

⑨ 2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
U A C P Y P C C H

"RECUPERACION, FORMULACION Y CARACTERIZACION
DE UN EXTRACTO ENZIMATICO CON ACTIVIDAD DE
LACTASA OBTENIDO POR SECADO"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
M EN C. EN BIOTECNOLOGIA
P R E S E N T A
CARLOS F. PEÑA MALACARA

CUERNAVACA MOR.

1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Pag
I INTRODUCCION	
I.1. Leche líquida deslactosada	1
I.2 Productos lacteos concentrados	2
I.3 Suero de leche para jarabes dulces	2
I.4 Productos lacteos fermentados	3
I.5 Hidrólisis de la lactosa	3
II OBJETIVOS	6
III ANTECEDENTES	
III.1 Intolerancia a la lactosa de la leche	7
III.2 Propiedades de β -galactosidasa	8
III.2.A. Características fisicoquímicas	10
III.2.B. Características cinéticas	12
pH óptimo para la actividad y estabilidad de la β -galactosidasa	12
Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la β -galactosidasa	14
Efecto de diversos iones sobre la actividad y estabilidad de la β -galactosidasa	15
Efecto de la concentración de sustrato y productos sobre la actividad de la lactasa	15
Estabilidad de la enzima en almacenamiento	17
III.3 Producción y recuperación de enzima	20
III.3.A Ruptura celular	24
IV METODOLOGIA	
IV.1 Producción de <i>Kluyveromyces fragilis</i>	29
IV.1 A Composición del medio	29
IV.1 B Preparación de inóculos	30
IV.1 C Producción en 100 litros	30

IV.2. Recuperación de la enzima	31
IV.2 A Centrifugación del caldo de cultivo	31
IV.2 B Secado de la levadura	31
IV.2 C Extracción de la β -galactosidasa de <i>K. fragilis</i>	32
IV.3 Caracterización del producto	32
IV.3 A Determinación de la concentración celular	32
IV.3 B Determinación de la actividad de la lactasa usando ONPG como sustrato	33
IV.3 C Determinación de la actividad de la lactasa usando lactosa como sustrato.	35
IV.3 D Hidrólisis de la lactosa en leche y suero	37
IV.3 E Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de la β -galactosidasa.	38
IV.3 F Efecto de la concentración del sustrato y productos sobre la velocidad de hidrólisis.	38
IV.3 G Determinaciones de estabilidad	39
IV.3 H Determinación del peso molecular de la β -galactosidasa	40
IV.3 I Determinación de la actividad zimasa	40
IV.3 J Determinación de humedad	41
IV.3 K Determinación de proteína	41
IV.3 L Determinación de azúcares	42
V RESULTADOS Y DISCUSION	
V.1 Recuperación de la β -galactosidasa a través del secado en el rotavapor	44
V.2 Recuperación de la β -galactosidasa en células de levadura por aspersión	46
V.3 Caracterización del producto	55
V.3 A Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de la β -galactosidasa	55
V.3 B Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la lactasa	58

V.3 C Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la β -galactosidasa	63
V.3 D Efecto de los productos sobre la actividad de la β -galactosidasa	66
V.3 E Estabilidad en almacenamiento de la β -galactosidasa	69
V.3 F Actividad zimasa del producto	80
V.3 G Determinación del peso molecular de la β -galactosidasa	82
V.4 Formulación y aplicación del producto en leche y suero lactosado	84
VI CONCLUSIONES	92
VII BIBLIOGRAFIA	97

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fué el de obtener formular y caracterizar un producto con actividad de lactasa. Durante el secado en el rotavapor la mejor condición de recuperación se presenta cuando se trabaja a 45°C durante tres horas y a temperaturas de 140°C- 82°C de entrada y salida respectivamente en el secado por aspersión.

El extracto enzimático obtenido a partir de las células secas, posee una actividad máxima de hidrólisis a 45°C y pH de 6.6. La enzima es estable durante veinte minutos a 40°C en un rango de pH de 6.4 a 7.2. La energía de activación calculada fué de 5.25 Kcal/mol y la energía de desnaturalización de 136.45 Kcal/mol.

La enzima es específica para los β -galactosidos, con una K_m de 3.4 mM y 15.56 mM y una V_{max} de 9.0 μ moles de ONP/min \times mg de proteína y 15.2 μ moles de glucosa/min \times mg de proteína para ONPG (orto-nitrofenol β -galactosido) y lactosa respectivamente. Por otro lado, el extracto enzimático es inhibido en forma competitiva por galactosa.

El producto seco formulado en glicerol al 50% a 40°C durante 60 minutos, presenta una actividad específica 40% mayor en relación a la inicial, obteniéndose hidrólisis del 45 y 60% de suero y lactosa respectivamente mediante el uso de 1000 unidades/litro.

RECUPERACION, FORMULACION Y CARACTERIZACION DE UN EXTRACTO ENZIMATICO CON ACTIVIDAD DE LACTASA OBTENIDO POR SECADO

INTRODUCCION

La lactasa o β -galactosidasa (3,2,1.23), es la enzima que cataliza la hidrólisis de la lactosa presente en la leche y suero en sus monosacáridos glucosa y galactosa. Comercialmente se ha utilizado desde los años cincuenta en algunos países, pero no es sino hasta la década de los ochenta cuando aparecen en el mercado un gran número de productos con actividad de lactasa, varios de los cuales se han empezado a introducir en México en los últimos cinco años (García-Garibai 1986).

En México, existe una demanda potencial importante para el uso de productos hidrolizados. Se estima que del total de leche y derivados que actualmente se consumen, el 5% podría comercializarse en forma hidrolizada, además de la posibilidad de industrializar 30 millones de litros de suero anuales en forma parcialmente deslactosada (Varela 1987). Entre los productos lácteos hidrolizados que presentan un gran potencial de utilización en nuestro país podemos mencionar los siguientes:

1.1 Leche líquida deslactosada.

La hidrólisis de la lactosa presente en la leche líquida favorecerá el consumo de este alimento por personas intolerantes al disacárido, adicionalmente la mezcla de monosacáridos producidos, glucosa y galactosa, aumentarán su poder edulcorante sin incrementar su contenido calórico, favoreciendo con esto la preparación de leches saborizadas.

La leche con lactosa hidrolizada puede ser utilizada para la alimentación parenteral de pacientes graves y evitar así

que la desnutrición complique su estado, de esta manera podrán sustituirse aquellas fórmulas nutricionales, en su mayoría más caras, que actualmente se emplean (Rosado 1985).

I.2 Productos lácteos concentrados.

En la preparación de leches concentradas frías y heladas la hidrólisis parcial de lactosa, 30 al 40%, evita la cristalización y/o floculación proteica, aún durante tiempos de almacenamiento prolongados, previniendo así la formación de una textura arenosa típica de los productos lácteos concentrados. Por otro lado, el incremento en el poder edulcorante de los productos con lactosa hidrolizada permite que se reemplace en forma parcial el uso de sacarosa en helados y postres fríos (Nijpels 1981).

I.3 Suero de leche para jarabes dulces.

A partir de la hidrólisis de suero, se pueden preparar jarabes dulces con un contenido de 70 a 75% de sólidos que pueden ser usados como una fuente de proteínas y azúcares en la manufactura de productos de panificación, en confitería, bebidas de frutas, aderezos y postres congelados. Con la hidrólisis parcial de la lactosa se incrementará la solubilidad de los azúcares glucosa y galactosa, permitiendo con esto la preparación de jarabes estables altamente concentrados que resisten el ataque de bacterias, levaduras y hongos.

Por otro lado, los jarabes con lactosa hidrolizada ejercen un efecto edulcorante sinérgico en presencia de otros azúcares, lo cual permite disminuir el uso de carbohidratos en la elaboración de helados. Así mismo presentan una baja viscosidad, lo que facilita su concentración hasta elevados niveles de sólidos, sin problemas de cristalización. Todas estas posibilidades permiten un incremento en el valor agregado del suero de leche (Nijpels 1981).

I.4 Productos lácteos fermentados.

La hidrólisis de la lactosa puede disminuir el tiempo de producción del yogurt hasta en un 15-20%. Por otro lado, la vida media del yogurt se incrementa y presenta un sabor más dulce que el producto elaborado con lactosa sin hidrolizar (Nijpels 1981).

En la manufactura de quesos, la lactosa hidrolizada disminuye el tiempo de acidificación reduciendo así el costo de procesamiento. El tiempo de maduración de quesos puede reducirse también debido principalmente a una proteólisis inicial muy alta.

I.5 Hidrólisis de la lactosa

Al igual que otros azúcares, la lactosa puede ser hidrolizada a sus monosacáridos glucosa y galactosa mediante catalisis ácida o enzimática. El primer método se caracteriza por las condiciones extremas de pH y temperatura que se requieren (pH 1-2 T= 100-150°C), mientras que el segundo se lleva a cabo bajo condiciones suaves, (pH 3-5 T= 5-60°C).

Mediante la hidrólisis ácida se puede obtener un alto grado de conversión en cortos periodos de tiempo. Sin embargo, experiencias recientes han demostrado que esta no puede ser aplicado para hidrólisis de leche y suero, debido a que las condiciones en que se utiliza causa la desnaturalización de proteínas y genera colores indeseables (Vassilis 1985).

La hidrólisis enzimática mediante el uso de lactasas, ofrece una mayor flexibilidad en términos de la gama de sustratos que se pueden procesar y de la calidad del producto. Con este método no es necesario ningún pretratamiento del material tal como la desproteínización, la desmineralización, etc., y el producto que se obtiene, conserva completamente sus características

organolépticas (Vassiliis 1985)

La lactasa o β -galactosidasa es una enzima producida por una gran variedad de seres vivos : bacterias, hongos, levaduras, animales y plantas. Sin embargo para fines comerciales, sólo se utilizan las lactasas de hongos como *Aspergillus niger*, *A. oryzae* y las de levadura como *Kluyveromyces fragilis*, *K. lactis* y *Candida pseudotropicalis* (tabla 1).

Las levaduras mencionadas son microorganismos totalmente inocuos, cuya utilización en alimentos está totalmente reglamentada y permitida por las legislaciones de la mayoría de los países desarrollados. Destaca *Kluyveromyces fragilis*, la cual tiene la categoría GRAS (Generally Recognized as Safe) de la FDA (Food and Drug Administration de los E.U.A).

La producción industrial de la enzima a partir de sistemas microbianos ofrece la ventaja de obtener altos niveles de productividad en un mínimo de espacio y una fácil disponibilidad de los medios de crecimiento. Dentro de estos procesos es de suma importancia el desarrollo y optimización de operaciones unitarias con el objetivo de recuperar la β -galactosidasa.

El diseño de un proceso adecuado para la recuperación de la β -galactosidasa permitira la obtención de altos rendimientos y costos reducidos, siendo esto de vital importancia en la industria alimenticia donde la competencia es alta, y los márgenes de beneficios son relativamente estrechos (Thomson 1984).

Por las razones antes mencionadas es que el presente trabajo pretende desarrollar un sistema de recuperación para la obtención de un producto con actividad β -galactosidasa que hidrolíce la lactosa de leche y suero, planteandose para tal efecto los siguientes objetivos :

Tabla 1

FUENTES POSIBLES DE LA β -GALACTOSIDASA

(Vassilis y López-Leyva 1985)

PLANTAS	Durazno
	Almendra
	Albaricoque
ANIMALES	Intestino
	Tejido cerebral
LEVADURAS	<i>Kluyveromyces lactis</i> *
	<i>Kluyveromyces fragilis</i> *
	<i>Candida pseudotropicalis</i>
	<i>Wingea roberstii</i>
BACTERIAS	<i>Escherichia coli</i> *
	<i>Bacillus megaterium</i>
	<i>Streptococcus lactis</i>
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
HONGOS	<i>Lactobacillus sporogenes</i>
	<i>Neurospora crassa</i> *
	<i>Aspergillus niger</i> *
	<i>Aspergillus oryzae</i> *
	<i>Mucor puillus</i>

* Fuentes que son utilizadas para la preparacion comercial de la enzima

II OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Obtención , formulación y caracterización de un extracto enzimático que hidrolice la lactosa de la leche y del suero dulce.

OBJETIVOS PARTICULARES :

II.1 Evaluar el nivel de recuperación de la actividad lactasa en células de levadura mediante un método no mecánico de ruptura celular a escala laboratorio.

II.2 Establecer las condiciones de máxima recuperación de la lactasa en células de levadura secadas por aspersión a escala piloto.

II.3 Probar el efecto del tiempo y la temperatura sobre el nivel de expresión de la β -galactosidasa en células de levaduras secadas por aspersión.

II.4 Determinar las características físicas y cinéticas del extracto enzimático con actividad de β -galactosidasa.

III ANTECEDENTES

III.1 Intolerancia a la leche

Indiscutiblemente la leche es el alimento ideal para lactantes, y un excelente alimento para niños de edad entre los 0 y los 11 años. Contiene muchos de los nutrientes requeridos como vitaminas y minerales, además de ser una importante fuente proteica y energética. Sin embargo, después de la lactancia el hombre va disminuyendo su capacidad de producir la enzima lactasa, la cual es la responsable de la asimilación de la lactosa (Kretmer 1972).

La intolerancia a la lactosa se presenta además, en individuos con enfermedades congénitas raras que provocan una pérdida de la actividad lactasa desde el momento que nacen, trayendo consigo afecciones gastrointestinales severas que pueden tener un desenlace fatal. Otro grupo que presenta intolerancia a la lactosa son los niños prematuros y/o desnutridos, los cuales han perdido temporal o permanentemente la actividad de lactasa. Finalmente, las personas sometidas a operaciones del tracto intestinal pueden presentar intolerancia a la lactosa (Bayles 1968).

Los individuos con intolerancia a la lactosa, no podrán aprovechar esta importante fuente energética que, en el caso de la leche desgrasada llega a representar hasta el 60% de su aporte nutritivo. Por otro lado, las personas con alimentación marginal subutilizarán el potencial de las proteínas lácticas, puesto que estas serán usadas como fuentes energéticas en lugar de convertirse en proteínas estructurales (Nijpels 1981).

Debido a que la lactosa no es absorbida por las personas intolerantes, esta servirá como fuente de carbohidratos para la microflora intestinal. Como consecuencia, se formará ácido láctico junto con dióxido de carbono, dando como resultado irritación del intestino y colon y una pérdida grande de líquidos. Ello provoca síntomas clínicos como el dolor

abdominal, la diarrea, la flatulencia, etc (Nijpels 1981).

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 (Kretmer 1972).

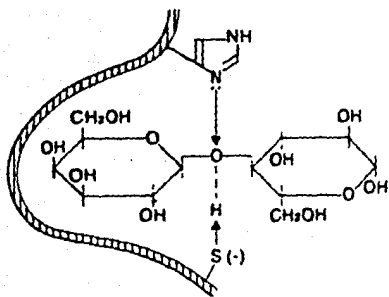
A finales de los años cincuentas, Paolo Durand, de la Universidad de Génova, y Aaron Holzd y sus colaboradores, de la Universidad de Manchester, publicaron estudios sobre las reacciones provocadas por la lactosa de la leche en niños intolerantes. Estas reacciones van desde diarrea, síntomas de malnutrición y hasta la muerte. Estos trabajos resucitaron el interés por la lactosa y la lactasa, a lo que siguió un período de activas investigaciones sobre el problema (Bayles 1968).

En lo que respecta a la intolerancia a la lactosa de la población en México, según pruebas realizadas en la División de Nutrición Experimental y Ciencias de los Alimentos del Instituto Nacional de Nutrición (INN) se ha encontrado que el 75% de la población mayor de seis años presenta o ha presentado problemas de intolerancia a este disacárido (Lisker 1980).

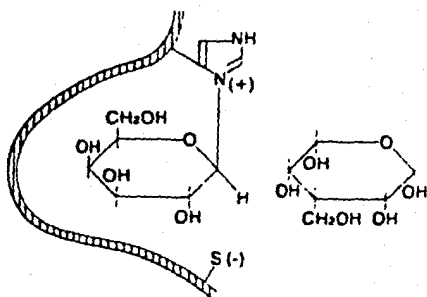
III.2 Propiedades de la β -galactosidasa

La lactasa es el nombre común de la enzima β -d-galactosidasa o β -d-galactosido hidrolasa (E. C 3.2.1.2.3), la cual hidroliza la lactosa de la leche en sus monosacáridos glucosa y galactosa. Además de estos dos productos principales de reacción, se producen pequeñas cantidades de disacáridos y trisacáridos como un resultado de reacciones de transgalactosidación, particularmente en concentraciones altas de sustrato, sin embargo estos subproductos son eventualmente hidrolizados (figura 1).

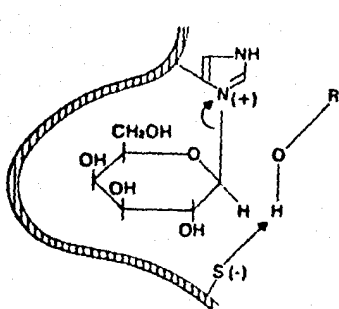
FIG 1 HIDROLISIS DE LA LACTOSA POR LA β -GALACTOSIDASA
MECANISMO DE REACCION



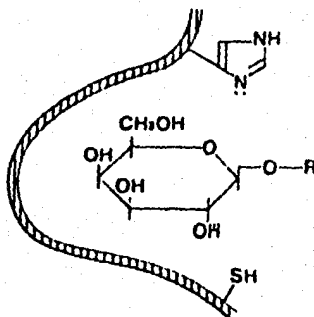
1. β -GALACTOSA (1-4) α -GLUCOSA
+ β -GALACTOSIDASA



2. COMPLEJO (β -GALACTOSIDASA
GALACTOSA) + GLUCOSA



3. COMPLEJO (β -GALACTOSIDASA +
GALACTOSA) + ROH⁻



4. RO-GALACTOSA +
 β -GALACTOSIDASA

La hidrólisis de lactosa involucra la transferencia de un residuo galactosa a un aceptor (agua, otro azúcar o alcohol). Se postula que los grupos activos durante la hidrólisis corresponden a un grupo imidazol de la histidina y a un grupo sulfhidril de la cisteina (Wallenfels y Malhotra 1960)

La β - galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* es una enzima que ha sido preparada en diversas formas, obteniéndose desde extractos celulares hasta productos con alto grado de pureza. En todos estos trabajos se resalta la necesidad de tener un conocimiento amplio de la naturaleza de la enzima tanto desde el punto de vista estructural como funcional, para así poderla emplear eficientemente en los sistemas alimenticios en estado libre o inmovilizada.

A continuación se mencionarán las propiedades más importantes de la β - galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* reportadas en la literatura :

III.2 A Características fisicoquímicas

La mejor purificación y caracterización fisicoquímica de la β - galactosidasa fué hecha por Mahoney y Whitaker (1978), quienes obtuvieron una preparación con enzima pura con una actividad específica de 226 unidades por miligramo de proteína y un rendimiento del 60% con respecto al extracto crudo. El peso molecular determinado por ultracentrifugación y filtración en gel fué de 201 000. Esta enzima es considerablemente más grande que la β - galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (Dickson y Markin 1979) y de la lactasa de *Aspergillus oryzae* y *A niger* (Vassilis y López-Leyva 1985) y más pequeña que la β -galactosidasa de *Escherichia coli* (Zabin y Fowler 1978) (tabla 2).

El examen de la proteína por microscopía electrónica sugiere que está constituida por 9 o 10 subunidades en un arreglo de tipo pentagonal el cual confiere un número mayor de contactos por subunidad haciéndola muy estable. La reacción con Para-cloromercuriobenzoato (PCMB), indica que la enzima puede poseer 5 sitios activos por molécula, lo cual debería ser compatible con un modelo de 10 subunidades. Por otro lado, el análisis electroforético sugiere que la molécula presenta dos subunidades grandes diferentes de 90,000 y 120,000 daltones. El punto isoeléctrico de la mayor isoenzima es de 5.1, comparado con el de 4.61 reportado para la enzima de *E. coli*

Tabla 2

PROPIEDADES DE LA β -GALACTOSIDASA DE DIVERSOS
MICROORGANISMOS (Canales 1985)

Fuente de la enzima	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Peso molecular (KD)
<i>Aspergillus niger</i>	3-4	55-60	124
<i>Aspergillus oryzae</i>	5	50-55	90
<i>Kluyveromyces lactis</i>	7-7.3	37	135
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6.6	37	201
<i>Candida pseudotropicalis</i>	7.5	30	215
<i>Escherichia coli</i>	7.2	40	465
<i>Bacillus sp.</i>	6.8	65	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	7	42-45	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	6-7	55	500-600

(Craven 1965). El coeficiente de extinción molar de la β -galactosidasa determinado a 280 nm es de 1.58 cm^2 por mg de proteína y la relación de A280 / A260 es 1.60.

La composición de aminoácidos de la enzima es completamente diferente de los analizados para las β -galactosidasas de varias bacterias. La lactasa de *Kluyveromyces fragilis* carece de carbohidratos y presenta más del 30% de aminoácidos hidrofóbicos en su composición (Mahoney y Whitaker 1978), (tabla 3).

III.2.B Características cinéticas

pH óptimo para la actividad y estabilidad de la β -galactosidasa

Al hablar en general de las lactasas de levadura encontramos que el pH óptimo de esta enzima se sitúa en un rango de entre 6 y 7, diferenciando notablemente de los valores reportados para bacterias que es entre 7 y 8 y para hongos que es cercano a 5 (tabla 2).

En preparaciones puras de lactasa de *Kluyveromyces fragilis* el pH óptimo está entre 6.6 y 6.8, el cual es 0.5 unidades de pH más alto que el del complejo enzima sustrato (Mahoney y Whitaker 1975). En extracto crudo el pH óptimo de la β -galactosidasa medido a 37°C está entre 6.3 y 6.5 (Castillo y Sánchez 1980; Wendorff y Amudson 1971).

A partir de la influencia del pH sobre la K_m y la velocidad máxima en la hidrólisis de orto nitrofenol β -galactopiranosido (ONPG), con β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* se ha deducido la existencia de dos grupos ionizables : un grupo imidazol no protonado con un pK de 6.39 y un grupo con un pK de 7.23 el cual pudiera ser un imidazol o un sulfhidrilo o el grupo amonio de un aminoácido N-terminal (Mahoney y Whitaker 1977).

