.K., M.S.S. de Santi and G.M. Pastore, Production and Characterization of β -galactosidase from *Aspergillus orizae*. *J. Food. Sci.* 44: 100 - 103 (1979).
44. Pye, E.K., and Wingard, L.B., Enzymes Engineering. Vol. 2, Ed. Plenum Press, New York, 1974, 131.
45. Payne-Bose, D. and I.D. Welsh, *The American Journal of Clinical Nutrition* 30: 695 - 97 (1977).
46. Petre, D.C. Noel and D. Thomas: A New Method for Cell Immobilization. *Biotech. and Bioeng.* 20: 127 - 34 (1978).
47. Pitcher, W.H. Jr. Immobilized Enzymes for Food Processing. CRC. Press. Florida (1980).
48. Reed, G. Enzymes in Food Processing. 2a. Ed. Academic Press, Wisconsin (1975).
49. De Rosa, M.A. Gambacorta. R. Esposito, E. Drioli, G. Iorio and R. Molinari, High-Temperature Membrane-Entrapped Cells. *Biotech. and Bioeng.* 23: 221 - 23 (1981).
50. Sharp, A.K., G. Kay and M.D. Lilly. The Kinetics of β -galactosidase Attached to Porous Cellulose Sheets. *Biotech. and Bioeng.* 11: 363 - 80 (1969).
51. Stanley, W.L., G.G. Waters, B. Chan and J.M. Mercer: Lactase and other Enzymes Bound to Chitin with Glutaraldehyde. *Biotech. and Bioeng.* 17: 315 - 26 (1975).
52. Summer, J.B., and S.F. Howell. A Method for Determination of Saccharasa Activiti. *J. Bio. Chem.* 108: 51 - 3 (1935).
53. Toda, K., Interparticle Mass Transfer study with Packed Column of Immobilized Microbes. *Biotech. and Bioeng.* 17: 1729 - 47 (1975).

54. Tosa, T.T., Sato, T. Mori, K. Yamamoto, I. Takata, Y. Nishida and I. Chibata, Immobilization of Enzymes and Microbial Cells Using Carragenan as Matrix. Biotech. and Bioeng. 21: 1697 - 1709 (1979).
55. Turner, S.J., and T. Daly, The American Journal of Clinical Nutrition 29: 739 - 44 (1976).
56. Venkatasubramanian, K., Immobilized Microbial Cells, ACS Symposium Series 106, Washington, D.C. 1979.
57. Vaquero, Rufz, F. Rev. Diag. Biol. 22: 151 - 53 (1973).
58. Wallenfels, K., and O.P. Malhotra. β -galactosidase, The enzymes Vol. 4, 2a, Edición, Academic Press, London, (1960).
59. Wallenfels, K. and R. Weil, β -galactosidase, The Enzymes Vol. VIII, 3a, Edición, Academic Press, London, 1972.
60. Werner, W., H.G. Rey and H. Wielinger, Z. Analyt Chem. 252: 224 - 28 (1970).
61. Wiseman, A. Topics in Enzymes and Fermentation Biotechnology, Vol. 4, Ellis Horwood Limited, N.Y., (1980).
62. Wondolowski, M.V., and J.H. Woychik, Characterization and Immobilization of E.coli (ATCC -26) β -galactosidase, Biotech. and Bioeng. 16: 1633 - 44 (1974).
63. Woteki, C. E., E. Weser and E. A. Young, Lactose Malabsorption in Mexican - American Children. Amer. J. Clin. Nutr. 29: 19-24 (1976).