Tabla 3

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA β - GALACTOSIDASA DE

Kluyveromyces fragilis (Mahoney y Whitaker 1978)

AMINOACIDO	PORCENTAJE
Acido aspártico	12.5
Acido glutámico	10.8
Leucina	7.8
Lisina	7.6
Glicina	6.9
Valina	6.4
Fenilalanina	5.8
Isoleucina	5.4
Alanina	5.1
Tirosina	5.1
Serina	4.9
Prolina	4.7
Treonina	4.6
Histidina	3.8
Arginina	3.3
1/2 Cistina	2.3
Triptofano	1.9
Metionina	0.5

La β -galactosidasa se mantiene estable en un rango de pH entre 6.5 y 7.5 por al menos 10 minutos a 37°C, arriba de pH 8 y abajo de 6.5 la enzima es inestable (Mahoney y Whitaker 1977)

Wendorff y Amudson (1971) reportan que la preparación de β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* parcialmente purificada es estable durante 30 minutos a 25°C en un rango de pH de 6 a 7, pero se inactiva rápidamente a pHs menores de 5.5. En las mismas condiciones Chan (1971) encontró que su extracto enzimático se conservaba estable en un rango de 6 a 8.5, mientras que por abajo de 5 perdía completamente su actividad.

Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la β - galactosidasa.

El efecto de la temperatura sobre la actividad de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* fué estudiada por Wendorff y Amudson (1971) en un intervalo de 5 a 45°C. Sus resultados indican una temperatura óptima entre 35 y 45°C y una energía de activación promedio de 12.9 Kcal/mol. Por otro lado Mahoney y Whitaker (1977) estudiaron el efecto de la temperatura sobre la K_m y V_{max} , llegando a la conclusión de que la K_m es independiente de la temperatura en un rango de 20 a 45°C mientras que la velocidad máxima se incrementa 2.7 veces si la temperatura se incrementa de 25 a 45°C.

Mahoney y Whitaker (1977) reportan que la velocidad de inactivación de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* a pH 7 y diversas temperaturas se asemeja a una reacción de primer orden. La enzima es estable hasta 34°C, mientras que a 40°C se inactiva por desnaturalización. Cuando las constantes de primer orden son graficadas contra el recíproco de la temperatura se obtiene una energía de desnaturalización de 56 Kcal/mol.

Finalmente Uwajima *et al* (1972) encontraron que la β -galactosidasa de *K. fragilis* es estable durante 10 minutos pH 7 y temperaturas de hasta 40°C; sin embargo, la enzima se desnaturaliza rápidamente por arriba de esta temperatura.

Efectos de diversos iones sobre la actividad y estabilidad de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis*

Al igual que muchas enzimas, la actividad de la β -galactosidasa se ve influenciada por la presencia de iones en solución (tabla 4). Uwajima *et al* (1972) reportan que los iones de potasio en concentraciones de 0.1 M incrementan la actividad lactasa de *K. fragilis*. Por otro lado, el magnesio y el manganeso en concentraciones 0.001 M y 0.0001 M respectivamente, incrementan la velocidad de hidrólisis de lactosa en amortiguador de fosfato de potasio a pH 7. Sin embargo, los iones potasio no pueden ser reemplazados por sodio, magnesio o manganeso.

El potasio en concentraciones de 0.01 M estabiliza la enzima durante una hora. Además la adición de iones manganeso confiere a la lactasa de levadura una mayor estabilidad a las condiciones extremas de temperatura (Wendorff y Amudson 1971). Los metales pesados como el zinc (5×10^{-3} M), y el cobre (5×10^{-3} M), ejercen un efecto fuertemente inhibitorio sobre la actividad de la enzima (Mahoney y Whitaker 1977)

Finalmente, la diálisis de la enzima contra agua desionizada provoca una pérdida irreversible de la actividad de la β -galactosidasa (Mahoney y Whitaker 1977).

Efecto de la concentración del sustrato y productos sobre la actividad de la β -galactosidasa.

La β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* actúa sobre una amplia variedad de β -galactósidos y es específica respecto a la parte galactosida de la molécula del sustrato. La β -galactosidasa hidroliza la lactosa, orto y para - nitrofenol β -D-galactopiranosidos pero no tiene actividad sobre O-nitrofenol- α -D-galactopiranosido (Mahoney y Whitaker 1977).

La misma enzima cataliza reacciones de transglicosidación cuando el aceptor es diferente al agua, formandose mediante este proceso disacáridos y trisacáridos. La cantidad de estos azúcares dependerá de la naturaleza y origen de la enzima, la

Tabla 4
EFFECTO DE DIVERSOS IONES SOBRE LA ACTIVIDAD DE
LA β -GALACTOSIDASA DE *Kluyveromyces fragilis*
(Wendorff y Amudson 1971; Mahoney y Whitaker 1977)

#	CONCENTRACION DEL ION (M)	ACTIVIDAD RELATIVA (%)
	Sin adición de iones	100
Mn ²⁺	1x10 ⁻⁷	93
	1x10 ⁻⁶	176
	1x10 ⁻⁵	287
	1x10 ⁻⁴ -1x10 ⁻²	300
Mg ²⁺	1x10 ⁻⁴ -1x10 ⁻²	150
Zn ²⁺	1x10 ⁻³	0
Ca ²⁺	1x10 ⁻¹	30
Na ⁺	1x10 ⁻³	42
Ag ⁺	1x10 ⁶	0
Hg ²⁺	1x10 ⁻⁶	0

Actividad relativa a la medida utilizando amortiguador
de fosfatos de potasio 0.05M pH 7

concentración del sustrato y el momento en que entran en contacto la enzima y el sustrato.

Las constantes cinéticas calculadas por el método de Lineweaver- Burk (tabla 5), se encuentran en un rango de 2.5 a 3.0 mM para K_m y de 0.66 a 3 μ moles de producto liberado por minuto para V_{max} cuando se utiliza ONPG como sustrato. Cuando se hidroliza lactosa los valores reportados de K_m son de 14-24 mM y de V_{max} de 1.0 a 10 μ moles de glucosa producida por minuto (Wendorff y Amudson 1971; Uwajima 1972; Mahoney y Whitaker 1977).

Los números de recambio calculados para un peso molecular de 201,000 es de $3.41 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$ para ONPG y $1.51 \times 10^3 \text{ S}^{-1}$ para lactosa a pH de 6.60 y 37°C (Mahoney y Whitaker 1977).

Tanto la galactosa como la glucosa producidas por hidrólisis de lactosa inhiben la actividad de la β -galactosidasa. La galactosa se comporta como un inhibidor competitivo mientras que la glucosa como un inhibidor no competitivo. (Wendorff y Amudson 1971).

La constante de inhibición (K_i) reportada para galactosa es de 27.7 mM; 10 veces mayor que el valor de K_m medido con ONPG y casi dos veces más alto que la K_m calculada para lactosa como sustrato. Además de los productos de hidrólisis los tiogalactosidos inhiben competitivamente la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* (Mahoney y Whitaker 1977).

Estabilidad de la enzima en almacenamiento.

Los estudios de estabilidad al almacenamiento de la β -galactosidasa han demostrado que la enzima pura conserva más del 80% de su actividad original cuando se almacena en amortiguador de fosfatos con magnesio y manganeso 0.5 y 0.1 mM respectivamente, durante seis meses a 2°C . A 22°C la enzima sólo retiene el 10% de su actividad después de una semana de almacenamiento (tabla 6).

Tabla 5

CONSTANTES CINÉTICAS PARA LACTASAS
DE LEVADURA

FUENTE DE LA ENZIMA	K_m (mM)	V_{max} $\frac{\mu\text{moles prod}}{\text{min} \times \text{mg prot.}}$	K_i (mM)
<i>K. lactis</i> ^a			
ONPG	1.6	143	46 (Galactosa)
Lactosa	12-17		340 (Glucosa)
<i>K. fragilis</i> ^b			
ONPG	2.72	960	27.7 (Galactosa)
Lactosa	13.90		
<i>K. bulgaricus</i> ^c			
ONPG	30-59		
<i>C. pseudotropicalis</i> ^c			
ONPG	3.06	63	

a) Dickson y Markin (1979)

b) Mahoney y Whitaker (1977)

c) Takatoshi *et al* (1982)

Tabla 6
ESTABILIDAD AL ALMACENAMIENTO DE LA β -GALACTOSIDASA DE
Kluyveromyces fragilis (Mahoney y Whitaker 1977)

Estado de la Enzima	Temperatura de almacenamiento	Tiempo de almacenamiento	Actividad Conservada
ENZIMA PURA	2°C	6 Meses	80%
	22°C	1 Semana	10%
EXTRACTO CELULAR	-20°C	12 Meses	100%

Almacenados en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M pH 6.6 con magnesio y manganeso 0.5 y 0.1 mM

Cuando la enzima se almacena en preparaciones crudas esta mantiene su actividad durante un año a 20°C. Los componentes sulfihidrilos tales como el β - mercaptoetanol y el ditiotreitól estabilizan la enzima contra desnaturalización durante el almacenamiento (Wendorff y Amudson 1971; Mahoney y Whitaker 1977).

III.3 Producción y Recuperación de la β -galactosidasa

Comercialmente la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* se produce en cultivo sumergido a partir de suero de leche, fuente única de lactosa, suplementado con nitrógeno inorgánico y una fuente de vitaminas como el extracto de levadura o licor de remojo de maíz. Las condiciones de producción y optimización del producto están ampliamente estudiadas y al respecto existe una gran cantidad de reportes tanto a nivel de laboratorio como a escala piloto e industria (García-Garibay 1986).

Sin embargo es sorprendente la carencia de literatura científica en relación al desarrollo y optimización de operaciones unitarias con el objetivo de extraer y purificar la β - galactosidasa de levadura. Esta carencia de información ha sido enfatizada por algunos autores, en lo general para la recuperación de enzimas intracelulares. El problema parece particularmente crítico para la enzima en cuestión, aún cuando las técnicas de purificación de enzimas a nivel de laboratorio han alcanzado un alto grado de depuración.

Por otra parte, es evidente que las industrias que actualmente producen la enzima han establecido las metodologías de recuperación del producto; no obstante, tales procesos son mantenidos bajo secrecía y por tanto no son del dominio público.

Los procesos de recuperación de enzimas intracelulares reportados en la literatura (tabla 7), incluyen por lo general una

Tabla 7

SECUENCIA DE LAS OPERACIONES USADAS EN LA RECUPERACION DE
ENZIMAS INTRACELULARES (Nevile y Lilly 1984)

Etapa de recuperación	Operaciones de recuperación	Método empleado
Primera	Cosecha celular	Centrifugación Filtración
Segunda	Ruptura celular	Mecánica No mecánica
Tercera	Extracción	Líquido-Líquido Sólido-Líquido
Cuarta	Concentración y enriquecimiento	Precipitación Ultrafiltración Microfiltración
Quinta	Purificación de Alta resolución	Cromatografía Procesos Electrocínéticos

secuencia común de pasos de purificación consistente en la extracción, eliminación de ácidos nucleicos y precipitación, seguidos de uno o más pasos cromatográficos para lograr una pureza más alta (Nevile y Lilly 1984)

En lo que se refiere a la recuperación de la β -galactosidasa de levadura, la información existente señala dos tendencias principales en la obtención del producto: la primera es la ruptura de las células con objeto de extraer y purificar la enzima. La segunda es la de efectuar una ruptura parcial de la pared celular de modo que la enzima no sea secretada al espacio extracelular pero que la lactosa y sus productos de hidrólisis puedan difundir libremente a través de la cubierta celular sin que medie un transporte activo. En este último caso se utilizan las células completas como preparado crudo enzimático.

En cualquier caso, es muy importante que no subsistan actividades enzimáticas extrañas a la actividad de β -galactosidasa, como podrían ser enzimas proteolíticas, o la actividad conocida como zimasa, que es la capacidad de metabolizar los azúcares para la producción de alcohol y dióxido de carbono a través de la vía glicolítica, situación que afecta las propiedades organolépticas de la leche y el suero (García-Garibay 1986).

Mediante la primera estrategia se obtiene un producto más puro, con menos enzimas contaminantes que no producirá sabores ni alterará el aspecto de la leche o el producto lácteo donde sea utilizado. La segunda estrategia conduce a un producto de menor costo pero con menor actividad enzimática y con el riesgo de contener actividades residuales.

En la tabla 8 se citan las metodologías más empleadas en la recuperación a gran escala de la β -galactosidasa y sus principales características. A continuación se revisarán con más detalle aquellas relacionadas con la ruptura celular y la extracción de la

Tabla 8

OPERACIONES EMPLEADAS EN LA RECUPERACION A GRAN ESCALA
DE LA β -GALACTOSIDASA (Varela 1987)

OPERACION	METODO EMPLEADO	COMPANIA
Recolección celular y lavado	Centrifugación	Gist Brocades Rohm Lactaid
Ruptura celular y extracción	Lisis con solventes orgánicos	Gist Brocades Rohm
Eliminación de solventes	Centrifugación Filtración	Gist Brocades Rohm
Purificación	Ultrafiltración y cromatografía	Gist Brocades
Concentración y Formulación	Secado Uso de polioles y agentes estabilizantes	Gist Brocades Rohm

enzima.

III.3.1 Ruptura celular

Se han reportado diversos métodos de ruptura celular para la extracción de enzimas intracelulares, pudiéndose clasificar en procesos mecánicos y no mecánicos (figura 2)

Los métodos mecánicos que se utilizan a gran escala y aquellos que pueden implementarse en la industria son adaptaciones derivadas de máquinas construídas para el fraccionamiento de material no celular, incluyéndose dentro de este grupo el homogenizador de alta presión, el molino de alta velocidad y la ultrasonicación.

Los métodos no mecánicos han servido como base para la obtención de productos de interes comercial. Estos métodos comparten la característica común, de que son aplicados exitosamente sobre un microorganismo particular para la recuperación de una enzima específica y permiten la destrucción selectiva de enzimas que pueden interferir con su aplicación.

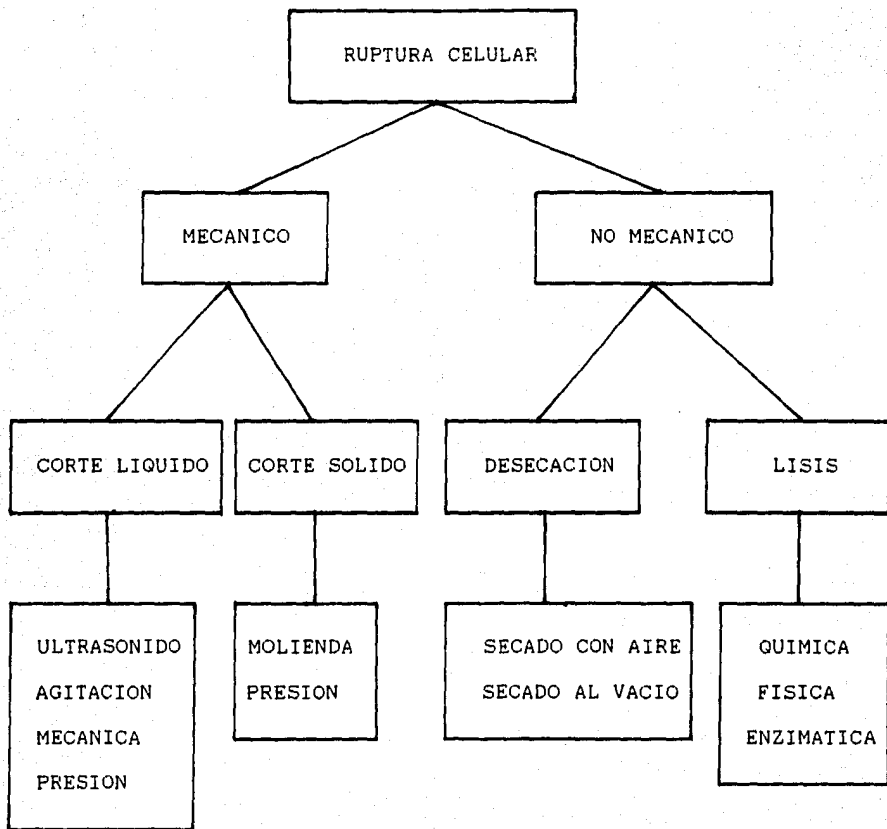
Los métodos no mecánicos más utilizados a gran escala incluyen: la lisis química a través de solventes orgánicos y la ruptura celular mediante tratamiento físico.

Ruptura mecánica con homogenizador

La ruptura de células mediante el uso de homogenizadores es una operación eficiente, versátil y de fácil implementación. En estos equipos la ruptura celular se logra por las altas presiones y efectos de corte a los que se ve sujeto el microorganismo. Las presiones de operación son de alrededor de 350 Kg/cm^2 y se pueden manejar volúmenes de hasta 900 l/h (Dunill 1972). Sin embargo la temperatura de la suspensión celular tiende a incrementarse afectando de esta manera la integridad de la enzima y el rendimiento en la recuperación (Wang et al 1979)

FIG 2 METODOS DE RUPTURA CELULAR

(Wang *etal* 1979; Aiba *etal* 1973)



Ruptura mecánica por molienda.

Los métodos de molienda son una excelente forma de desintegración celular. En este tipo de equipos la ruptura celular se produce como un resultado de las fuerzas de corte producidas entre los gradientes de velocidad, además de las colisiones entre microorganismos y el material abrasivo.

La molienda puede ser usada tanto en pequeña escala o en equipo continuo capaz de procesar hasta 50 Kg de pasta celular por hora. La principal desventaja de estos equipos es la cantidad de calor generado, por lo que a gran escala es necesario la adaptación de equipos adicionales de enfriamiento para el mantenimiento de temperaturas bajas (Melling y Phillips 1975).

Ruptura celular por ultrasonificación

La ultrasonificación es un método mecánico de corte en líquido para la ruptura celular el cual ha recibido particular atención en la literatura.

En la ultrasonificación aplicada a soluciones, se crean áreas de rarefacción y compresión, en las cuales se forman cavidades que rápidamente se colapsan en el intercambio de una área de rarefacción a una de compresión. Las burbujas producidas en las cavidades son así comprimidas y durante su colapso generan ondas de choque que son finalmente el elemento destructivo de la pared celular.

Aunque el tratamiento ultrasónico ha probado ser un método útil y versátil a escala laboratorio, su aplicación a la ruptura de grandes cantidades de microorganismos se ve limitada por la dificultad de transmitir una potencia suficiente a grandes volúmenes de suspensión, aunado al hecho de que este proceso provoca efectos químicos tales como la formación de radicales libres (Yusuf y Murray 1986).

Ruptura no mecánica por agentes químicos

Existe la posibilidad de romper la pared celular mediante el uso de enzimas y disolventes orgánicos, la primera alternativa es aún demasiado costosa para ser practicable a gran escala (Reed 1982).

La utilización de disolventes con este fin presenta varios inconvenientes ya que la mayoría de ellos son incompatibles con productos alimenticios por su toxicidad y por lo tanto debe asegurarse su total eliminación del producto final. Los solventes son generalmente flamables y explosivos, lo que demanda estrictas medidas de seguridad industrial. Además, la ruptura celular mediante esta técnica es difícil de optimizar a gran escala (Wang *et al* 1979).

Ruptura no mecánica por desecación

El secado con aire es uno de los métodos más antiguos para la ruptura de células microbiales. Dentro de estos métodos el secado por aspersión ofrece amplias ventajas ya que es una operación unitaria plenamente estudiada e implementada a nivel industrial para diversos usos, y por lo tanto se encuentra optimizada en términos de costos, beneficios, diseño de equipos y control de variables (Brennan *et al* 1970).

Stimpson y Sayuille (1954) reportaron que el secado por aspersión permite obtener células un producto a base de células de levadura con alta actividad lactasa y baja actividad de zimasa. Las temperaturas usadas en este trabajo fueron de 120°C de aire caliente y 77°C de aire húmedo, usando concentraciones de sólidos en la alimentación del 10 al 18%.

Johnson (1977) consiguió lisar células de levadura bajo condiciones suaves y sin degradación cuando el microorganismo fue sometido previamente a un choque térmico. Este proceso consiste esencialmente en suspender la levadura en agua concentraciones entre el 5 y el 18% y alimentarlas a un secador por pulverización

con temperaturas de aire caliente de 150°C a 400°C. Posteriormente el producto seco se somete a autólisis en condiciones extremadamente suaves.

El secado por aspersión es utilizado por la compañía Sugarlo de E.U.A. para la obtención de su producto enzimático "Lact aid" (Lactasa de *Kluyveromyces lactis*). Las células permeabilizadas se mezclan con glicerol y agua con el objeto de estandarizar la actividad y conferirle mayor estabilidad al producto (García-Garibay 1986).

IV METODOLOGIA

IV.I Producción de *Kluyveromyces fragilis*

El organismo utilizado en el presente estudio fué *Kluyveromyces fragilis*, NRRL Y 1109 obtenido de la Universidad de Davis California. La preparación del medio de cultivo, así como las condiciones de crecimiento celular se basaron en el método de producción de β galactosidasa descrito por Casas *et al* (1987)

IV.1.A Composición del medio

El medio utilizado para el crecimiento del inóculo y producción celular contenía los siguientes ingredientes :

	(g/l)
Suero lactosado	66.6
Lactosa	50.0-
Extracto de levadura	7.5
Sulfato de amonio	8.4
Fosfato de potasio dibásico	4.5
Sulfato de magnesio	0.5

El valor de pH fué ajustado a 5.5 con H_2PO_4 (ácido fosfórico). La cepa se conservó en tubos inclinados con medio sólido "Slants" con agar al 2% y los mismos compuestos antes mencionados salvo el suero lactosado que fué sustituido por lactosa al 5% .

IV.1.B Preparación de inóculos

Slants

La cepa se sembró por asada en tubos de enaye de 16 x 150 con 20 ml de medio sólido inclinado y se incubó a 29°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se almacenaron a 4°C para su utilización posterior como inóculos de medio líquido.

Inoculos de 1 y 10 litros

Para la producción del inóculo de 1 litro, se sembraron 3 azadas de células del slant en un litro de medio líquido y se incubó a 29°C y 200 rpm durante 20 horas. En la preparación de la semilla en 10 litros se inocularon 9 litros de medio (con la cantidad de reactivos para 10 litros), con las células crecidas previamente en un litro y se incubaron a 29°C, 200 rpm y 0.2 vvm durante 12 horas en fermentador de 14 litros tipo Labroferm New Brunswik.

IV.1.C Producción en 100 litros

La producción de células en 100 litros fué realizada por fermentación en planta piloto en un tanque de acero inoxidable, con volumen nominal de 130 litros, agitación mecánica y dispersión de aire multiesférico. 90 litros de medio con suero lactosado fueron inoculados con 10 litros de cultivo de *Kluyveromyces fragilis* previamente preparados, la temperatura durante la fermentación se mantuvo mediante control manual a 29°C. La agitación fué de 235 rpm y la aireación de 0.1 vvm. En promedio el tiempo de producción fué de 12 horas.

IV.2 RECUPERACION DE LA ENZIMA

IV.2.A Centrifugación del caldo de cultivo

Dependiendo del volumen de producción, 10 o 100 litros, las células se cosecharon por centrifugación utilizando tanto la supercentrifuga tubular Sharples Cl-T-1 con capacidad máxima de 600 cm³ y el modelo AS-16 con una capacidad máxima de 6000 cm³.

Para el primer caso, las condiciones de operación usadas fueron de 21,000 rpm con un flujo de 250 ml/min y para el segundo se usó un flujo de 1 l/min y 15,000 rpm. La pasta celular obtenida se resuspendió a diferentes concentraciones, 10, 15 y 20% en agua destilada con ayuda de un agitador mecánico tipo RZR1 Caframo.

IV.2 B Secado de la levadura

Secado en el rotavapor

Las células resuspendidas al 10% se secaron en un rotavapor marca Buchi Modelo R-110 con control automático de temperatura. Las condiciones utilizadas fueron 35, 40 y 45°C de temperatura con una presión absoluta de 31.2 mmHg durante 5 horas de operación.

Secado por aspersión

El producto resuspendido al 10, 15 y 20% (p/v), se secó por aspersión en un atomizador Niro para producción a pequeña escala tipo P-6,3, con atomizador rotatorio en corriente paralela. Se utilizaron temperaturas de aire caliente de 110, 140 y 160°C y 60, 80 y 96°C de aire húmedo, con un flujo de aire de 400 kg/hr y una velocidad de atomización de 20 000 rpm. El volumen promedio de alimentación fué de 5 litros y la temperatura de la muestra fué de 23°C

IV.2.C Extracción de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis*

Se utilizaron 10 g de células secas obtenidas en el rotavapor bajo las condiciones de máxima expresión de la actividad lactasa, las cuales fueron resuspendidas en 60 ml de amortiguador de fosfatos de potasio 0.1M pH 6.6 durante una hora a temperatura ambiente. Después de este tiempo, la suspensión se centrifugó durante 15 minutos a 5000 rpm para remover los cuerpos celulares y el sobrenadante recuperado con actividad lactasa se concentró por evaporación a 35°C durante 30 minutos hasta un volumen aproximado de 10 ml. La actividad del producto fue medida por el método de ONPG y el contenido de proteína por el método de Lowry (1951)

IV.3 CARACTERIZACION DEL PRODUCTO

IV.3.A Determinación de la concentración celular

La concentración celular se determinó por turbidimetría midiendo la absorbancia de la muestra a 650 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo 35 y extrapolando el valor a una curva de peso seco.

La curva de peso seco se construyó, midiendo la absorbancia de diferentes suspensiones celulares diluidas 1:50 al mismo tiempo que se filtraron al vacío en membranas Millipore y se secaron a peso constante. Los pesos obtenidos se relacionaron con los valores de absorbancia mediante la siguiente ecuación:

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

IV.3.B Determinación de la actividad de la lactasa usando ONPG (orto-nitrofenol β -galactosido) como sustrato

La medición de actividad se basó en la hidrólisis del cromógeno ONPG por la enzima β -galactosidasa. El método utilizado es el elaborado por Lederberg (1950) posteriormente modificado por Kuby (1953) y adaptado por nosotros para células libres de *Kluyveromyces fragilis*, así como para el producto seco.

El glicósido ONPG que es incoloro, cuando se pone en contacto con la enzima se hidroliza, liberándose una mol de galactosa y una de ONP (orto nitrofenol), por cada mol de ONPG hidrolizado. El ONP liberado se detecta colorimétricamente debido a que en solución produce una coloración amarilla. La coloración será proporcional a la actividad enzimática y al tiempo de hidrólisis. La medición se realiza en un espectrofotómetro a 410 nm de longitud de onda a la cual se obtiene la máxima absorbancia del compuesto colorido ONP.

REACTIVOS

O- nitrofenol β -galactosido 0.068 M
 β -mercaptoetanol 3.36M

Solución amortiguadora de fosfatos de potasio 0.1 M con 1mM de Mg^{++} y 0.1 mM de Mn^{++} (amortiguador de trabajo).

Descripción de la técnica para células frescas

Debido a que la β -galactosidasa es una enzima intracelular, es necesario permeabilizar las células para detectar la actividad enzimática, procediéndose para esto de la siguiente forma :

En un matraz aforado de 25 ml se colocaron 12.5 mg de células recién cosechadas, adicionando 5 ml de alcohol isoamílico y aforando con amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M con Mg^{++} y Mn^{++} , 1.0 y 0.1 mM respectivamente pH 6.6. La suspensión celular, con una concentración de 0.5 mg/ml, se agitó durante una hora en una placa de giro vertical suave. Posteriormente se agregaron 0.1

ml de células permeabilizadas a la mezcla de reacción (2.7 ml de amortiguador de trabajo 0.1 ml de la solución de β -mercaptoetanol y 0.1 ml de de la solución de ONPG). La absorbancia se registró a 410 nm cada 30 segundos durante 4 minutos a una temperatura de 40°C en un espectrofotómetro Beckman modelo 35 con control de temperatura.

La concentración de ONP liberado se calculó por medio de una curva tipo con los siguientes valores :

$$\mu\text{moles de ONP/ml} = \frac{\text{Abs} + 0.0019}{1.18(\text{Coeficiente de extinción molar del ONP})}$$

Finalmente, la concentración de producto obtenido se graficó en función del tiempo de reacción, obteniéndose una recta cuya pendiente fué igual a la velocidad de la hidrólisis o actividad total (μ moles de ONP/ min). La actividad específica se obtuvo dividiendo la actividad total entre las cantidades de células utilizadas en la reacción esto es: Act. esp. = Actividad total/g de células.

En nuestro estudio una unidad de actividad en ONPG es definida como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de orto-nitrofenol por minuto bajo las condiciones de reacción anteriormente descritas.

Descripción de la técnica para medición de actividad intra y extracelular del producto seco

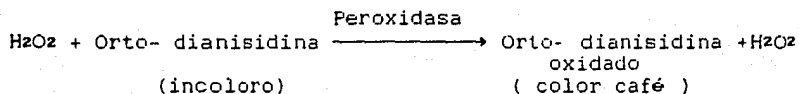
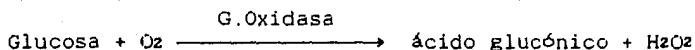
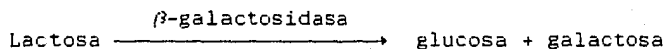
El producto seco que se obtuvo tanto en el rotavapor como por atomización se resuspendió en 100 ml de amortiguador de trabajo para dar una concentración celular de 0.5 mg/ml y se agitó en una placa magnética durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de tal tiempo se tomaron 0.1 ml de la solución y midió la actividad lactásica, según la técnica descrita anteriormente

La actividad intra y extracelular se midió resuspendiendo 75

mg de producto seco en 100 ml de amortiguador de trabajo y agitando a temperatura ambiente durante 15 minutos: de aquí se centrifugaron 5 ml de suspensión durante 15 minutos a 5 000 rpm. Posteriormente se separó el sobrenadante del paquete celular y este último se resuspendió en 5 ml de amortiguador de trabajo. La actividad láctica fue medida tomando 0.1 ml de ambas fases y usando el método del ONPG.

IV.3.C. Determinación de la actividad de la lactasa usando lactosa como sustrato.

La forma en que se midió la actividad enzimática por hidrólisis de lactosa se basa en la detección colorimétrica de glucosa mediante la acción acoplada de dos enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa, las cuales generan un reactivo cuya intensidad de color es proporcional a la concentración original de glucosa y se debe a la oxidación del O- dianisidina que acepta el oxígeno que resulta de la acción de peroxidasa. Las reacciones involucradas en el método son las siguientes :



REACTIVOS

Equipo de ensayo de glucosa Sigma (cat.no.510 DA) con:

Glucosa oxidasa (GO)

Peroxidasa

Orto- dianisidina

Solución estandar de glucosa (1 mg/ml)

Hidróxido de bario 0.3 N (BaOH)

Preparación enzimática

Se disolvió el contenido de una cápsula del kit, con 500 unidades de G. O y 100 unidades de peroxidasa, en 100 ml de agua destilada. Posteriormente se combinó la solución con 1.6 ml de orto-dianisidina.

Procedimiento

- A) A un tubo marcado como blanco se agregaron 0.5 ml de agua destilada.
- B) A un tubo marcado como ST. se añadieron 0.5 ml de la solución estandar de glucosa diluída 1:20.
- C) A los tubos marcados como muestra problema se les agregaron 0.5 ml de una dilución 1:20 de las muestras obtenidas de la hidrólisis enzimática.
- D) Se adicionó a cada tubo 5 ml de solución enzimática - reactivo de color.
- E) Se incubaron todos los tubos a 37°C durante 30 minutos.
- F) Al final del período de incubación se leyeron las muestras a 450 nm en el espectrofotómetro, usando la solución blanco como referencia. El cálculo de la cantidad de glucosa se hizo relacionando la absorbancia de la muestra problema con el standard de tal forma que :

$$\text{Glucosa (mg/ ml)} = \frac{\text{A problema}}{\text{A estandar}}$$

La velocidad de hidrólisis enzimática se obtuvo transformando la concentración de glucosa en $\mu\text{moles/ml}$ y graficando los valores en función del tiempo, la pendiente de la curva será igual a la velocidad así que :

$$V_i = \frac{\mu\text{moles glucosa}}{\text{ml min}}$$

En nuestro estudio, una unidad de actividad lactosa de β -

galactosidasa es definida como la cantidad de enzima que libera una μmol de glucosa por minuto bajo las condiciones de reacción descritas.

En el caso en que se trabajó con suero o leche en polvo, fué necesaria la desproteínización de la muestra, la cual se llevó a cabo de la siguiente manera :

- G) Se etiquetaron tubos como blanco, estandar y los correspondientes a la muestra de hidrólisis.
- H) Se adicionó al blanco 2 ml de agua destilada, al estandar 2 ml de solución glucosada diluída 1:10 y a los tubos problema 2 ml de muestra diluída 1:10 .
- H) A cada tubo se agregó 1 ml de solución de hidróxido de bario y 1 ml de sulfato de zinc, mezclando vigorosamente.
- I) Las muestras se centrifugaron para obtener un sobrenadante claro, del cual se transfirieron 0.5 ml de cada tubo a otra serie de tubos etiquetados.
- J) Se agregó la solución enzimática y se procedió a partir de aquí, como en E y F.

IV.3.D Hidrólisis de la lactosa en leche y suero

Para la realización de estas pruebas se prepararon 250 ml de una solución de suero y leche en polvo con el 5% de lactosa, las cuales fueron tratadas con 0.25 ml de producto enzimático a pH 6.6 con una actividad de 1000 U/ml. Las muestras se incubaron durante cuatro horas a 40°C en agitación, tomándose muestras de 3 ml durante cada hora e inactivándolas por calentamiento durante cinco minutos. La cantidad de glucosa fué medida mediante el método de glucosa oxidasa (Sigma), previa desproteínización de la muestra.

IV.3.E Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de la β -galactosidasa

El efecto del pH sobre la actividad de β -galactosidasa fue estudiada en un rango de pH de 5.6 a 8.0 en amortiguador de fosfato de potasio 0.1M con iones de magnesio y manganeso a 40°C. El efecto de la temperatura fue determinada en el mismo amortiguador a pH 6.6 en un rango de temperatura de 25° a 60°C usando la cantidad de producto equivalente a 10 μ g de proteína en un volumen de reacción de 3.0 ml. La actividad fue medida según el método de ONPG y el cálculo de la energía de activación se hizo mediante la ecuación de Arrhenius.

IV.3.F Efecto de la concentración de sustrato y productos sobre la velocidad de hidrólisis.

En la estimación de las constantes cinéticas, K_m y V_{max} se probó lactosa y ONPG como sustrato. Cuando se utilizó la lactosa, la reacción se llevó a cabo en un volumen de 21.0 ml en un rango de concentración de 7.3 de 146 mM y con una cantidad de enzima de 75 μ g/ml incubándose en el amortiguador de trabajo a pH 6.6 a 40°C. Las muestras se tomaron cada minuto en un periodo de 5 y se inactivaron colocándolas en baño a ebullición.

La concentración de glucosa se midió mediante el método de glucosa oxidasa (Sigma) y la velocidad inicial se obtuvo graficando la concentración de glucosa (μ moles/ml) en función del tiempo.

En la determinación de K_m y V_{max} con ONPG como sustrato, se probaron concentraciones de 0.227 mM a 7.94 mM de sustrato análogo en un pH de 6.6 a 40°C. En los estudios de inhibición se utilizó glucosa y galactosa en concentraciones de 10 a 250 mM y la estimación de K_i para galactosa se hizo empleando 50, 100 y 150 mM de este monosacárido. La cantidad de producto usado en ambas pruebas fue el equivalente a 10 μ g de proteína en un volumen de 3

ml y la velocidad de reacción se midió según el método del ONPG. El cálculo de K_m , V_{max} y K_i se obtuvo a partir del modelo de Lineweaver-Burk.

IV.3.6 Determinaciones de estabilidad.

La estabilidad en almacenamiento de la β -galactosidasa se determinó en tres productos : células secas en rotavapor, su extracto enzimático y células secas por aspersión.

Los primeros dos productos fueron almacenados durante 200 días a 4 y 22°C en amortiguador de fosfato de potasio 0.1M pH 6.6 con las siguientes concentraciones de magnesio y manganeso : 0.1, 1.0 y 10 mM de Mg ; 0.01, 0.1 y 1.0 mM de manganeso y 0.1 y 1.0 mM de Mn y Mg respectivamente. La cantidad de producto almacenado fue el equivalente a 35 μ g de proteína en 50 ml de soluciones amortiguadoras.

Por otro lado, 500 mg de las células que se obtuvieron por secado de aspersión se resuspendieron en 10 ml de glicerol y manitol en las siguientes concentraciones: 10, 30, 50, 70 y 90% de glicerol y 3, 10, 15 y 20% de manitol almacenándose a temperatura ambiente y 4°C. Además se almacenaron células secas en amortiguador de fosfato de potasio 0.1M pH 6.6 con 1 y 0.1 mM de Mg y Mn. El tiempo de almacenamiento fue de 100 días y la actividad enzimática se midió mediante el método del ONPG.

El efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima fue determinado a 25°C mezclando 250 μ g de proteína en 3 ml de amortiguador patrón en un rango de pH de 5.6 a 8.0 durante veinte minutos, tomándose alicuotas de 100 μ l cada cinco minutos y midiéndose la velocidad de hidrólisis en condiciones de reacción estandar. El efecto de la temperatura se determinó midiendo la actividad remanente después de incubar la enzima durante 20 minutos a pH 6.6 en un rango de temperatura de 41 a 49°C. Las muestras se tomaron cada cinco minutos y se ensayaron para

actividad enzimática a 40°C según el método del ONPG.

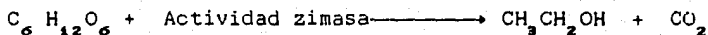
IV.3.H Determinación del peso molecular de la enzima

El peso molecular de la enzima se estimó por cromatografía de filtración en gel. Para este propósito se empleó una columna de 2.6 cm de diámetro y 69 cm de longitud empacada con 366 ml de Sephadex G- 200 (Pharmacia) y equilibrada con amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M pH 6.6.

La cantidad de muestra aplicada fué de 10 ml de extracto celular con una actividad específica de 12.77 U/mg de proteína y previamente centrifugado a 12 000 rpm, el flujo de operación promedio fué de 12 ml/hr y la muestras eluidas se recogieron con un colector de fracciones automático de reloj. El volumen disponible V_0 fué determinado con azul dextran 2000 y la curva de calibración se montó utilizando albumina (Sigma cat.no.A-7906), aldolasa (Sigma cat.no A-6253) y catalasa (Sigma cat.no.C-3515). El contenido de proteína del eluido fué medido a 280 nm y la actividad enzimática se determinó mediante el método del ONPG.

IV.3.I Medición de la actividad de zimasa

La actividad zimasa se define como la actividad producida por el paquete enzimático de la vía glicolítica que lleva a la degradación de glucosa hasta alcohol y bióxido de carbono, siendo el balance de la reacción el siguiente :



La actividad de este conjunto de enzimas se puede cuantificar mediante la desaparición del sustrato inicial, glucosa, o la aparición del producto, alcohol etílico o bióxido de carbono. En

el presente estudio se midió la desaparición de glucosa durante 6 horas bajo las siguientes condiciones :

El producto obtenido mediante secado por aspersión a una temperatura de aire de entrada y salida de 140 y 80°C respectivamente , una concentración de sólidos en la alimentación de 10 15 20% y una actividad promedio de 323 unidades fué incubado en 250 ml de una solución de glucosa al 5% preparada en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1M pH 6.6 a 37°C durante seis horas.

Se tomaron alicuotas de 1 ml al inicio de la incubación y durante cada hora hasta la sexta, inactivándose cada muestra por calentamiento a 100°C durante cinco minutos y midiéndose la concentración de glucosa mediante la técnica de azúcares reductores (DNS).

En el ensayo además se prepararon los siguientes controles:

Control positivo: células de levadura sin tratamiento (con la actividad enzimática equivalente a las muestras problemas incubadas con dextrosa al 5%).

Control negativo: dextrosa al 5% incubada a 37°C.

IV.3.J. Determinación de humedad

El contenido de humedad se determinó por la pérdida de peso de 0.5g de muestra después de secar a 80°C durante 3 horas hasta peso constante en una estufa a presión atmosférica (mod.291-A Felisa).

IV.3.K Determinación de proteína (Lowry 1951)

La determinación de proteína se hizo según el método de Lowry, basado en la reacción de la proteína con el ión Cu^{2+} en

medio alcalino y de la reducción de fosfomolibdeno tungsteno por aminoácidos como tirosina y triptofano (Biuret), el cual dá un color azul.

REACTIVOS

Sulfato de cobre hidratado ($\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
Carbonato de sodio (Na_2CO_3)
Hidróxido de sodio (NaOH)
Tartrato de sodio y potasio ($\text{KNa C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
Reactivo de Folin

Preparación de soluciones

Solución A) Carbonato de sodio al 2% en hidroxido de sodio 0.1 N.
Solución B) Sulfato de cobre al 0.5% en agua destilada
Solución C) Tartrato de sodio y potasio al 1% con agua destilada
Solución D) Partes iguales de solución B y C
Solución E) 1 ml de mezcla D y 50 ml de la solución A
Reactivo de Folin diluir 1 : 2 en agua destilada

Procedimiento

Se mezcló 1 ml de muestra y 5 ml de solución E y se dejó reposar durante 10 minutos, posteriormente se añadió 0.5 ml de reactivo de Folin diluido y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, después de tal tiempo se lee la absorbancia a 590 nm, extrapolando la lectura en la curva estandar previamente obtenida. La curva estandar se preparó relacionando diversas concentraciones de albumina de 0 a 200 μg /ml con sus valores de absorbancia.

IV.3.L Determinación de azúcares mediante el método de azúcares reductores DNS (Miller 1959)

Este método se basa en la reducción de ácido

dinitrosalicílico (DNS) por azúcares reductores, formando un compuesto nitroaminado colorido (amarillo), cuya densidad óptica es proporcional a la concentración de grupos reductores. La intensidad del color se mide espectrofotométricamente a 540 nm.

REACTIVOS

Acido dinitrosalicílico

Hidróxido de sodio

Tartrato de sodio y potasio

Preparación de la solución

Pesar 16 g de hidróxido de sodio, 300g de tartrato de sodio y 10g de DNS y mezclar en este orden en 1.0 l de agua destilada, calentando para una disolución total.

Procedimiento

Se mezcló 1 ml de DNS con 1 ml de muestra problema diluida 1:50, se incubó durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo y posteriormente se enfrió en hielo. A esta mezcla se le añadieron 10 ml de agua destilada agitando severamente y se mantuvo en reposo. El producto se leyó a 540 nm contra blanco de reactivos y el valor de absorbancia se extrapola en la curva de referencia. La curva patrón o de referencia se elaboró utilizando soluciones de dextrosa en concentraciones de 0 a 3 mg/ml.

V RESULTADOS Y DISCUSION

V.1 Recuperación de la β -galactosidasa a través del secado de levadura en el rotavapor

Puesto que la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* es una enzima intracelular, en esta parte del trabajo se estudió el nivel de permeabilización de la levadura bajo el efecto de diversas temperaturas en un equipo de secado a nivel laboratorio. Para ello se utilizaron 100 ml de células recién cosechadas resuspendidas al 10% (p/v) y secadas en el rotavapor bajo las condiciones descritas en la metodología

La máxima expresión de la actividad de la enzima fué del 90% con respecto a las células permeabilizadas con alcohol isoamílico y se alcanzó a los 45°C después de 3 horas de incubación. Tanto a 40 como a 45°C hay un descenso ligero de la actividad de la enzima durante la cuarta y tercera hora de incubación (figura 3). Este descenso en la actividad de la β -galactosidasa puede deberse fundamentalmente a la inactivación de la enzima provocada por la temperatura y los tiempos de exposición a los que se ve sujeta.

En un examen de la actividad intra y extracelular del producto obtenido a 45°C se observó que la enzima se localizaba en un 90 % en el espacio extracelular. Así durante el secado en el rotavapor, más que una permeabilización parcial de la levadura se logra una lisis total de la membrana y la pared celular.

Esta alteración de la membrana y pared celular puede ser el resultado de la solubilización de los componentes celulares bajo la acción de enzimas endógenas, las cuales son activadas durante la incubación de la levadura (Charpienter et al 1986).

La degradación de la pared celular, es iniciada por la solubilización de la capa interna de glucano mediante la acción de

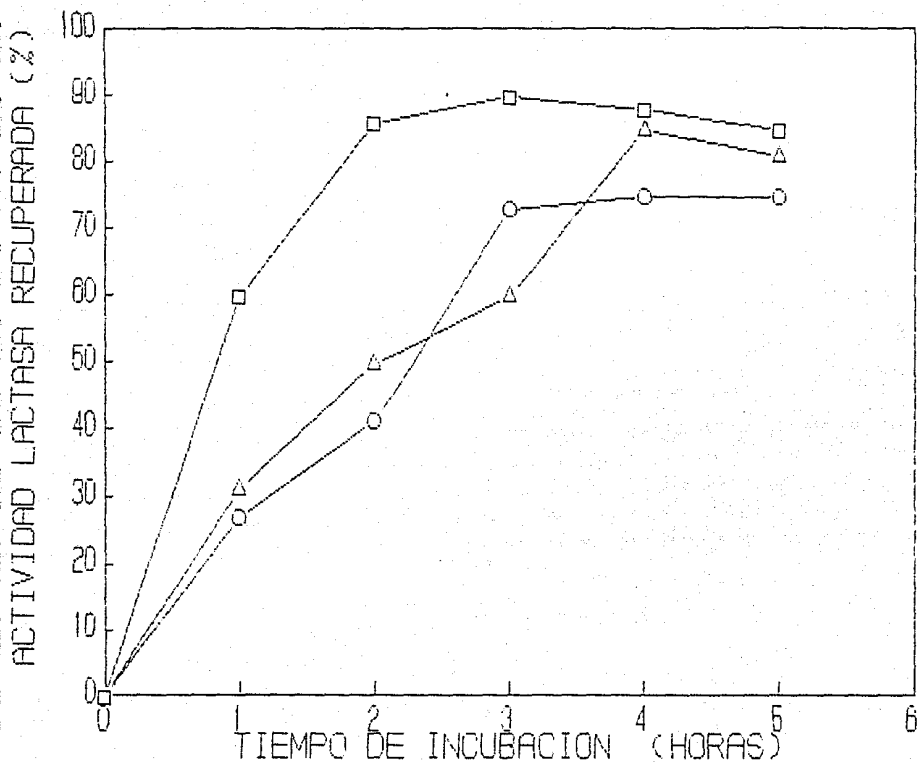


FIG.3. Efecto de la temperatura sobre la recuperación de la β -galactosidasa utilizando el rotavapor. Las células de levadura se resuspendieron al 10% en agua destilada y se secaron a 35,40 y 45°C a 31.2 mm Hg durante 5 horas. (o)35°C, (●)40°C, (◻)45°C. Cada punto representa el promedio de tres corridas (coeficiente de variación=5%).

glucanasas. De esta manera queda expuesta la capa externa de manoproteínas sobre la cual actúan proteasas líticas. Cuando la acción combinada de glucanasas y proteasas ha creado una apertura lo suficientemente grande en la pared celular, la membrana plasmática y su contenido son extruidos como un protoplasto que en condiciones de baja concentración ($10^{-2}M$) se rompe fácilmente liberándose de esta forma la proteína (Asenjo et al 1986).

Haciendo un análisis comparativo con otros métodos de permeabilización y/o ruptura celular, se observa que mediante el secado se logran niveles de recuperación mayores que los obtenidos por el uso de solventes orgánicos como el tolueno y el cloroformo, por métodos mecánicos y físicos como el de homogenización y ultrasonificación y casi tan efectivos como los alcanzados con alcohol isoamílico (tabla 9).

A partir de estos resultados, se empieza a plantear la posibilidad que había de recuperar la β -galactosidasa de células de levadura a través de un método no mecánico de ruptura celular como lo es el secado por aspersión.

V.2 Recuperación de la β -galactosidasa en células de levadura secadas por aspersión

Uno de los estudios realizados en el presente trabajo fue investigar el efecto de las condiciones de secado de levadura sobre la recuperación de lactasa, con el objeto de establecer las condiciones de máxima recuperación. Cabe recordar que se probaron temperaturas de $110^{\circ}C - 60^{\circ}C$, $140^{\circ}C - 80^{\circ}C$ y $160^{\circ}C - 96^{\circ}C$ del aire de entrada y salida respectivamente a tres diferentes concentraciones de alimentación 10, 15 y 20% (p/v). Se analizaron muestras tanto del ciclón colector como de la cámara de secado.

La figura 4 muestra el efecto de las condiciones de secado sobre la recuperación de la enzima en el producto que se obtiene

Tabla 9
**ACTIVIDAD DE LA β -GALACTOSIDASA RECUPERADA UTILIZANDO
 DIFERENTES METODOS DE RUPTURA CELULAR.**

METODO DE RUPTURA	ACTIVIDAD RECUPERADA (%)
ALCOHOL ISOAMILICO. ^a	100
TOLUENO. ^b	70
CLOROFORMO. ^c	25
SALES DE NH Y K. ^c	60
HOMOGENIZACION. ^c	70
ULTRASONICACION. ^c	65
SECADO A 35°C. (Después de 5 horas)	75
SECADO A 40°C. (Después de 4 horas)	85
SECADO A 45°C. (Después de 3 horas)	90

- a) Células recién cosechadas y permeabilizadas durante una hora con alcohol isoamílico al 20% (v/v)
- b) Células recién cosechadas y permeabilizadas durante una hora con tolueno al 20% (v/v)
- c) Datos reportados por Mahoney y Whitaker (1977)

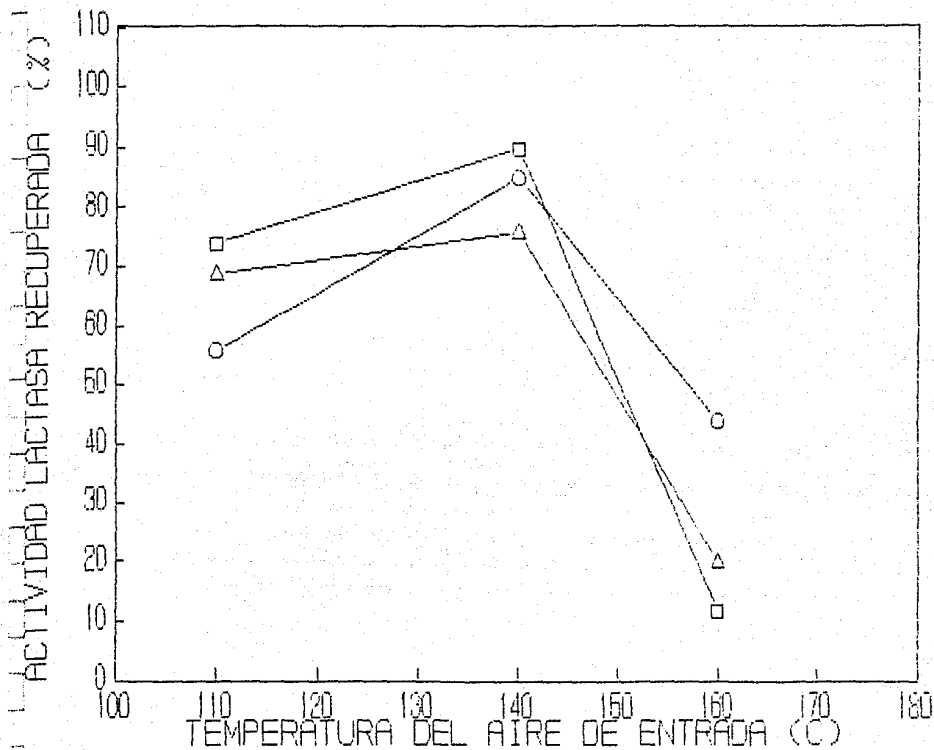


FIG.4 Recuperación en el ciclón colector de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* secada por aspersión. Durante el proceso se utilizó un flujo de aire constante de 400 Kg/Hr y una velocidad de atomización de 20,000 rpm. Las concentraciones de alimentación usadas fueron: (○) 10% de sólidos, (▲) 15% de sólidos y (◻) 20% de sólidos. Los experimentos de secado por aspersión se hicieron una sola vez.

en el ciclón colector. El perfil de recuperación contra temperatura es similar en las tres condiciones de concentración probadas, alcanzándose a $140^{\circ}\text{C} - 80^{\circ}\text{C}$ una actividad láctica máxima del 90% cuando se alimenta con el 20% de sólidos.

Los resultados de las muestras colectadas de la cámara de secado se grafican en la figura 5. El comportamiento es muy parecido a lo que ocurre en las muestras del ciclón colector, y la máxima actividad (90%) se logra nuevamente a temperaturas de entrada y salida de $140^{\circ}\text{C} - 80^{\circ}\text{C}$ con una suspensión al 20%. Es importante mencionar que, a diferencia del ciclón colector, a baja temperatura ($110^{\circ}\text{C} - 60^{\circ}\text{C}$) la recuperación de lactasa (70%) no se ve influenciada por la concentración de sólidos y esta en promedio es del 70%, esto pudiera deberse a las mayores temperaturas a las que se ve sometido el producto en la cámara de secado.

Por otro lado, se calculó el rendimiento en la recuperación de la enzima durante el secado. Esto se hizo comparando la actividad total al final del proceso (gramos de producto seco \times actividad específica del producto) en relación con la actividad al inicio de este. Los rendimientos máximos se obtienen cuando se trabaja a $140^{\circ}\text{C} - 82^{\circ}\text{C}$ de temperatura de entrada y salida respectivamente, principalmente en concentraciones de alimentación del 10 y el 20%, mientras que al 15% se obtiene solo un rendimiento del 70% (Tabla 10).

Finalmente los valores de humedad del producto son graficados con respecto a la temperatura y concentraciones de alimentación usadas en cada prueba. El perfil de humedades obtenido es el esperado y es independiente de la concentración de sólidos. A $110^{\circ}\text{C} - 60^{\circ}\text{C}$, la humedad del producto es del 6%, a $140^{\circ}\text{C} - 82^{\circ}\text{C}$ es del 5% y a $160^{\circ}\text{C} - 96^{\circ}\text{C}$ se tiene un producto con el 4% de humedad (figura 6).

El nivel de permeabilización celular del producto obtenido

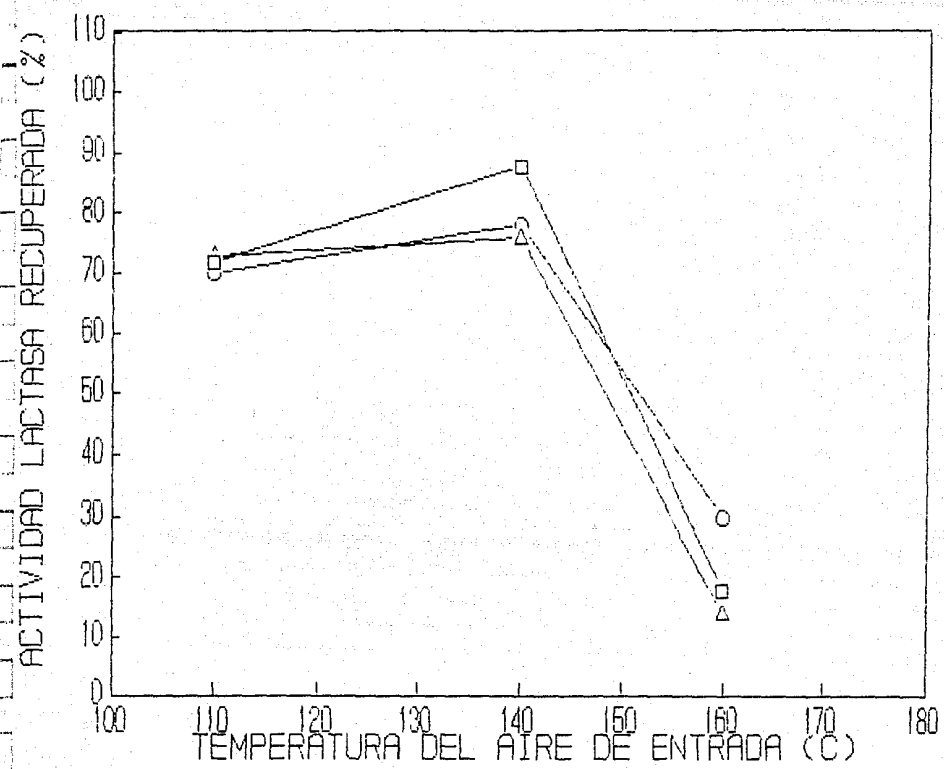


FIG.5 Recuperación en la cámara de secado de la β -galactosidasa de levadura seca por aspersión. Las concentraciones de alimentación empleadas fueron: (o) 10% de sólidos, (▲) 15% de sólidos y (■) 20% de sólidos.

CONTENIDO DE HUMEDAD DEL PRODUCTO (%)

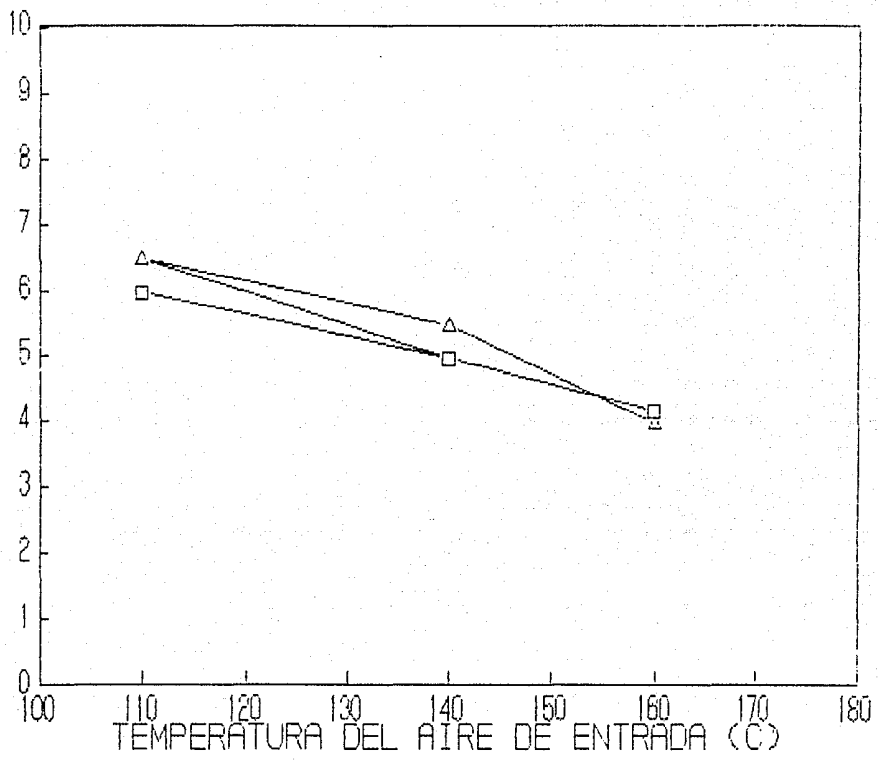


FIG 6 Contenido de humedad del producto recuperado en el ciclón colector durante el secado por aspersión. El contenido de humedad esta referido como Kg de agua/Kg de producto seco x 100. (○) 10% de sólidos, (▲) 15% de sólidos (◻) 20% de sólidos

Tabla 10,

RENDIMIENTO EN LA RECUPERACION DE LA β -GALACTOSIDASA DURANTE EL SECADO POR ASPERSION DE *Kluyveromyces fragilis*

Temperatura de operación		Sólidos en la alimentación		
		10%	15%	20%
Entrada	Salida	Rendimiento* (%)		
110°C	60°C	57	67	67
140°C	82°C	82	70	82
160°C	96°C	40	25	10

* Actividad en relación, con la actividad inicial total que se introduce al secador.

por secado por aspersión se evaluó midiendo la actividad enzimática intra y extracelular de acuerdo a lo señalado en la metodología. En ninguno de los productos ensayados se observó actividad extracelular, toda la actividad se encontró en la pasta celular o actividad intracelular, lo cual indica que el secado por aspersión solamente permeabiliza la pared celular al paso de sustratos y productos, quedando limitada la enzima al espacio intracelular.

Este fenómeno puede darse gracias a que durante el secado por aspersión se forman gotas pequeñísimas con células en su interior. Cuando esta gota es atomizada en la cámara de secado, el agua en su superficie se evapora rápidamente, formándose así una esfera con una superficie externa costrosa y con vapor de agua en su interior (Beck 1982). La presión que ejerce el vapor en el interior de la esfera pudiera provocar la formación de canales o poros en la estructura de la pared celular.

Si el tamaño de la partícula es pequeño (menor de 100μ), el producto final será una esfera hueca con una apertura en su superficie. Cuando el tamaño de la gota es de 100 a $300\mu\text{M}$, la costra será tan dura que no pueda romperse por la presión del vapor, dando lugar a la formación de esferas huecas cerradas en donde la levadura se ve sujeta a una mayor presión (Beck 1982). De esta manera, el nivel de permeabilización de la levadura dependerá en buena medida del tamaño de gota que sea atomizada durante el secado por aspersión.

No obstante que la temperatura del exterior celular llega a ser de más de 100°C , la temperatura intracelular es mucho menor. Esta temperatura puede calcularse a partir de la siguiente expresión:

$$\ln\left(\frac{P_0}{P}\right) = k_e^{-E/RT_t} \quad (1)$$

En donde: P_0 es la actividad enzimática inicial= 100%
 P es la actividad enzimática al final del secado por aspersión. A 140°C = 90%
 k_1 es la constante de Arrhenius= $1.28 \times 10^{02} \text{ min}^{-1}$
 E es la energía de desnaturalización de la β -galactosidasa= 136.450 cal/mol
 t^2 es el tiempo de residencia de la levadura en la cámara de secado= 0.33 min
 T es la temperatura del interior celular= $^{\circ}\text{K}$.

¹ Tanto k como E se obtuvieron de los experimentos de termoestabilidad de la enzima y se presentan en el estudio de caracterización

² El tiempo de residencia de la levadura en la cámara de secado se calculó a partir del gasto másico de aire ($5.85 \text{ m}^3/\text{min}$) usado durante la operación y del volumen de la cámara de secado (1.96 m^3)

Despejando T de la ecuación 1 tenemos que:

$$T = \frac{-E}{R \ln \ln \frac{P_0}{P}} \cdot \frac{1}{k t}$$

De esta manera, es probable que la temperatura intracelular no exceda los 49°C cuando se seca la levadura a 140°C , mientras que a 160°C de secado la temperatura del interior celular llega a ser de 55°C , provocando con esto una rápida inactivación de la enzima.

De acuerdo a la ecuación 1, la actividad enzimática recuperada disminuye cuando se incrementan los tiempos de exposición de la enzima. Por lo tanto, una variable de operación importante durante el secado por aspersión será el gasto de aire que se utilice, ya que este determinará los tiempos de residencia de la partícula influyendo así en la estabilidad de la

β -galactosidasa y en los niveles de permeabilización de la levadura.

V.3 Caracterización del producto

Por razones de disponibilidad del secador de espreas, el producto caracterizado fué el extracto enzimático obtenido mediante el secado en el rotavapor. Estos estudios incluyen el exámen físico y cinético de la enzima como una forma de verificación y control del producto. Cada experimento fué hecho en tres ocaciones y los puntos graficados representan el promedio de estos, con un coeficiente de variación del 5%.

V.3.A Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de la β -galactosidasa

El efecto del pH sobre la velocidad de hidrólisis de ONPG fué estudiado usando amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M con magnesio y manganeso 1 y 0.1 mM a 40°C. La actividad máxima de la enzima se obtuvo entre un pH de 6.6 y 6.8 (figura 7). Los valores encontrados coinciden con los reportados para la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* y *Kluyveromyces lactis* (Bierman y Morton 1968; Castillo y Sánchez 1980; Dickson y Markin 1979; Mahoney y Whitaker 1977; Uwajima et al 1972; Wendorff y Amundson 1971; Eugene y Bingham 1978).

La figura 8 muestra el efecto del pH sobre la estabilidad de la β -galactosidasa medido mediante incubación de la enzima durante veinte minutos en un rango de pH de 5.8 a 7.6. Bajo estas condiciones, la enzima es estable dentro de un rango de 6.2 a 7.2 al menos durante veinte minutos.

Analizando los resultados de la figuras 7 y 8, se encontró que la disminución de la actividad enzimática entre 6.6 y 6.2 y entre 6.8 y 7.2 pudiera ser el resultado de la formación de una especie iónica incorrecta de la enzima o el sustrato, o el complejo enzima sustrato, ya que la incubación previa de la enzima entre 6.2 y 7.2 no tiene efecto sobre la actividad medida a pH

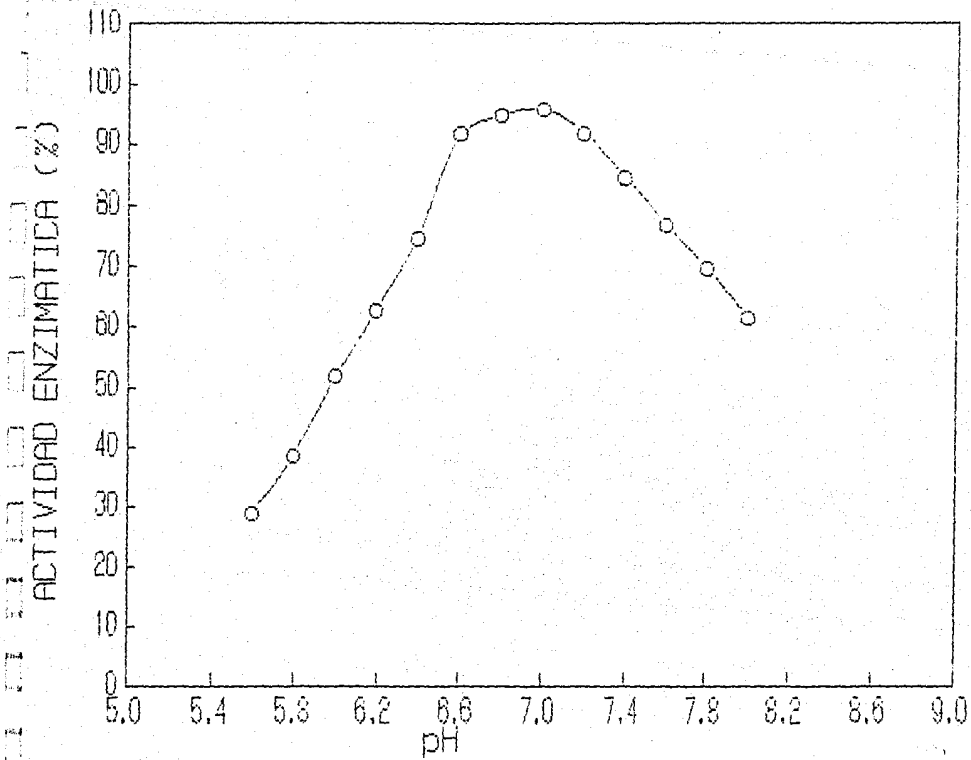


FIG 7 Efecto del pH sobre la actividad de la β -galactosidasa. La velocidad de hidrólisis fué medida en amortiguador de fosfatos 0.1 M con Mg 1 mM y Mn 0.1mM (amortiguador de trabajo) a 40°C, usando como sustrato ONPG. Cada punto representa el promedio de tres experimentos (coef.var=5%).

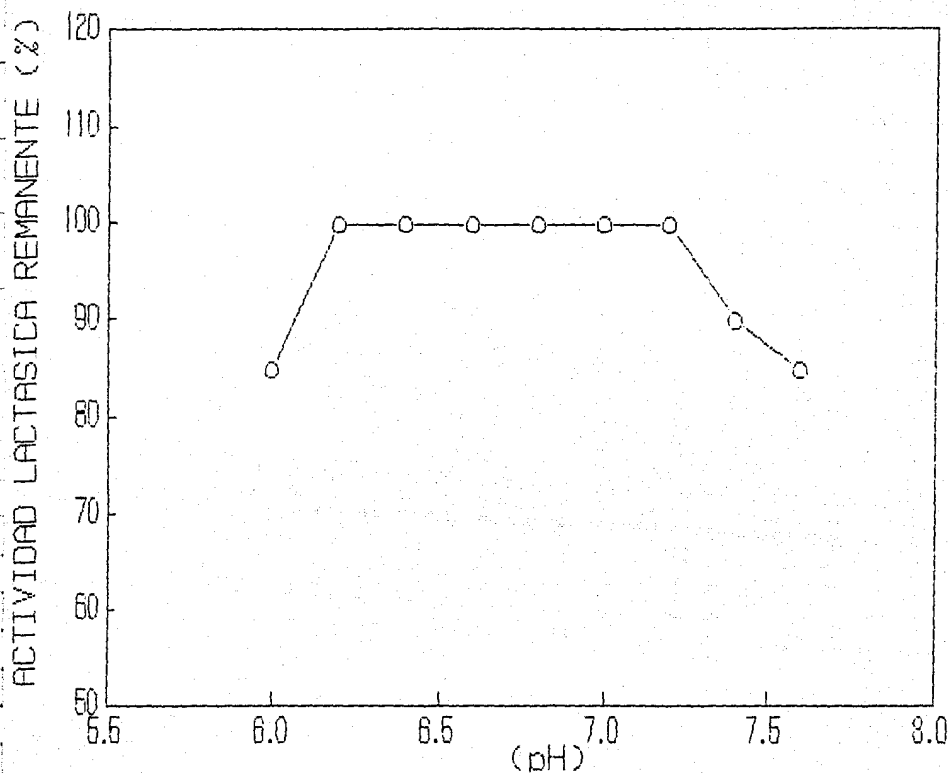


FIG.8 Efecto del pH sobre la estabilidad de la β -galactosidasa. La enzima fué incubada durante 20 minutos en amortiguador de trabajo en un rango de 6.0 a 7.6 a 40°C . Después de este tiempo la actividad enzimática se leyó a pH 6.6 en condiciones de reacción estándar.

Por otro lado, cuando la enzima es incubada a pH por arriba de 7.2 o por abajo de 6.2, la actividad enzimática original no se restablece cuando se mide a pH de 6.6. Así, la disminución de la actividad de la β -galactosidasa es el resultado de la inactivación irreversible de la enzima.

Los resultados de la estabilidad al pH, coinciden con los reportados por Wendorff y Amundson (1971) para la β -galactosidasa parcialmente purificada de *Kluyveromyces fragilis* y con los encontrados por Mahoney y Whitaker (1977).

V.3.B Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la β -galactosidasa

El efecto de la temperatura sobre la actividad de la β -galactosidasa fue probado en un rango de 25°C a 60°C a pH de 6.6 en amortiguador de trabajo. La velocidad de hidrólisis máxima se encontró a los 50°C (figura 9) y es una temperatura comparable al valor reportado por Wendorff y Amudson (1971) para extracto enzimático de *Kluyveromyces fragilis*.

Por otro lado, se determinó la energía de activación graficando el logaritmo de las velocidades iniciales contra el recíproco de la temperatura absoluta en una forma convencional de Arrhenius (figura 10). La energía de activación encontrada (5.25 kcal/mol) es del orden de magnitud esperado para reacciones catalizadas por enzimas y cae dentro del rango reportado para la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* que es 5-12 kcal/mol.

En lo referente a la termoestabilidad de la β -galactosidasa esta se determinó incubando la enzima durante veinte minutos en un rango de temperatura de 41 a 49°C. La velocidad de inactivación de la enzima sigue un comportamiento de primer orden (figura 11) con una estabilidad máxima entre 41 y 43°C. Por arriba de esta temperatura se presenta una rápida inactivación de la lactasa.

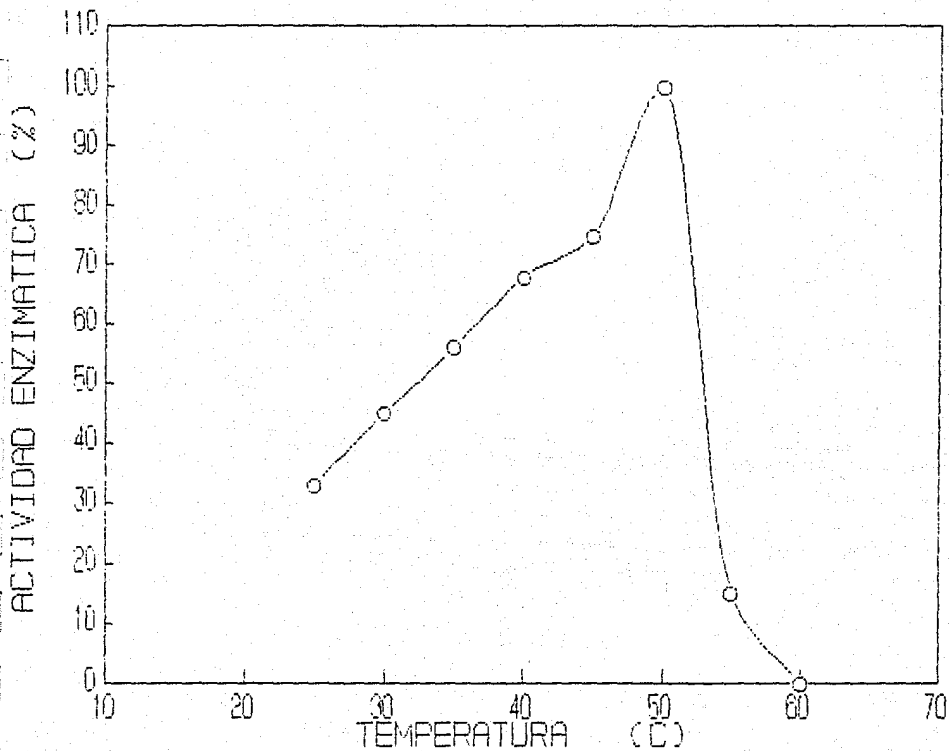


FIG 9 Efecto de la temperatura sobre la velocidad de hidrólisis de ONPG. La actividad lactásica fué medida en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M con Mg 1.0 mM y Mn 0.1 mM a pH 6.6.

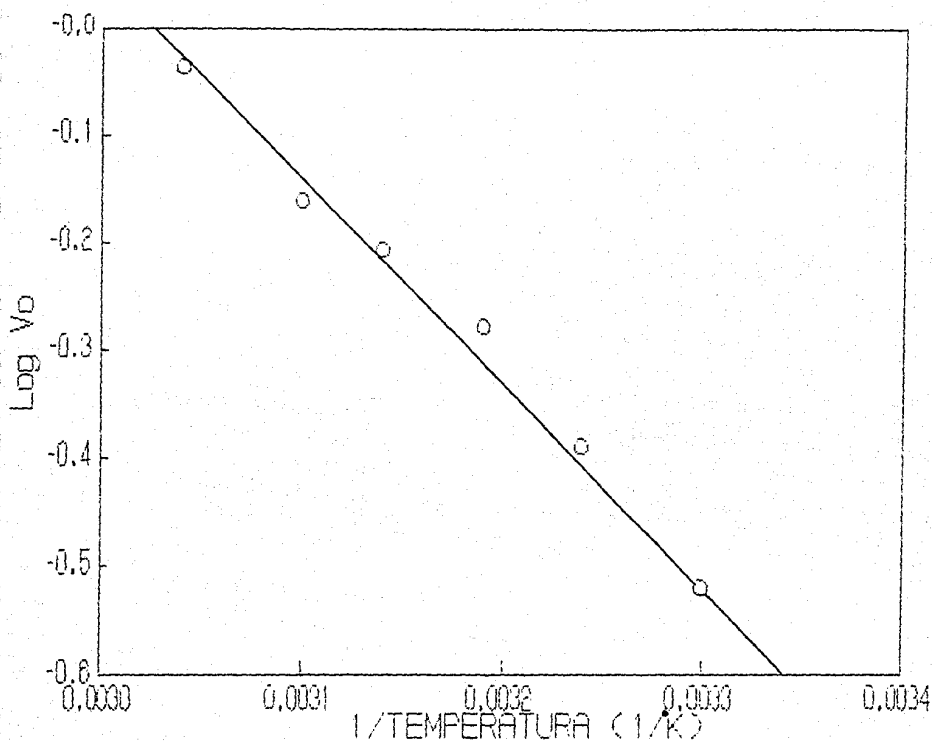


FIG.10 Gráfica de Arrhenius para hidrólisis enzimática de ONPG. La reacción se llevó a cabo en amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M pH 6.6 adicionando con 1.0 mM de mg y 0.1 mM de Mn.

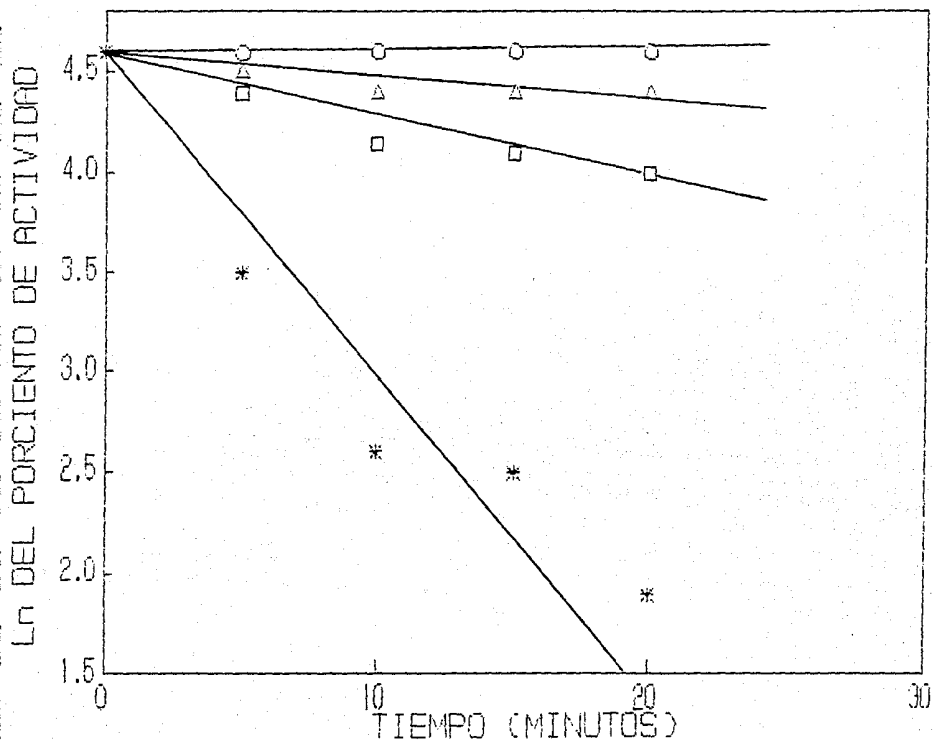


FIG.11 Efecto de la temperatura sobre la velocidad de desnaturalización de β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis*. La enzima se incubó durante veinte minutos en amortiguador de trabajo en un rango de temperatura de 41 a 47°C. Después de este tiempo, la actividad de la enzima se midió a 40°C en condiciones de reacción estándar. (o) 41°C, (Δ) 43°C, (□) 45°C, (*) 47°C.

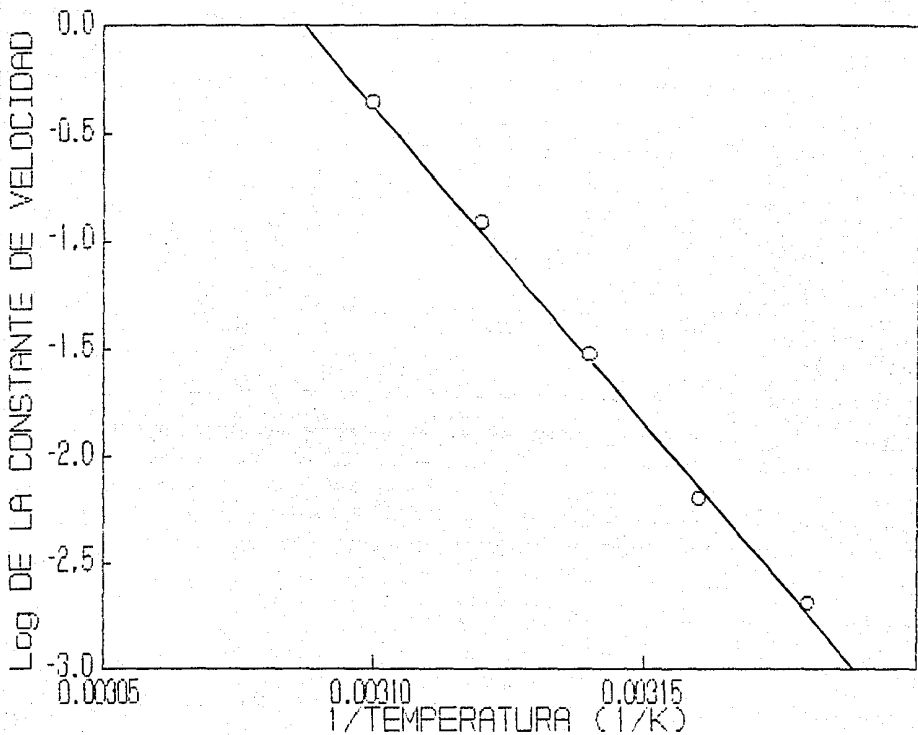


FIG.12 Gráfica de Arrhenius para la estimación de la energía de desnaturalización de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis*.

La energía de desnaturalización, calculada a partir de la ecuación de Arrhenius, es de 136.45 kcal/mol (figura 12), valor dos veces mayor que el reportado por Mahoney y Whitaker (1977) para β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* (56 Kcal/mol) con una estabilidad máxima a 35°C durante veinte minutos.

La mayor termoestabilidad de la enzima con respecto a los valores reportados en la literatura para enzima pura puede ser el resultado de la presencia de los componentes del extracto enzimático (principalmente proteínas), los cuales confieren a la β -galactosidasa una mayor protección contra el calor y por consecuencia una mayor estabilidad (Segel 1976).

V.3.C Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la β -galactosidasa

El efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de hidrólisis de ONPG se determinó en un rango de concentración de 0.227 mM a 7.94 mM a pH 6.6 y 40°C. La constante de Michaelis (K_m), calculada por el método de Lineweaver-Burk, fué de 3.4 mM y la velocidad máxima de reacción encontrada fué de 9.0 μ moles de ONP/min \times mg de proteína (figura 13).

Cuando se usó la lactosa como sustrato se observó una reacción del tipo de Michaelis-Menten entre la concentración de sustrato y las velocidades iniciales de reacción. El rango de concentración probado fué de 7.3 mM a 146mM. La k_m estimada a pH 6.6 y 40°C fué de 15.56 mM y la velocidad máxima de reacción fué de 15.2 μ moles de glucosa/minuto \times mg de proteína (figura 14)

Los valores de K_m son similares a los encontrados para la β -galactosidasa purificada y el extracto enzimático los cuales son 4 y 21 mM y 2.7 y 14 mM para ONPG y lactosa respectivamente reportados por Chan (1971) y por Mahoney y Whitaker (1977)

El valor de V_{max} encontrado para el producto, es tres veces mayor que el reportado por Castillo y Sánchez (1980) y 15 veces más alto que el obtenido por Wendorff y Amudson (1971) y Chan

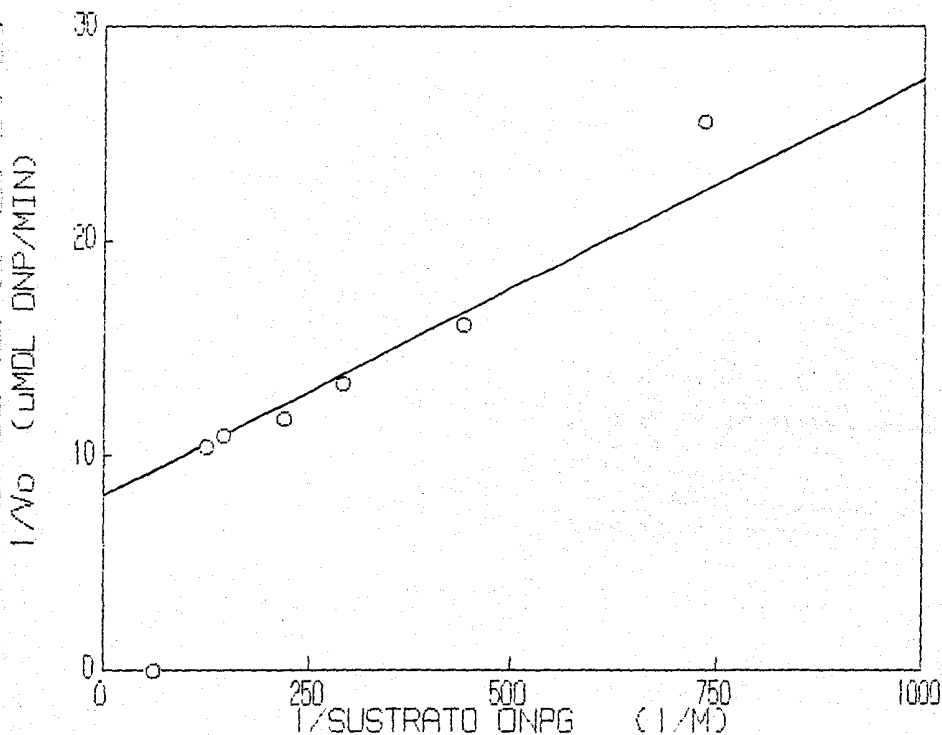


FIG.13 Efecto de la concentración de ONPG sobre la velocidad de hidrólisis de la β -galactosidasa. La reacción se llevó a cabo en amortiguador de trabajo a 40°C en un rango de concentración de ONPG de 0.227mM a 7.94 mM

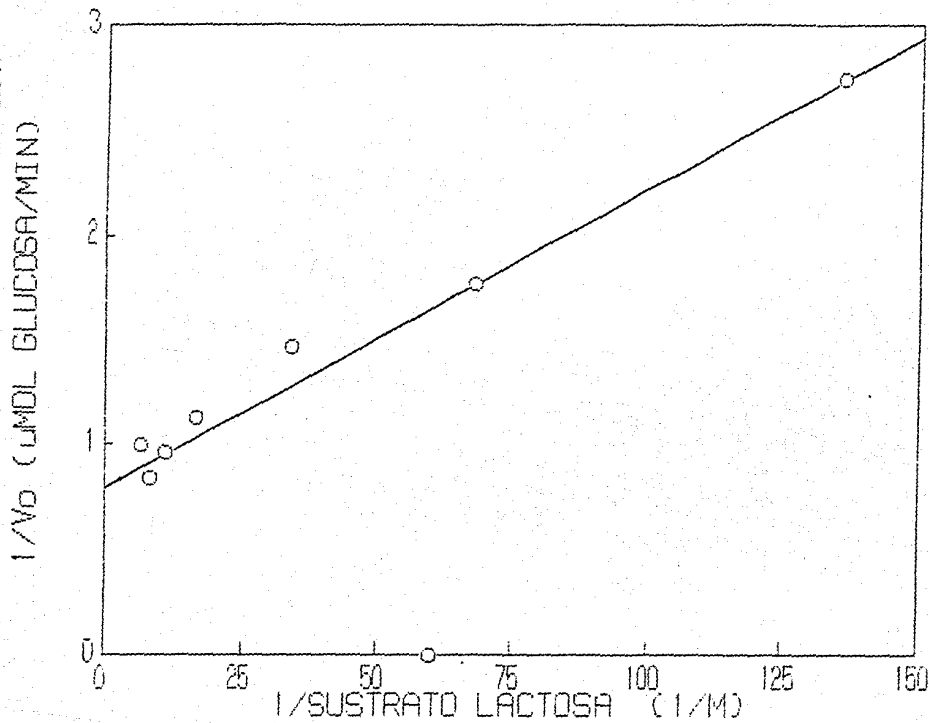


FIG.14 Efecto de la concentración de lactosa sobre la velocidad de hidrólisis de la β -galactosidasa La reacción se llevo a cabo en amortiguador de trabajo a $40^{\circ}C$ en un rango de concentración de 7.3 mM a 146 mM .

(1971) para extracto enzimático de *Kluyveromyces fragilis*.

Las diferencias en la actividad del producto, pueden deberse principalmente a los niveles de concentración de este, ya que el extracto enzimático utilizado en el presente estudio fué concentrado 5 veces a través del rotavapor, mientras que Castillo (1980) y Wendorff (1971) utilizaron el sobrenadante obtenido directamente de la extracción

V.3.D. Efecto de los productos sobre la actividad de la β -galactosidasa

El efecto de los productos de reacción sobre la velocidad de hidrólisis de ONPG se estudió usando concentraciones de 10 a 250 mM de glucosa y galactosa. Los resultados iniciales muestran que la enzima se vé fuertemente inhibida en concentraciones por arriba de 50 mM de galactosa (tabla 11) y se observa una inhibición del 73% (con respecto a la enzima sin inhibidor) en presencia de galactosa 250 mM. Cuando se usa glucosa no se observa inhibición alguna en ninguna de las concentraciones probadas (tabla 12).

En la identificación del tipo de inhibición ejercida por galactosa se probaron concentraciones de 50, 100 y 150 mM. Se encontró que este monosacárido es un inhibidor de tipo competitivo de la enzima (figura 15). La constante de inhibición calculada (K_i), mediante el método de Lineweaver-Burk fué de 30 mM en comparación con la K_m para ONPG y lactosa que fué de 3.4 mM y 15.56 mM respectivamente.

La constante de inhibición calculada coincide con el valor reportado por Mahoney y Whitaker (1977) que es de 27 mM. Los mismos autores encontraron que la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* además de ser inhibida por galactosa, lo es por sustratos análogos como la D-galactona 1,4-lactona y la D-galactosamina, mientras que glucosa no muestra efecto inhibitorio sobre la enzima.

Tabla 11
EFFECTO INHIBITORIO DE LA GALACTOSA SOBRE LA
VELOCIDAD DE HIDROLISIS DE LA β -GALACTOSIDASA
CON ONPG COMO SUSTRATO

Concentración de galactosa (mM)	Inhibición (%)
0	0
10	7.2
20	9.5
50	36.6
100	50.8
250	73.8

Tabla 12
EFFECTO INHIBITORIO DE LA GLUCOSA SOBRE LA
VELOCIDAD DE HIDROLISIS DE LA β -GALACTOSIDASA
CON ONPG COMO SUSTRATO

Concentración de glucosa (mM)	Inhibición (%)
0	0
10	0
20	0
50	0
100	8.0
250	5.0

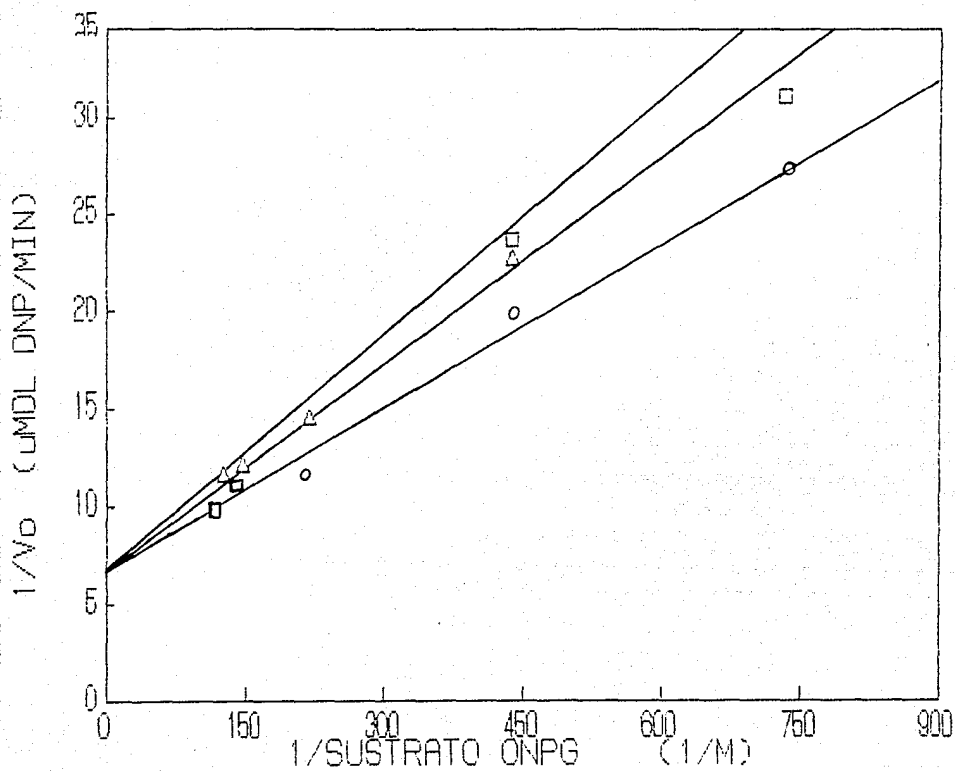


FIG.15 Efecto de la galactosa sobre la velocidad de hidrólisis de ONPG. La reacción se llevó a cabo en amortiguador de trabajo a 40°C. Las concentraciones de galactosa probadas fueron (○) 0mM (△) 50mM y (□) 100mM.

Por su parte, Wendorff y Amudson (1971) reportaron que altas concentraciones de galactosa y glucosa muestran inhibición competitiva y no competitiva, respectivamente, sobre la hidrólisis de lactosa por la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis*.

V.3.E. Estabilidad en almacenamiento de la β -galactosidasa

Efecto del magnesio y manganeso sobre la estabilidad de la enzima

La estabilidad en almacenamiento de la β -galactosidasa fue estudiada en células secas en el rotavapor y su extracto enzimático almacenados en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M pH 6.6 con diferentes concentraciones de magnesio y manganeso. La actividad enzimática remanente fue medida por triplicado bajo las condiciones de reacción estándar.

En el caso de las células secas, estas conservaron más del 50% de su actividad original durante 200 días almacenadas a 4°C con manganeso en concentraciones de 0.1 a 1.0 mM. Cuando las células se almacenaron en magnesio en cualquiera de las concentraciones probadas, la vida media del producto fue en promedio de 100 días (figura 16).

La vida media del producto a temperatura ambiente es de más de 2 semanas en presencia de manganeso y de la mezcla de magnesio y manganeso. Por su lado las células almacenadas en magnesio 0.1 y 1.0 mM conservan solo el 30% de su actividad después de cinco semanas (figura 17).

En el caso del extracto enzimático, nuevamente las soluciones en que mejor se conserva la actividad de la enzima es en aquellas que contienen manganeso o la mezcla de magnesio con manganeso. Sin embargo, la velocidad de pérdida de actividad fue mayor que en el caso de las células secas con una vida media máxima de cinco semanas en refrigeración (figura 18).

Por su parte, el extracto enzimático almacenado a temperatura

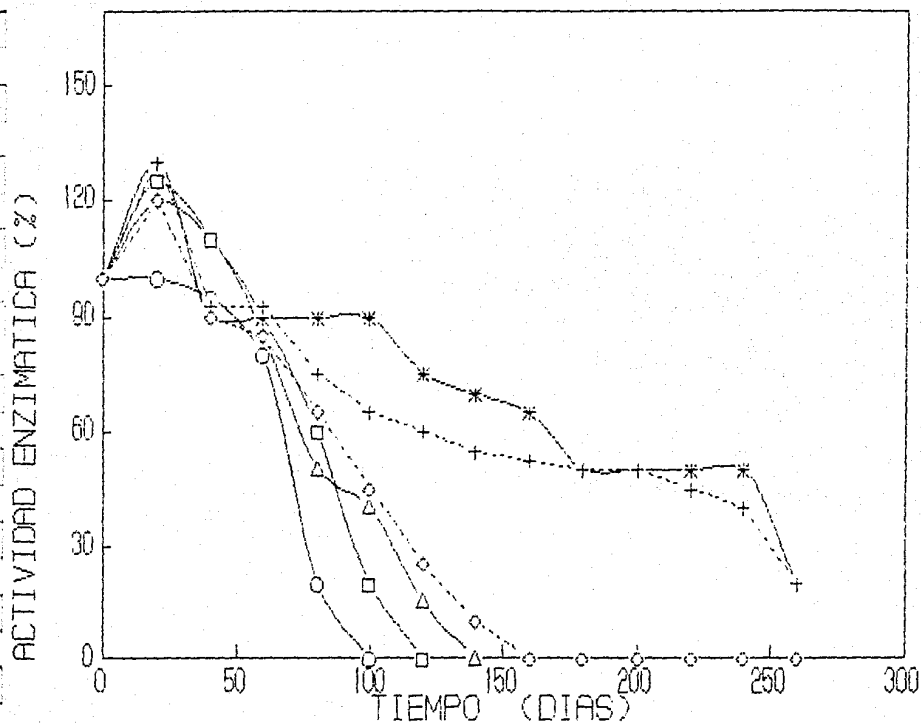


FIG 16 Estabilidad en refrigeración de la β -galactosidasa de células de levadura obtenidas mediante secado en el rotavapor. Las células secas fueron almacenadas en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M pH 6.6 con las siguientes concentraciones de magnesio y manganeso: (o) Sin iones (▲) Mg 1.0 mM (□) Mg 10 mM (*) Mn 0.1 mM (+) Mn 1.0 mM (◇) Mg 1.0 mM y Mn 0.1 mM.

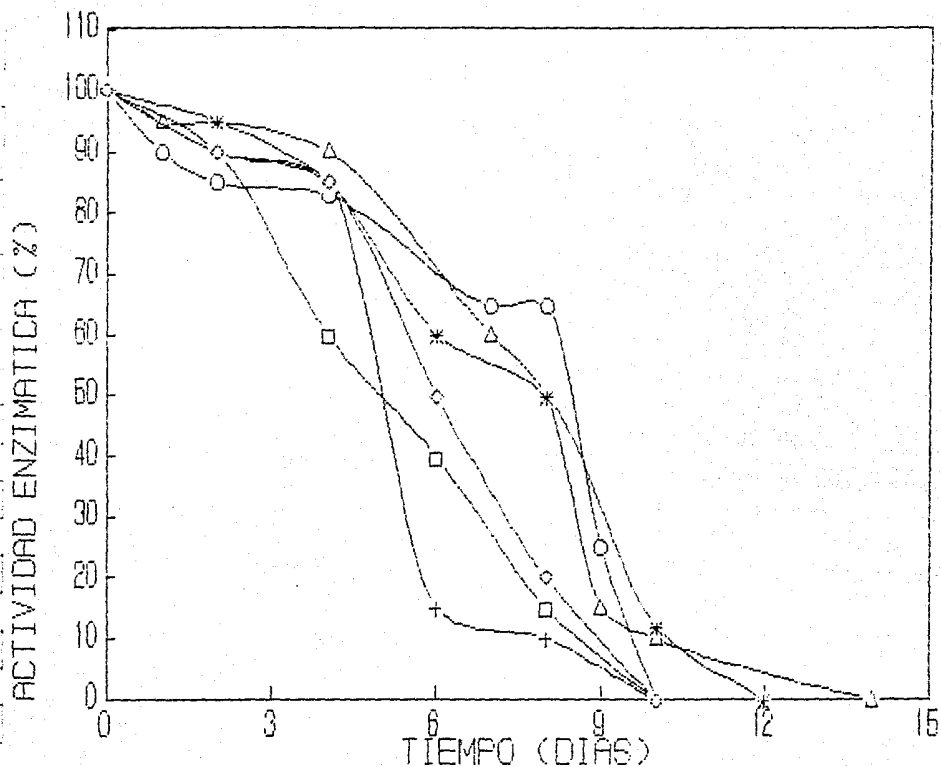


FIG.17 Estabilidad a temperatura ambiente de la β -galactosidasa de células secas de levadura almacenadas en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M con las siguientes concentraciones de magnesio y manganeso : (o) 0 (Δ) Mg 1.0 mM (\square) Mg 10 mM (*) Mn 0.1 mM (+) Mn 1.0 mM y (\diamond) Mg y Mn.

ambiente presenta una vida media máxima de 9 días. A diferencia de las demás condiciones, en este caso no se aprecia influencia alguna de los iones presentes en la soluciones, particularmente del manganeso (figura 19).

La participación del manganeso en el mantenimiento de la actividad de la β -galactosidasa ha sido ya mencionada por algunos autores. Wendorff y Amudson (1971), reportaron que la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* incubada con manganeso (0.1 mM) presentaba una alta estabilidad en condiciones extremas de temperatura. Los mismos autores proponen que el manganeso sirve como un cofactor esencial de la enzima y que posiblemente ayuden en la conservación de la estructura secundaria y terciaria de la molécula enzimática. Si el manganeso forma o no parte integral de la proteína, solo puede ser aclarado por exámen de la enzima pura.

La β -galactosidasa se conserva mejor cuando es almacenada junto con los restos celulares que cuando se mantiene como extracto enzimático. Mahoney y Whitaker (1977), reportaron que la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* almacenada en forma pura presenta una menor estabilidad que las preparaciones enzimáticas crudas. Probablemente esto se deba a la protección conferida por el microambiente celular y por los componentes del extracto enzimático.

Efecto del glicerol y manitol

Como parte de estos estudios, se almacenaron las células secadas en el rotavapor en dos de los agentes estabilizantes más citados para la formulación de enzimas solubles: glicerol y manitol.

500 mg del producto se resuspendieron a temperatura ambiente en 10 ml de glicerol y manitol en las siguientes concentraciones : 10, 30, 50, 70, 90% de glicerol y 3, 10, 15 y 20% de manitol, preparados ambos en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M pH 6.6 con magnesio y manganeso 1.0 y 0.1 mM

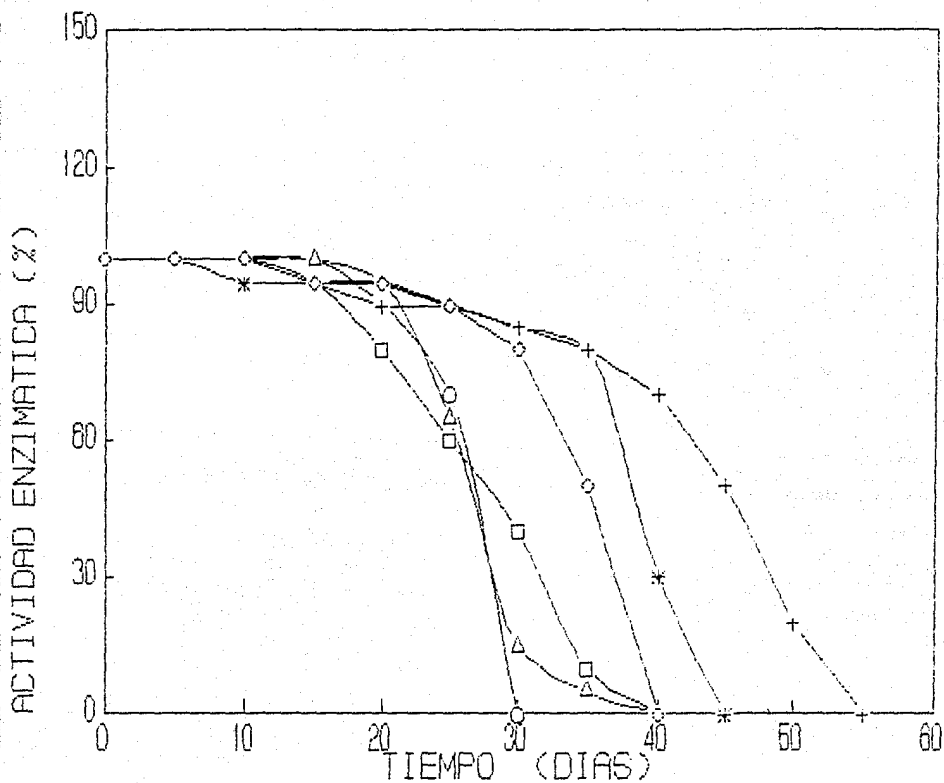


FIG.18 Estabilidad en refrigeración del extracto enzimático de *Kluyveromyces fragilis* almacenando en amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M pH 6.6 adicionado con las siguientes concentraciones de magnesio y manganeso: (o) sin iones (▲) Mg 1.0 mM (◻) Mg 10 mM (*) Mn 0.1 mM (+) Mg y Mn.

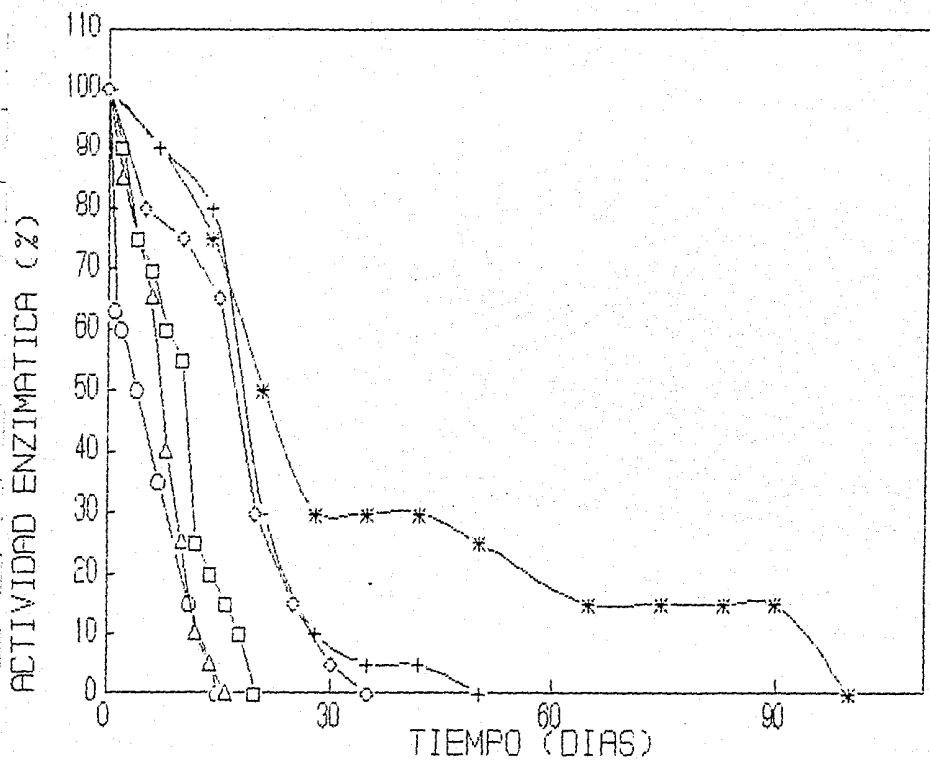


FIG.19 Estabilidad a temperatura ambiente del extracto enzimático de levadura. El producto fué almacenado en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M pH 6.6 con magnesio y manganeso en las siguientes concentraciones : (o) 0 (●) Mg 1.0 mM (◻) Mg 10 mM (*) Mn 0.1 (+) Mn 1.0 (◊) Mg y Mn.

respectivamente. Las soluciones se almacenaron a temperatura ambiente y en refrigeración, registrando periódicamente la actividad láctica mediante el método del ONPG. A manera de control, se almacenaron también en las mismas condiciones de temperatura, el producto en polvo seco y el producto resuspendido en el amortiguador de trabajo.

En la figura 20 se presentan los resultados cuando las células secas se resuspenden en glicerol y se almacenan a temperatura ambiente. En estas condiciones, la vida media del producto fué hasta de noventa días en glicerol al 70%. En general, las células almacenadas en concentraciones arriba del 50 % de glicerol muestran una mejor estabilidad que aquellas que son preparadas en glicerol por abajo de esta concentración.

Por otro lado, la enzima almacenada en refrigeración mantiene el 100% de su actividad inicial durante 90 días de almacenamiento en concentraciones de glicerol superiores al 50% y es de el 90% en concentraciones del glicerol inferiores.(figura 21)

Cuando las células secas se almacenan en manitol, la vida media del producto a temperatura ambiente no vá más allá de tres días en cualquiera de las concentraciones usadas (figura 22). En refrigeración el producto mantiene hasta el 50% de la actividad inicial en manitol al 15% al cuadragésimo día de almacenamiento (figura 23).

El mecanismo de estabilización de agentes poliólicos como el glicerol o el manitol puede deberse a dos posibles efectos : en primer lugar, al agregar glicerol u otro tipo de polioles en concentraciones elevadas, se disminuirá la actividad de agua del producto, inhibiendo así el crecimiento de microorganismos que dañan la integridad de la enzima. Se ha comprobado que concentraciones de glicerol superiores al 50% inhiben el crecimiento de bacterias y levaduras mientras que hongos y

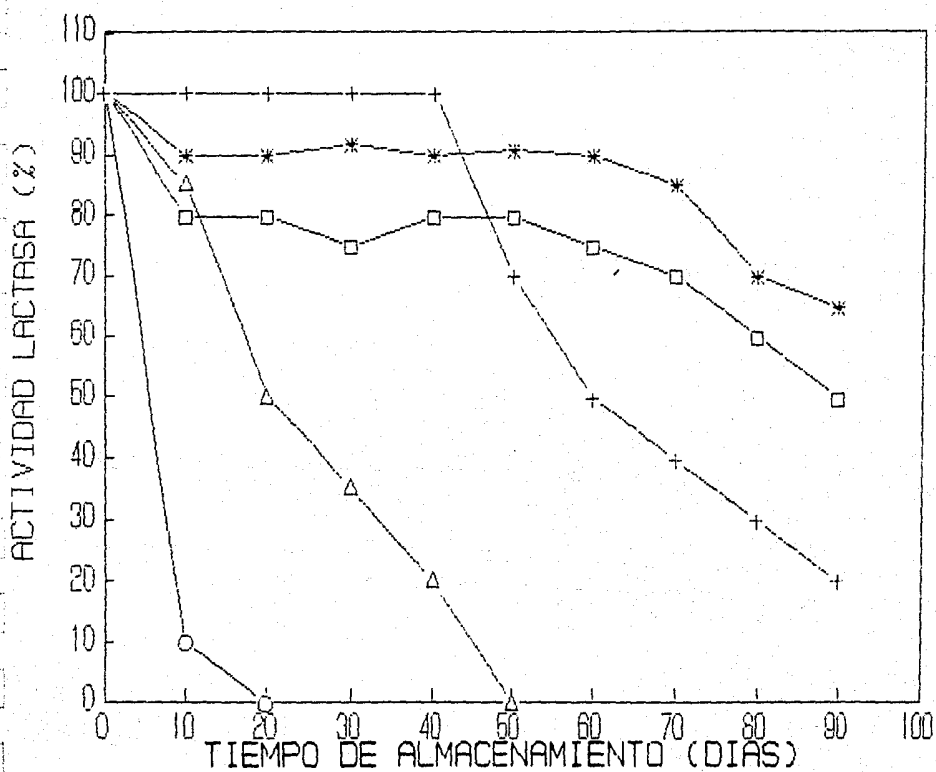


FIG.20 Estabilidad de la actividad enzimática de las células secas de levadura formuladas en las siguientes concentraciones de glicerol: (o) 10% , (▲) 30%, (□) 50%, (*) 70%, (+) 90%. y almacenadas a temperatura ambiente.

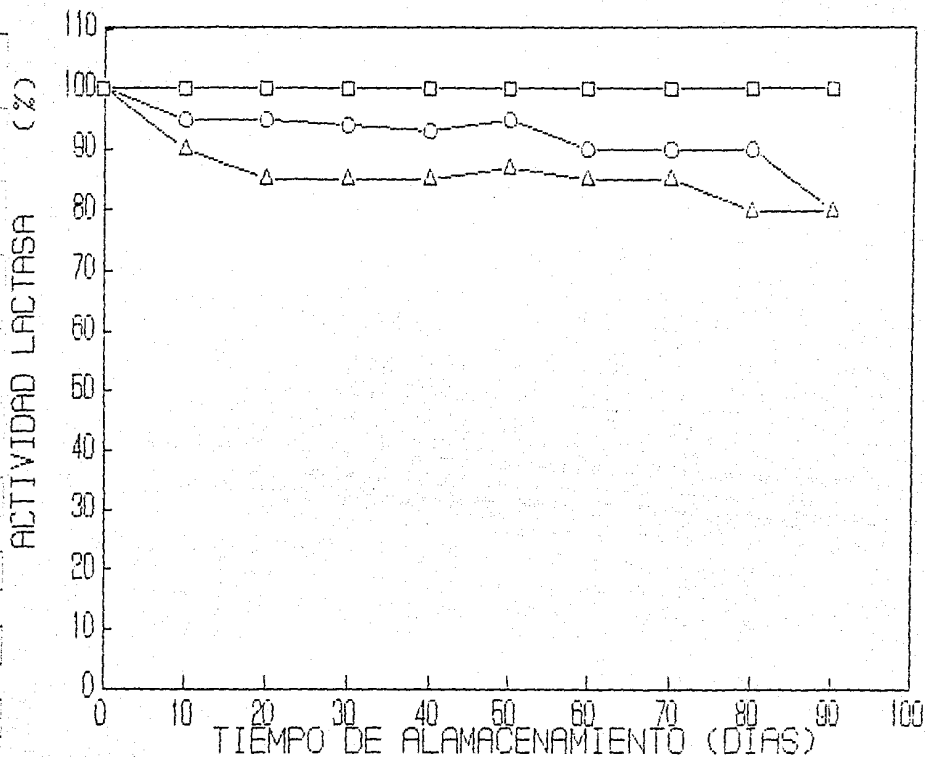


FIG.21 Estabilidad de la actividad enzimática de las células secas de levadura formuladas con las siguientes concentraciones de glicerol: (o) 10%, (▲) 30%, (□) 50%, (*) 70%, (+) 90% y almacenadas en refrigeración.

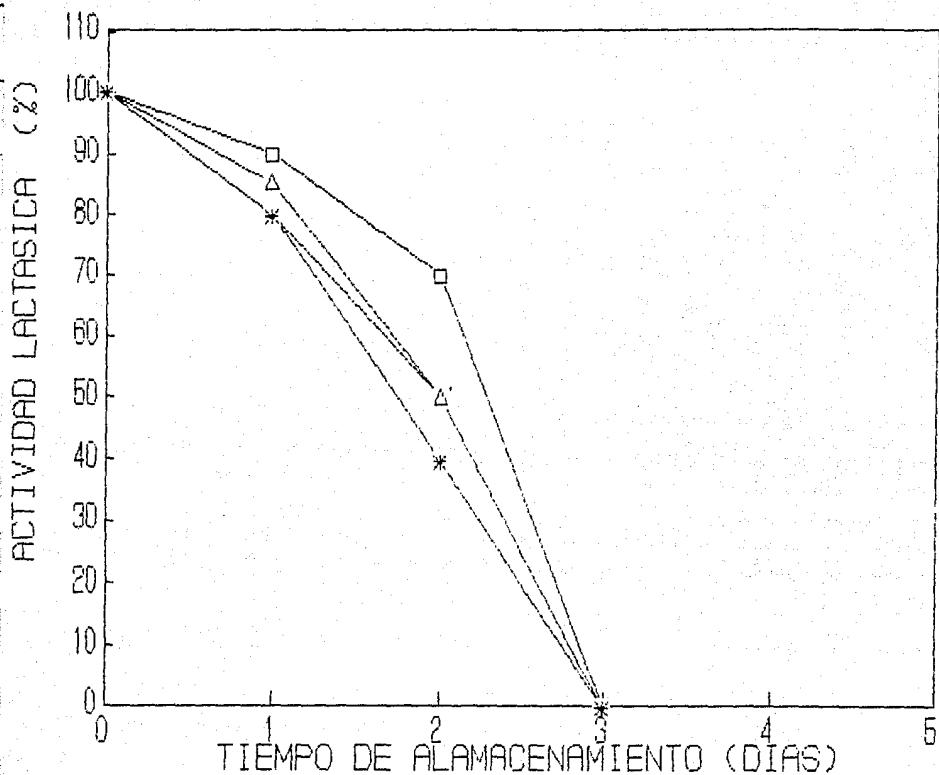


FIG.22 Estabilidad en de la actividad enzimática de las células secas de levadura formuladas en manitol y almacenadas a temperatura ambiente. Las concentraciones de manitol probadas fueron : (o) 3%, (▲) 10%, (□) 15%, (*) 20%.

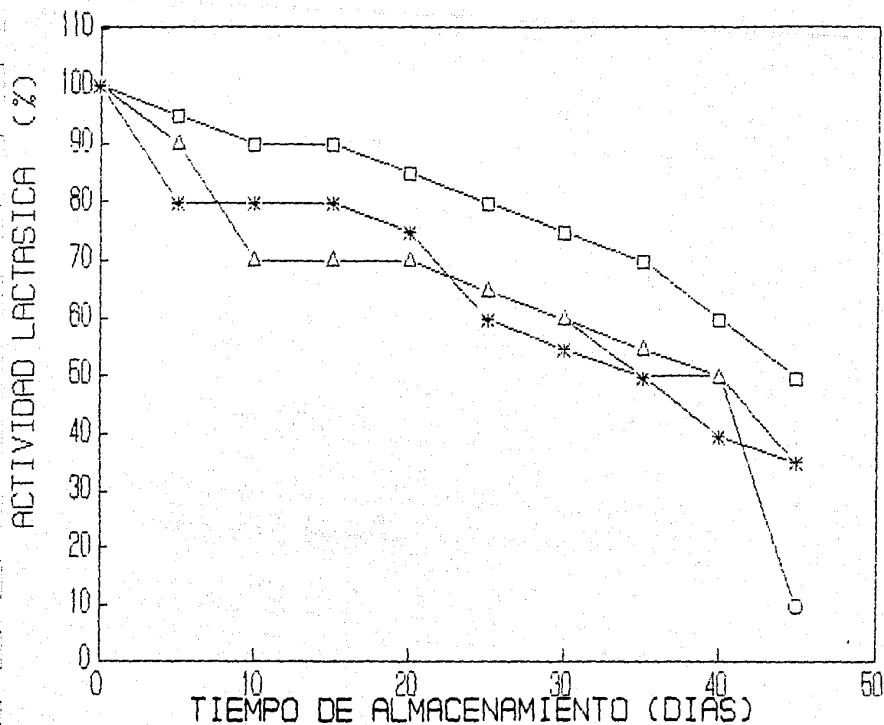


FIG.23 Estabilidad de la actividad lactásica de las células secas de levadura formuladas en manitol y almacenadas en refrigeración. (□) 3%, (△) 10%, (○) 15%, (*) 20%

organismos osmófilos pueden soportar hasta un 90% de este azúcar (Badui 1981)

Por otro lado existen reportes (Klibanov 1983) que indican que el efecto de estos polioles sobre la estabilidad de las enzimas se origina por el fortalecimiento de las interacciones hidrofóbicas entre los aminoácidos no polares, proporcionándole con esto mayor rigidez a la proteína dentro de su microambiente y haciéndola por lo tanto más resistente a la desnaturalización.

Curiosamente, el producto almacenado en manitol a temperatura ambiente pierde su actividad rápidamente, incluso a una velocidad mayor que el control formulado en amortiguador de fosfatos. Esto probablemente se deba a la posible contaminación de los sistemas enzimáticos por microorganismos que utilicen el manitol como fuente de carbono y a la producción por parte de estos, de enzimas proteolíticas que afecten la lactasa (Heidi y Terje 1983).

Finalmente, en la figura 24 se presentan los resultados cuando el producto es almacenado en amortiguador de fosfatos y en polvo seco. En amortiguador de fosfatos, la vida media de la enzima a temperatura ambiente y en refrigeración no llega a ser de más de 10 días. En polvo seco, la vida media de la enzima es de 60 días cuando se almacena en refrigeración y es de tan solo 10 días a temperatura ambiente.

V.3.F Actividad zimasa del producto

La actividad zimasa, es una actividad extraña a la β -galactosidasa y es producto de la capacidad de ciertas enzimas glicolíticas de metabolizar los azúcares para la producción de etanol y CO_2 . Los productos lactásicos crudos presentarán el riesgo de conferir sabores y aspectos extraños a la leche o producto lacteo donde sea utilizado.

Por tal razón, en el presente estudio se ensayó el producto obtenido mediante secado para la detección de una posible

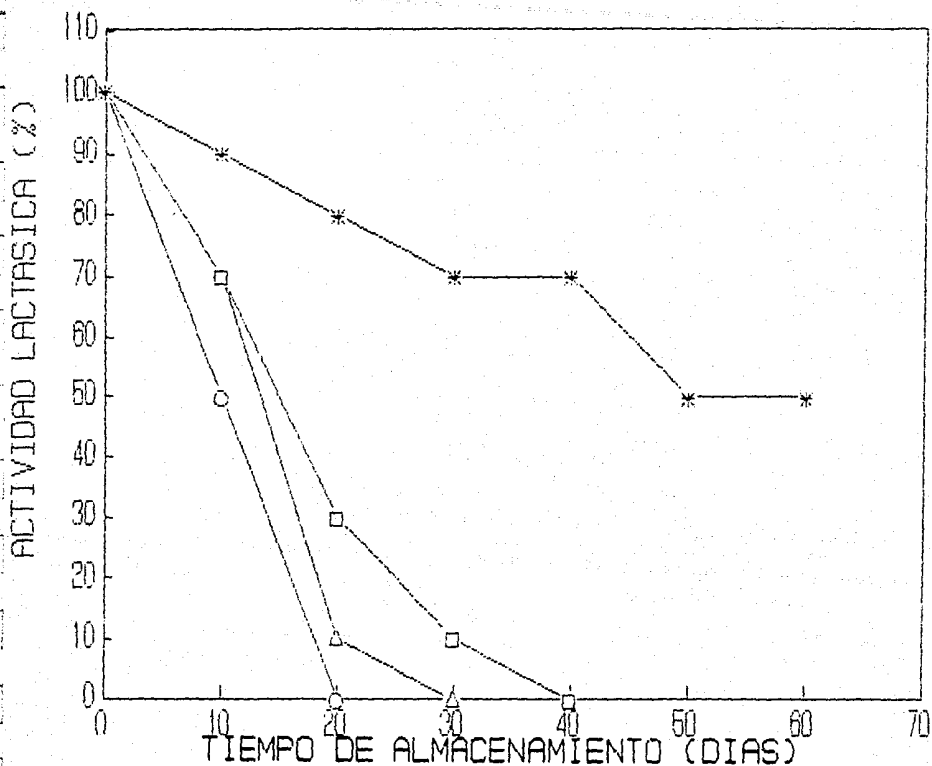


FIG.24 Estabilidad del producto almacenado como polvo seco y en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M pH 6.6.

- (o) Amortiguador de fosfatos a temperatura ambiente.
- (▲) Amortiguador de fosfatos en refrigeración.
- (◻) Polvo seco a temperatura ambiente.
- (*) Polvo seco en refrigeración.

actividad de zimasa. Las pruebas se llevaron a cabo registrando la desaparición de glucosa en el producto seco incubado en una solución de glucosa al 5% a 37°C, durante 6 horas.

Los resultados de la figura 25, señalan que en las soluciones en las que se usó el producto enzimático obtenido mediante secado por aspersión (140-80°C en cualquier concentración de alimentación), no existe una disminución importante de glucosa en las primeras 6 horas de incubación, semejándose el comportamiento al de la curva del control positivo que contiene únicamente glucosa al 5%.

En los sistemas con células frescas, con la misma actividad lactásica (control positivo), la glucosa se consume rápidamente y a la sexta hora únicamente se detecta un 25% de la glucosa original.

De lo anterior se infiere que el secado por aspersión no solamente conserva la actividad de la lactasa, sino que además inactiva la función zimasa. Por ello, el producto que se obtiene puede ser empleado para hidrólisis sin el riesgo de conferir sabores o aspecto extraños al producto lácteo.

V.3.6 Determinación del peso molecular de la β -galactosidasa

Los resultados de la filtración en gel del extracto enzimático obtenido mediante secado en el rotavapor aparecen en la figura 26. El pico de actividad máxima se centra a los 184 ml del volumen eluido, representado por el 10% de la proteína total. El resto de la proteína del extracto es eluida a los 360 ml y representa más del 70% de la proteína total. El volumen disponible calculado fué de 124.7 ml y los volúmenes de elución para las proteínas de calibración fueron de 237.2, 203.0 y 190.0 ml para albúmina, aldolasa y catalasa, respectivamente.

La curva de calibración fué construida graficando los

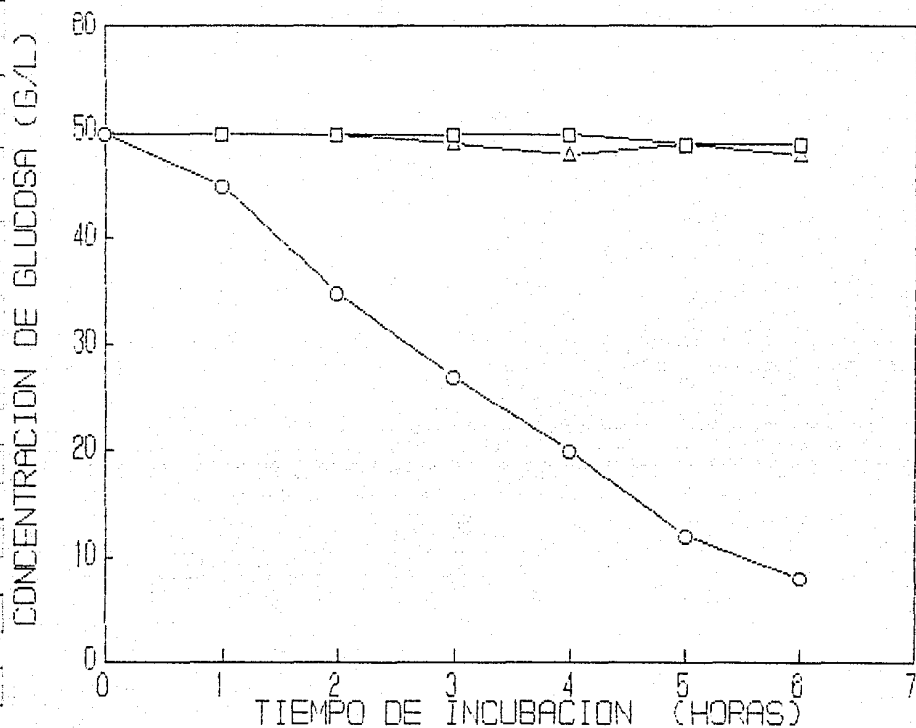


FIG.25 Determinación de la actividad zimasa en el producto obtenido mediante secado por aspersión. Para esto, se incubó 1g de producto seco (aproximadamente 3000 unidades) en un litro de solución glucosada al 5% a 37°C durante 6 horas. (o) control positivo, (□) control negativo, (▲) células secadas por aspersión.

coeficientes de distribución (K_{av}) a partir del volumen de elución de cada proteína en función del logaritmo del peso molecular de éstas.

$$\text{Log peso molecular} = \frac{K_{av} - 2.24}{-0.37}$$

A partir de la expresión anterior y asumiendo que la β -galactosidasa presenta una forma globular, se estimó un peso molecular de 245 000 daltones (figura 27). Este valor es cercano al reportado de 203,000 daltones por Uwajima et al (1972), y el de 201,000 daltones citado por Mahoney y Whitaker (1978), para la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis*.

La enzima es considerablemente más grande que la lactasa de *K. lactis* que tiene un peso molecular de 135,000 daltones (Dickson y Markin 1979), pero más pequeña que la β -galactosidasa de *Escherichia coli* que tiene un peso molecular de 465,000 daltones (Zabin y Fowler 1978).

V.4 Formulación y aplicación del producto en leche y suero lactosado

La formulación del producto, se llevó a cabo mezclando 1 g de células recuperadas por secado por aspersión con 3 ml de glicerol al 50% p/v. En este producto, se estudió el efecto del tiempo y la temperatura en los niveles de expresión de la β -galactosidasa. Las temperaturas probadas fueron 25 40 y 45°C durante dos horas de incubación.

Durante esta prueba se observó un incremento en los valores de actividad conforme al tiempo, en las tres condiciones de temperatura probadas. El nivel máximo de expresión se logró a los 45 y 40°C a los 90 y 120 minutos de incubación respectivamente (figura 28).

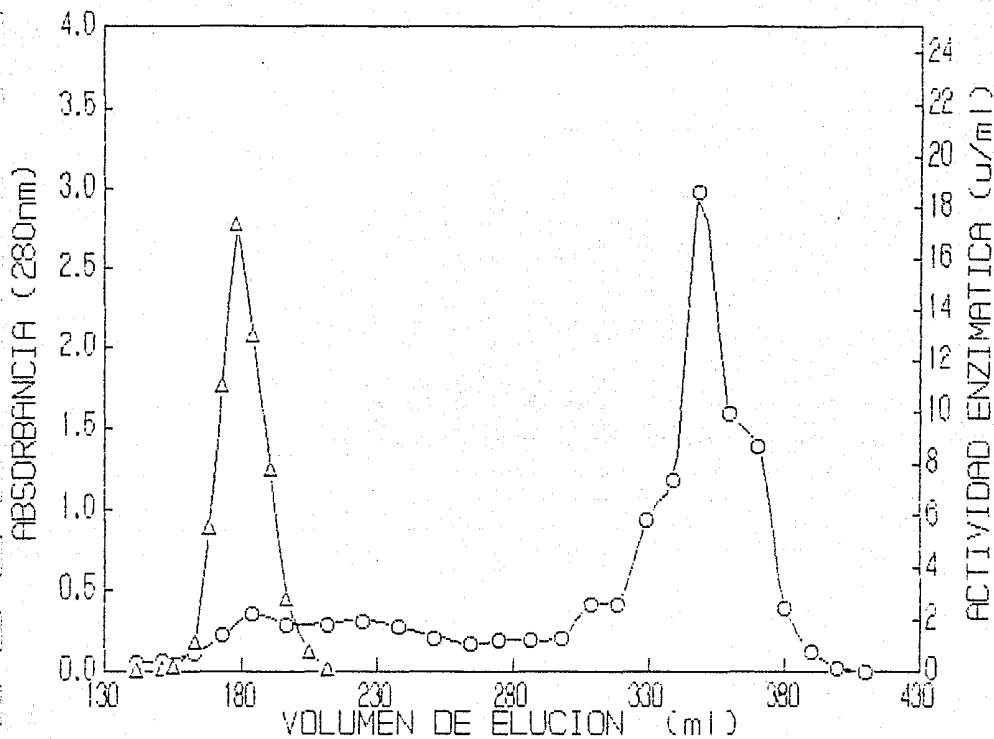


FIG.26 Filtración en gel del extracto enzimático obtenido mediante secado en el rotavapor con actividad β -galactosidasa. 10 ml del extracto fueron aplicados sobre una columna de Sephadex G-200 (2.6 cm x 69 cm), equilibrada y eluida con amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M a pH 6.6. (o) Absorbancia a 280 nm (▲) Actividad enzimática.

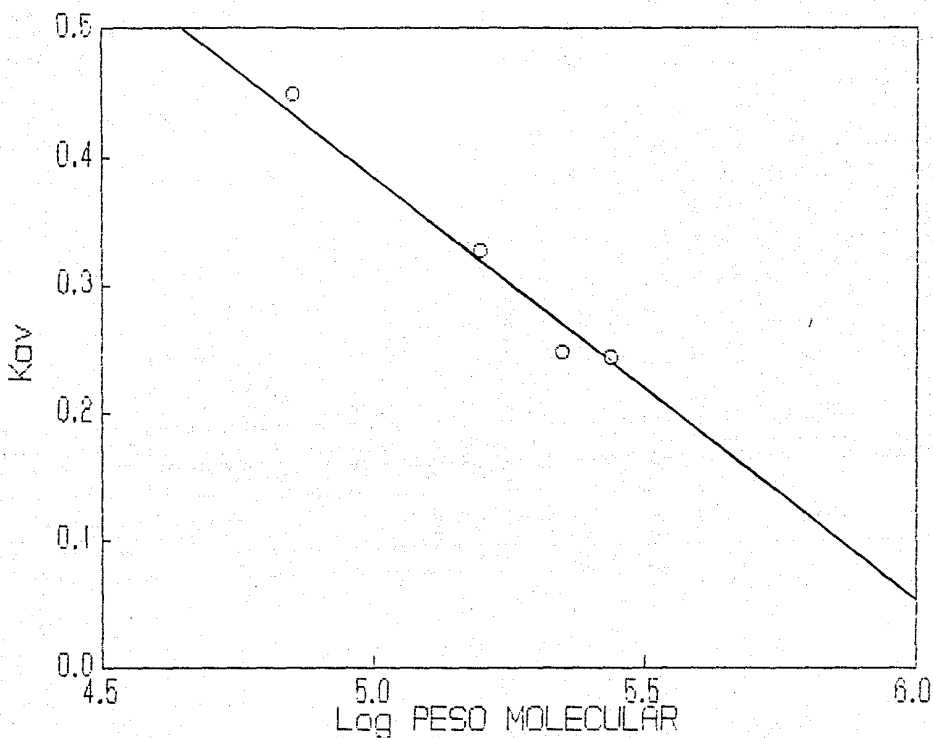


FIG.27 Determinación del peso molecular de la β -galactosidasa. La curva tipo se construyó graficando el logaritmo del peso molecular contra los coeficientes de distribución (K_{av}) de las siguientes proteínas: albúmina pm 67,000 , aldolasa pm 158,000 , y catalasa pm 237,000.

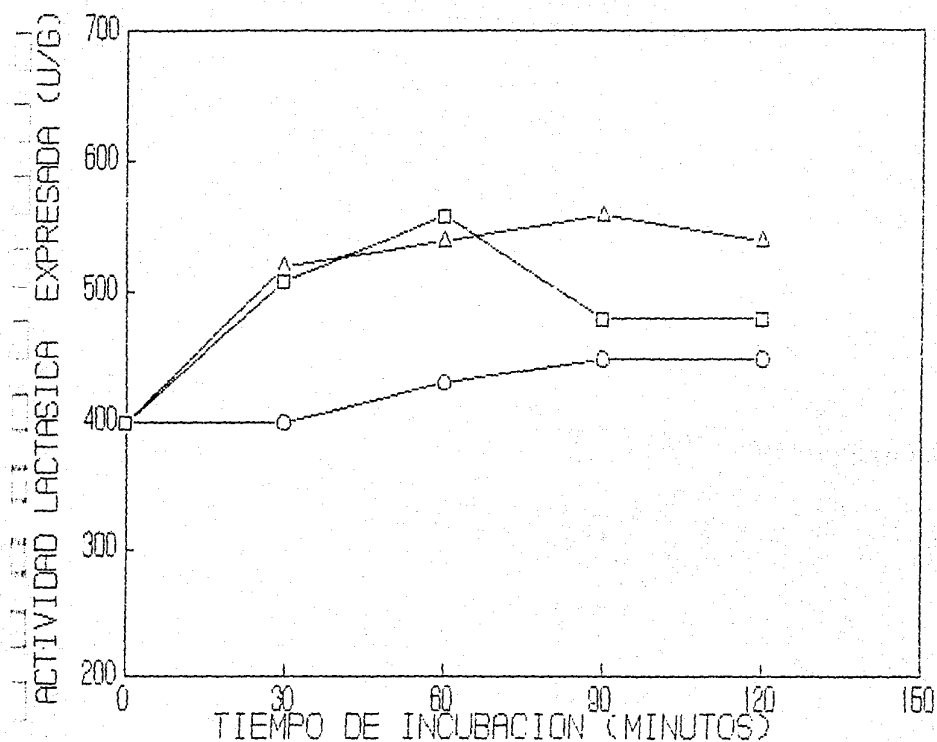


FIG.28 Efecto de la temperatura sobre el nivel expresión de la β -galactosidasa en células de *Kluyveromyces fragilis* secadas por aspersión. Las células fueron resuspendidas en una mezcla con el 50% de glicerol en amortiguador de fosfatos y agitadas a temperatura ambiente (o) 40°C (Δ) y 45°C (□).Cada punto representa el promedio de tres experimentos con un coeficiente de variación del 5%

El incremento en la actividad de la enzima se puede deber a las fuerzas de corte a que se ve sujeta la levadura durante la agitación y al efecto degradativo de enzimas líticas sobre una pared celular debilitada (Johnson 1977).

Aplicación del producto en leche y suero lactosado

Un examen importante en la evaluación de la efectividad de un producto con actividad lactasa, es probarlo en la hidrólisis o conversión de la lactosa presente en la leche y el suero.

La cantidad de producto enzimático y el rango de temperatura usados para la hidrólisis, están en función del grado de conversión deseado, de las condiciones originales de la leche y el suero y del tiempo disponible para la reacción.

En la figura 29 se presentan los resultados de la hidrólisis de leche a pH 6.6 y 40°C aplicando diferentes dosis del producto enzimático formulado en glicerol. Como era de esperarse, la hidrólisis de leche se incrementa con la dosis enzimática y alcanza un valor máximo del 100% cuando se usan 3000 unidades por litro de leche a la cuarta hora de incubación.

Valores parecidos son reportados por Novo Enzymes (1985) para el producto comercial "Lactozym 3000 L", el cual es preparado con la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis*.

Castillo y Sánchez (1980) encontraron que añadiendo 3200 unidades por litro de leche se alcanzaba una hidrólisis de lactosa del 65% al 70% al cabo de 5 horas a 37°C.

La figura 30 describe los resultados que se obtuvieron en la hidrólisis de suero con 5% de lactosa. En este caso los valores de conversión son inferiores a los logrados en leche con las mismas dosis enzimáticas. Sin embargo estos valores coinciden con los reportados por Novo Enzymes (1985), 80% con 3000 U/L y son

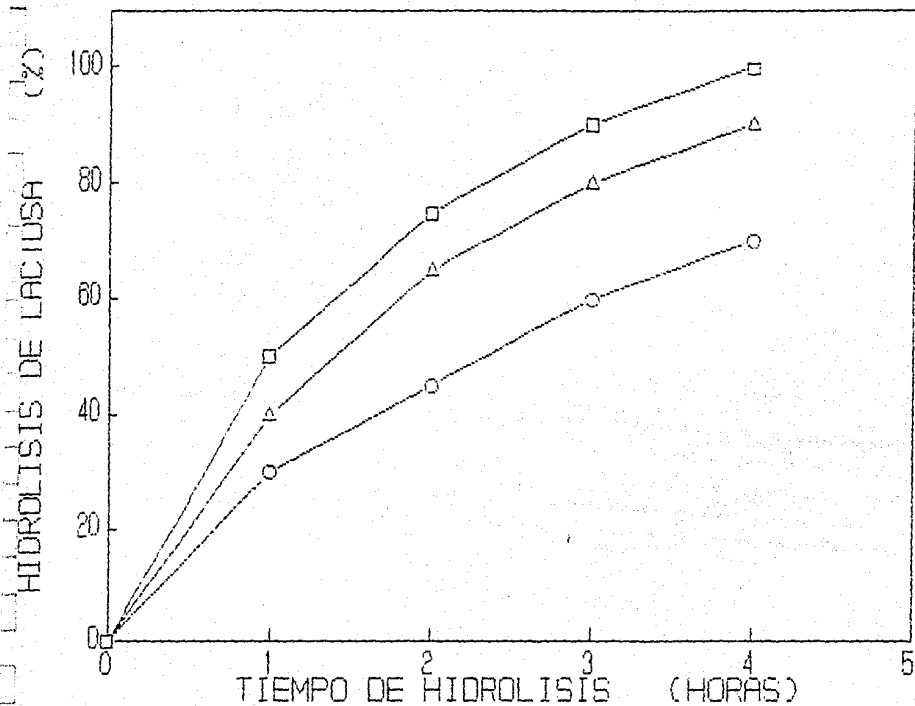


FIG.29 Hidrólisis de lactosa en leche . La reacción se llevó a cabo a 40°C y pH 6.6 . Las dosis enzimáticas empleadas fueron: 1000 U (○), 2000 (△) y 3000 (□) por litro de leche con lactosa al 5%. Cada punto representa el promedio de tres ensayos con un coeficiente de variación del 5%

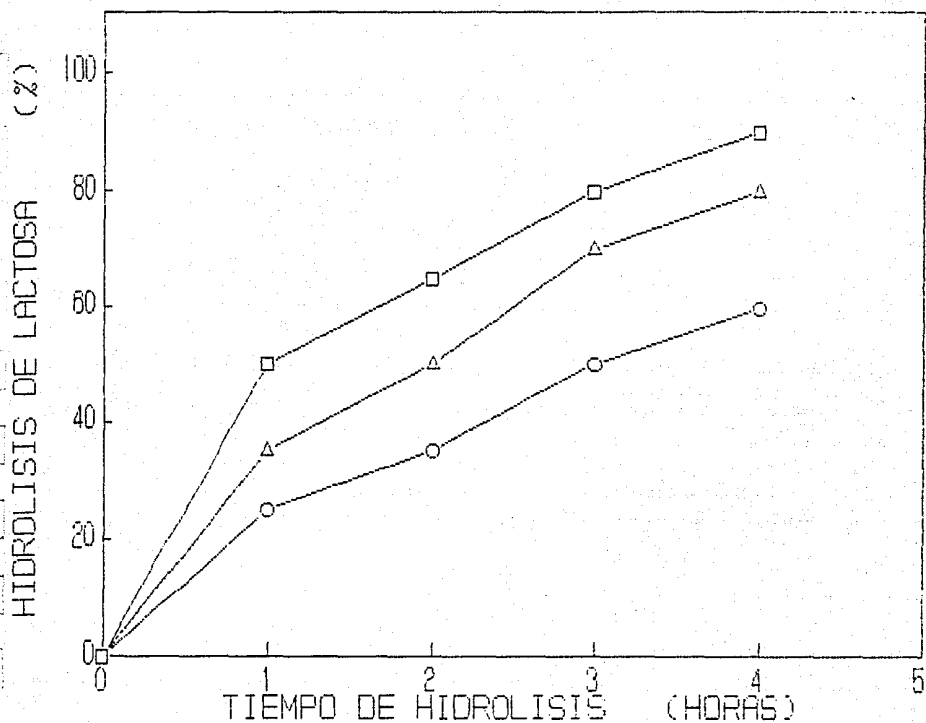


FIG.30 Hidrólisis de lactosa en suero dulce. La reacción se llevo a cabo a 40°C y pH 6.6 con 1000 U (○), 2000 U (△) y 3000 U (□) por litro de suero.

superiores a los citados por Castillo y Sánchez (1980), 40% después de 5 horas, ambos bajo las mismas condiciones de incubación.

La diferencia en los niveles de conversión para lactosa y suero ha sido ya reportada por otros autores (Castillo y Sánchez 1980; Brodsky y Grootwassink 1986; Declaire et al 1985), tanto para el uso de células libres como para células inmovilizadas. Esto es posible se deba a la presencia en el suero de iones calcio en solución los cuales inhiben la actividad de la lactasa disminuyendo de esta manera la conversión de la lactosa. En la leche estos iones se encuentran formando caseinatos de calcio con la caseína presente y por lo tanto el efecto inhibitorio es menor (Tonyi et al 1986).

VI CONCLUSIONES

Comercialmente, la β -galactosidasa de levadura es preparada de acuerdo a dos tendencias principales : una es la de efectuar una ruptura parcial de la pared celular, de modo que la enzima no sea secretada al espacio extracelular, pero que la lactosa y sus productos de hidrólisis puedan difundir libremente a través de la cubierta celular sin que medie el transporte activo. En este caso se utilizan células completas como preparado crudo enzimático. Una segunda alternativa es la ruptura de las células con el objeto de extraer y purificar la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis*.

En el presente estudio , se siguió la primera alternativa y se obtuvo a través del secado por aspersión un preparado crudo enzimático con actividad lactásica.

Las operaciones unitarias empleadas en la recuperación del producto fueron: la centrifugación, para la separación de las células del caldo celular y el secado al vacío y por aspersión para la ruptura y concentración de las células.

Mediante el secado de células de levadura en el rotavapor, se logra obtener un producto con una actividad de 1700 unidades /gramo (90% en relación con la actividad de células permeabilizadas con alcohol isoamílico). Las mejores condiciones de operación encontradas fueron de 45°C durante tres horas de operación, evaporando una muestra con el 10% de sólidos.

Empleando este método, se puede obtener un producto con una actividad lactásica aceptable , sin más pasos de extracción que la separación de los cuerpos celulares.

Una de las ventajas de este método, es que se puede aplicar en la recuperación de aquellas enzimas intracelulares que exhiban una termoestabilidad superior o parecida a la β -galactosidasa, sin el riesgo de pérdida de actividad enzimática, ya que las condiciones de operación son moderadamente suaves.

Por otro lado, es importante señalar que con el uso de esta operación es posible sustituir la utilización de solventes orgánicos para ruptura celular, pudiéndose aplicar el producto directamente en sistemas alimenticios, sin el riesgo que trae consigo el uso de estos agentes.

Cuando se utiliza el secado por aspersión para la recuperación de la β -galactosidasa de levadura se alcanza una actividad máxima del 90%. Las condiciones óptimas de recuperación son: 140°C y 80°C de temperatura de entrada y salida respectivamente, con el 20% de sólidos en la alimentación.

El nivel de expresión de la actividad lactásica está en función de la temperatura en el rango de 110 a 140°C en cualquiera de las concentraciones de alimentación probadas. Por otro lado, la concentración de sólidos en la alimentación no muestra ningún efecto sobre la permeabilización de la levadura.

Una variable de operación importante durante el secado, puede ser el gasto de aire que se utilice, ya que éste determina los tiempos de residencia de la partícula, lo cual repercutirá en los niveles de permeabilización de la levadura y la estabilidad de la enzima. Durante el presente trabajo, se operó en un régimen de aire constante de 400 Kg/Hr por lo que se sugiere que en pruebas posteriores se estudie el efecto de diversos tiempos de residencia sobre los niveles de permeabilización celular y la recuperación de la enzima.

Las células de levadura recuperadas mediante el secado por aspersión presentan una permeabilización parcial de la membrana y

pared celular. De esta forma, la enzima no es secretada al espacio extracelular, pero la lactosa y sus productos de hidrólisis pueden difundir libremente a través de la cubierta celular sin que medie el transporte activo.

Con esto, el producto seco puede ser utilizado comercialmente como preparado enzimático crudo a base de células completas, más que como extracto purificado que es como la empresa Novo Enzymes elabora su producto "Lactozym" el cual presenta una actividad enzimática de 3000 unidades/gramo

El proceso de recuperación propuesto es muy simple ya que consta unicamente de tres pasos, la centrifugación, la resuspensión y el secado. El producto que se obtiene presenta una buena actividad lactásica, 2500 unidades/gramo, sin la presencia de actividades extrañas como la actividad zimasa y algo importante para cualquier proceso biotecnológico, a un costo que permite su empleo en leche y suero en una forma económica (Varela 1986).

Puesto que las células de levadura recuperadas mediante secado por aspersión presentan una permeabilización parcial, estas pudieran ser utilizadas en forma inmovilizada en reactores enzimáticos.

El secado por aspersión, se ha aplicado en forma efectiva en la concentración y formulación de enzimas extracelulares (Wang et al 1979) y pudiera ser empleado en la recuperación de enzimas intracelulares termoestables de microorganismos con paredes celulares resistentes, como es el caso de las levaduras y las bacterias gram-positivas.

En lo que respecta a la caracterización del producto, el extracto enzimático obtenido mediante secado en el rotavapor muestra una actividad óptima para hidrólisis de ONPG a pH entre

6.4 y 7.2 a 40°C y una temperatura de actividad máxima a 50°C , con una energía de activación calculada mediante la ecuación de Arrhenius de 5.25 Kcal/mol.

El producto conserva el 100% de su actividad durante veinte minutos dentro de un rango de pH de 6.4 a 7.2 a 40°C y presenta una estabilidad térmica entre 40 y 43°C durante el mismo tiempo de incubación a pH 6.6. La energía de desnaturalización calculada fue de 136.45 Kcal/mol.

En cuanto a los parámetros cinéticos encontrados, la β -galactosidasa del extracto enzimático obedece a una cinética de Michaelis-Menten respecto a la lactosa y al ONPG usados como sustratos. La velocidad de hidrólisis de lactosa (15.2 μ moles de glucosa / min \times mg de proteína) es mayor que la de ONPG (9.0 μ moles / min \times mg de proteína). Sin embargo, la enzima muestra una mayor afinidad por ONPG (3.4 mM), que para la lactosa (15.56 mM).

El extracto enzimático no presenta inhibición en presencia de la glucosa, no así la galactosa quien inhibe competitivamente a la β -galactosidasa en concentraciones por arriba de 100 mM.

Con respecto a los estudios de estabilidad en almacenamiento se puede concluir, que tanto el manganeso, en concentraciones de 0.1 a 1.0 mM, como el glicerol, en concentraciones por arriba del 50%, son fundamentales en la conservación de la actividad enzimática del producto. Además, la forma en que se prepare el producto (extracto enzimático o células secas completas) influya en la vida media de éste.

El producto que se obtiene mediante secado por aspersión no presenta actividad de zimasa, por lo que puede ser empleado para la hidrólisis de leche, sin el riesgo de conferir sabores ni aspectos extraños al producto.

Finalmente , el producto formulado en glicerol, promueve una mayor hidrólisis de la lactosa cuando se aplica en leche que cuando es empleado en suero. Los niveles de conversión del disacárido tanto en leche como en suero son similares a los reportados para la enzima comercial "Lactozym" producida a partir de *Kluyveromyces fragilis*.

VII BIBLIOGRAFIA

1. Aiba S., Humphrey A.E. y Millis N.F. 1973. Biochemical Engineering. 2da ed. Academic Press, Nueva York.
2. Asenjo, J.A. y Hunter J.B. 1986. Structured and simple models of enzymatic lysis and disruption of yeast cells. Ed. American Chemical Society. 10-31
3. Alais C. 1971. Ciencia de la leche. CECSA, México.
4. Bayles, T.M. 1968. Milk intolerance and lactose tolerance test. *Gastroenterology*, **54** ; 475-77.
5. Beck, D. 1982. "Biotechnological fundamentals of continuous biomass production". Academy of Sciences of the G.D.R. Institute of Technical Chemistry.
6. Biermann L. y Morton D.G. 1968. Isolation and characterization of β -galactosidase from *Saccharomyces lactis*. *Biochem. Biophys. Acta.* **167**, 373-77.
7. Brennan J.G., Butters J., Cowell N.D. y Lilly A.E.V. 1970. Las operaciones de la ingeniería de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
8. Brodsky J.A. y Grootwassink J.W.D. 1986. Development and evaluation of whole cell yeast lactase for use in dairy processing *J. Food Sci.* **51** (4), 897-903.
9. Canales R.A. 1985. Inmovilización de células con actividad β -galactosidasa para la hidrólisis de lactosa en leche. Tesis profesional. Facultad de Química, UNAM, México.
10. Casas L., García Garibay M., Torres J. y López A. 1987. Influence of oxygen transfer rate on β -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* *Biotechnol. Lett.* **19**, (6), 417-20.
11. Castillo E.R. 1986. Desarrollo de un sistema de inmovilización de células completas de levadura con actividad β -galactosidasa. Tesis profesional. Facultad de Química, UNAM, México.
12. Castillo F.J. y Sánchez F.L. 1980. Producción, extracción y caracterización de β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis*, crecida en suero de leche. *Acta Cient. Venezolana* **31**, 154-59.

- 13 Craven G.R., W. Steers y C.B. Anfinsen. 1965. Purification, composition and molecular weight of the β -galactosidase of *Escherichia coli*. **Journal Biol. Chem.** **240**, 2468-76.
14. Chan H.M.C. 1971. Factors influencing the enzymatic hidrolisis of lactose by β -galactosidase isolated from *Saccharomyces fragilis*. M.Sc. Thesis, University of California Davis
- 15 Charpienter, T., Nguyen, T., Bonaly, R. y Feuillat, M. 1986. Alteration of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during autolysis. **Appl Microbiol Biotechnol** **24**, 405-413.
- 16 Declaire M. y N. van Huynh. 1985. In situ activation of β -galactosidase of *Kluyveromyces fragilis* resting cells by sodium and potassium phosphates and chlorides. **Appl Microbiol Biotechnol** **21**, 390-393.
- 17 Dickson R.C. y Markin J.S. 1979. Purification and properties of an inducible β -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces fragilis*. **J. Bacteriol.** **137** (1), 51-61.
18. Dunill P. 1972. The recovery of intracellular products. **Ferment. Technol. Today.** 187-194.
19. Eugene J. y Bingham E.W. 1978. Propierties of β -galactosidase of *Saccharomyces fragilis*. **J. Dairy Sc.** **61** (2) 20-25.
20. García-Garibay M. 1986. Desarrollo de sistemas de purificación de enzimas de interés industrial. Datos sin publicar. Examen de oposición CEINGEBI, UNAM.
- 21 Heidi, K.B. y Terje, B.C. 1983. Effect of dextran and dextran modifications on the thermal and proteolytic stability of conjugated bovine testis β -galactosidase and human serum albumin. **Biochimica et Biophysica Acta** **743**. 401-407.
22. Johnson J.C. 1977. Yeast for food and other purposes. **Noges Data Corporation.** New Jersey. 139-179.
- 23 Klivanov A.M. 1983. Stabilization of enzymes against thermal inactivation. **Advances in Applied Microbiol.** **29**, 1-28.
24. Kretchmer N. 1972. Lactose and lactase. **Scientific American.** **227** (5), 71-81.
25. Kuby S.A. y Lardy H.A. 1953. Purification and kinetics of β -galactosidase from *Escherichia coli*. **J. American Chem. Soc.** **75**, 756-59.

26. Lederberg J. 1950. The β -galactosidase of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** **60**, 381-92.
27. Lehninger A.L. 1979. Bioquímica. 2da edición. Ediciones Omega. Barcelona, España.
28. Lisker R. 1980. Estudio doble ciego sobre la tolerancia a la lactosa de la leche en un grupo de niños rurales. **Rev. Inv. Clin. México.** **32**, 363-68.
29. Lowry O.H., J.N Rosebrough, L.A. Farr y J.R. Randall 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol. Chem.** **193**, 265-72.
30. Mahoney R.R., Nickerson T.A. y Whitaker J.R. 1975. Selection of strain, growth conditions and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. **J. dairy Sci.** **58** (11), 1620-29.
31. Mahoney R.R. y Whitaker J.R. 1977. Stability and enzymatic properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **J. Food Biochem.** **1**, 327-50.
32. Mahoney R.R. y Whitaker J.R. 1978. Purification and physicochemical properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **J. Food Sci.** **43**, 584-91.
33. Melling J. y Phillips W. 1975. Large scale extraction and purification of enzymes. **J. Appl. Chem. Biotechnol.**, **23**, 166
34. Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal Chem.** **31** (3), 426-28.
35. Myers R.P. 1956. Drying of yeasts to inactivate zymase and preserve lactase. U.S. Pat. 2762749.
36. Nevile M.F. y Lilly D.M. 1984. The interactions between fermentation and protein recovery. **Biotechnology.** July, 623-627.
37. Nijpels H.H. 1981. Enzymes and food processing. Birch G.G., Blakebrough N. y Parker K.J. **Appl. Sci.** Londres
38. Novo enzymes. 1985. Boletín de datos técnicos para la aplicación de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis*.
39. Quintero R.R. 1981. Ingeniería Bioquímica, Teoría y aplicaciones. Alhambra. México.
40. Reed G. 1982. Industrial Microbiology. 4th Ed. Avi Westport.
41. Rosado J.L. 1985. Análisis de hidrógeno expirado como índice de absorción de carbohidratos. **Rev. Inv. Clin. México.** **37**, 261-70.

42. Scott M.W. 1985. Designing downstream processes for large scale protein purification. **Biotechnology** 5, 789-93.
43. Segel I.H. 1976. Biochemical calculations. 2nd Ed. John Wiley and Sons. New York.
44. Stimpson E.G. y Sayville N.Y. 1954. Drying of yeast to inactivate zymase and preserve lactase. U.S. Pat.2693440.
45. Stryer L. 1982. Bioquímica. 2da edición. Editorial Reverte. España.
46. Takatoshi I., Masaru S. y Susumu A. 1982. Production and characterization of β -galactosidase from lactose-fermenting yeasts. **Agric. Biol. Chem.** 46 (4), 899-904.
47. Thomson R.A. 1984. Recent developments in protein recovery and purification. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** 34B, 194-98.
48. Tonyi, J., Rouleau, D. y Mayer, C. 1987. The effects of whey cations on the kinetics parameters of a model for the enzymic hydrolysis of lactose. **J. Chem. Tech. Biotechnol** 26, 153-167.
49. Uwajima T., Yagi H. y Terada O. 1972. Purification, cristallization and some properties of β -galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. **Agric. Biol. Chem.** 36, 570-77.
50. Varela C.G. 1986. Evaluación técnico económica del proyecto para la fabricación de un producto con actividad de lactasa. Tesis profesional. Escuela de Ing. Química de la Universidad Autónoma de Puebla, México.
51. Vassilis G. y López-Leyva M. 1985. Hidrolysis of lactose. **Process Biochemistry.** 20, 2-12.
52. Wallenfels K. y Malhotra O.P. 1960. β -galactosidase. The enzymes . Vol.4 . Academic Press, London. 409-430
53. Wang D.I.C., Cooney C.L., Demain A.L., Dunnill P. y Lilly M. 1979. Fermentation and enzyme technology. John Wiley and Sons. New York.
54. Wendorff W.L. y Amundson C.H. 1971. Characterization of β -galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. **J. Milk Food Technol.** 34 (6), 300-306.
55. Whitaker J.R. 1972. Principles of Enzymology for the Food Sciences. Dekker, New York.
56. Yusuf C. y Murray M.Y. 1986. Disruption of microbial cells for intracellular products. **Enzyme Microb. Technol.**, 7; 194-204.

57 Zabin, I. y Fowler, V. 1978. β -galactosidase, the lactose permease protein and th iogalactoside transacetylase en: "The Operon". Ed. Jeffrey H. Miller and William S. Reznikoff. Cold Spring Harbor Laboratory. 89-121.